

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“COMPLEXO LUMINESCENTE DE Ru(II)-PERILENO:
AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E
FOTOCITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MELANOMA
MURINO B16F10 *IN VITRO* E *IN VIVO*”**

Isabele Aparecida Soares de Campos*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA INORGÂNICA.

Orientadora: Profa. Dra. Rose Maria Carlos

***bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Isabele Aparecida Soares de Campos, realizada em 17/11/2017.

Profa. Dra. Rose Maria Carlos
UFSCar

Profa. Dra. Cíelia Mara de Paula Marques
UFSCar

Prof. Dr. Wallace Moreira Pazin
UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Vinicio e Rosângela, pelo amor e apoio incondicionais em todos os momentos. Vocês são meu alicerce e minha maior motivação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e a toda minha família pelo amor incondicional, pelo incentivo e apoio nas minhas decisões. Obrigada por me ajudarem na construção dos meus sonhos! Amo muito vocês!

Ao meu namorado, Felipe, pelo companheirismo, paciência, compreensão e apoio em todos os momentos. Obrigada por tornar as coisas mais simples, me incentivar e permanecer ao meu lado! Amo você!

A Profa. Dra. Rose Maria Carlos pela orientação, confiança, paciência, carinho e cuidado! Obrigada por ter me acolhido tão bem, pela amizade e principalmente por ter me ensinado tanto.

Aos amigos do LaFIB, Rafa, Mari, Bia, Mirella, Yasmin, Marlon e Van, pela amizade, discussões científicas e por todos os momentos de incansáveis risadas. Em especial ao Rafa (ou Rafão) que se tornou um grande amigo, me acolheu nos almoços de família e esteve sempre ao meu lado. Rafa, você foi

meu presente de São Carlos! E também à Mari, meu par de “Marinete e Solineuza”, que se manteve presente diariamente, se tornou uma amiga muito especial. Mari, obrigada pelas nossas aventuras que foram desde queimar pipoca no micro-ondas por ficar conversando até o para-brisa derretido no trânsito.

Ao Prof. Dr. Otaciro Rangel e ao Dr. Vinicius Santana por me receberem com tanto carinho, pelo auxílio nos experimentos de EPR e pelas discussões científicas. Levarei vocês como exemplos de profissionais e como pessoas. Obrigada de coração!

Ao Dr. Antônio Roveda pelo auxílio com os filmes, nos experimentos de EPR e nas discussões científicas.

A Profa. Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues pela colaboração, confiança e por disponibilizar seu laboratório para a realização dos ensaios biológicos. Em especial gostaria de agradecer a Ms. Carolina de Amat Herbozo pela amizade, paciência, por me ensinar a trabalhar com as células (a primeira placa a gente nunca esquece), me auxiliar nos experimentos *in vivo* e pelas longas jornadas no laboratório. Também gostaria de agradecer ao Estevão e à Luana pela hospedagem durante minha estadia em SP, pela amizade, infinitos auxílios e pelo cuidado, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, ao Dr. Wallace Moreira Pazin e ao Adriano pela receptividade, auxílio e colaboração nos experimentos de tempo de vida.

Ao Prof. Dr. Luciano Bachmann pelas medidas de intensidade e de irradiância dos sistemas de luz.

A todos os professores e funcionários do DQ-UFSCar que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Paulo e à Luciana do RMN, à Doraí e ao Ademir.

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

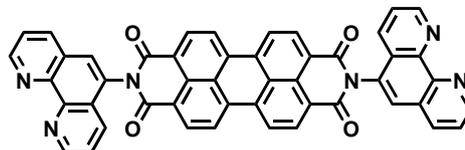
A ₀₋₀	Absorbância das vibrações moleculares 0-0
A ₀₋₁	Absorbância das vibrações moleculares 0-1
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
CT	Estado excitado de transferência de carga *{ ⁺ pPDIp-pPDIp ⁻ }
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPR	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (do inglês, electron paramagnetic resonance)
EROs	Espécies reativas do oxigênio
EtOH	Álcool etílico
Excímero	*{pPDIp-pPDIp}
Excímero Dinâmico	{ [*] pPDIp-pPDIp}
HEPES	Ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N'-(2- etanosulfônico)
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrogênio
HO [•]	Radical hidroxila
I	Irradiância
IC ₅₀	50% de inibição celular
ILCT	Estado de transferência de carga interna do ligante (do inglês, intraligand charge-transfer)
ISC	Cruzamento intersistemas (do inglês, intersystem crossing)
LED	Diodo emissor de luz (do inglês, light emitting diode)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MLCT	Estado excitado de transferência de carga do metal para o ligante (do inglês, metal-to-ligand charge-transfer)
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
N ₂	Nitrogênio gasoso
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
PDI	Perileno diimida
PI	Índice de fotocitotoxicidade (do inglês, phototoxicity index)
pPDIp	Ligante livre 1,10-fenatrolina-perileno-1,10-fenatrolina
pPDIp ²⁻	Diânion do ligante 1,10-fenatrolina-perileno-1,10-fenatrolina
pPDIp ^{•-}	Ânion radical do ligante 1,10-fenatrolina-perileno-1,10-fenatrolina
PS	Fotossensibilizador (do inglês, photosensitizer)
RPMI	Meio de cultura celular RPMI 1640
RupPDIp	[(phen) ₂ RupPDIp] ²⁺
TEMPOL	4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine <i>N</i> -oxyl
TFD	Terapia fotodinâmica
TMP-OH	2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol
¹ O ₂	Oxigênio singlete
¹ *PS	Fotossensibilizador no estado excitado singlete
³ *MLCT	Estado excitado tripleto de transferência de carga do metal para o ligante
³ *PS	Fotossensibilizador no estado excitado tripleto
4-oxo-TEMPO	4-oxo-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy
5-ALA	Ácido 5-aminolevulânico
ε	Absortividade molar

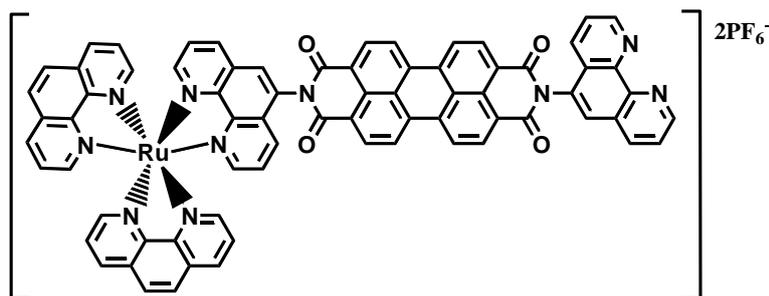
ϕ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singleto
λ_{EX}	Comprimento de onda de excitação

LISTA DE FÓRMULAS E ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS

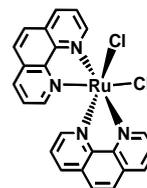
pPDIp 1,10-fenantrolina-perilenodiimida- 1,10-fenantrolina



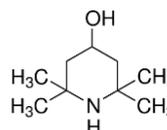
RupPDIp [Ru(phen)₂(pPDIp)](PF₆)₂



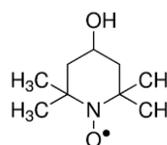
[RuCl₂(phen)₂]



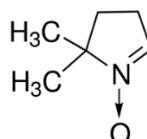
TMP-OH 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol



TEMPOL 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine *N*-oxyl



DMPO 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide



LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.1 - Ilustração gráfica do mecanismo de ação da TFD..... 3
- FIGURA 1.2 - Figura ilustrativa do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})](\text{PF}_6)_2$ 6
- FIGURA 3.1 - Sistemas de luz utilizados neste estudo, (A) reator fotoquímico com lâmpadas Rayonet (RMR 4200 A) no comprimento de onda de 420 nm e (B) sistema com 18 LEDs SMD 5050 no comprimento de onda de 518 nm..... 14
- FIGURA 4.1 - Espectros de absorção do ligante livre pPDIp, dos complexos RupPDIp e $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerados (N_2)..... 18
- FIGURA 4.2 - Espectros de EPR experimentais e simulados do (A) ligante livre pPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (B) do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerado (N_2), a temperatura ambiente..... 21
- FIGURA 4.3 - Espectros de emissão do (A) ligante livre pPDIp e (B) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerada (N_2), nos comprimentos de onda de excitação (λ_{EX}) de 450 nm e 500 nm..... 22
- FIGURA 4.4 - Espectros de emissão do complexo RupPDIp (25, 50 e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerados (N_2) nos comprimentos de onda de excitação de (A) $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ e (B) $\lambda_{\text{EX}} = 500 \text{ nm}$ 23
- FIGURA 4.5 – Curva de decaimento de emissão para o complexo RupPDIp, ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerado (N_2), $\lambda_{\text{EM}} = 448 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 600 \text{ nm}$ 24

- FIGURA 4.6 - Espectros de UV-Vis do complexo RupPDIp em DMSO, desaerado (N₂) (A) 25 e 50 μmol.L⁻¹ irradiados com luz de 420 nm e (B) 25 μmol.L⁻¹ irradiado com LED 518 nm..... 25
- FIGURA 4.7 - Espectros de emissão do complexo RupPDIp (50 μmol.L⁻¹) em DMSO desaerado (N₂) acompanhada durante a irradiação com luz de 420 nm em (A) λ_{EX}= 450 nm e (B) λ_{EX}= 500 nm e com luz de 518 nm em (C) λ_{EX}= 450 nm e (D) λ_{EX}= 500 nm..... 27
- FIGURA 4.8 - Volta térmica do complexo RupPDIp no escuro (12h) (25 μmol.L⁻¹) em DMSO, desaerado (N₂) acompanhada por UV-Vis, (A) após 7h de irradiação com luz de 420 nm e (B) após 3h de irradiação com luz de 518 nm..... 28
- FIGURA 4.9 - (A) Espectros de EPR experimentais do complexo RupPDIp (150 μmol.L⁻¹) em solução de DMSO desaerado acompanhando durante a fotólise com luz de 420 nm por 50 min. (B) Espectro de EPR experimental e simulado do complexo RupPDIp (50 μmol.L⁻¹) em solução de DMSO desaerado após 2h de irradiação com luz de 420 29
- FIGURA 4.10 - Solução do complexo RupPDIp (A) 25 μmol.L⁻¹ e (B) 50 μmol.L⁻¹ em DMSO na presença de O₂ (sistema aberto) com irradiação com luz de 420 nm..... 30
- FIGURA 4.11 - Emissão do complexo RupPDIp em DMSO sistema aberto na presença de O₂, acompanhada durante a irradiação com luz de 420 nm sendo (A) 25 μmol.L⁻¹ e (B) 50 μmol.L⁻¹ com comprimento de onda de excitação de 450 nm, (C) 25 μmol.L⁻¹ e (D) 50 μmol.L⁻¹ com comprimento de onda de excitação de 500 nm..... 31
- FIGURA 4.12 - Solução do ligante livre pPDIp (100 μmol.L⁻¹) em DMSO, desaerado (N₂) com irradiação com luz de 420 nm por 2 h, espectros de (A)

- absorção e de (B) emissão ($\lambda_{EX} = 500$ nm) acompanhados durante a irradiação..... 32
- FIGURA 4.13 - Espectro de absorção do complexo RupPDIp (25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em meio de cultura celular RPMI, desaerado (N_2)..... 33
- FIGURA 4.14 - Espectros de emissão do complexo RupPDIp (25, 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI, (A) $\lambda_{EX} = 450$ e (B) $\lambda_{EX} = 530$ nm, desaerado (N_2)..... 34
- FIGURA 4.15 - Espectro de emissão do meio de cultura celular RPMI com $\lambda_{EX} = 450$ nm, desaerado (N_2)..... 34
- FIGURA 4.16 - Curva de decaimento de emissão para o complexo RupPDIp, (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de RPMI desaerado (N_2), $\lambda_{EM} = 448$ nm e $\lambda_{EX} = 600$ nm..... 35
- FIGURA 4.17 - Solução do complexo RupPDIp (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI, desaerado (N_2), com irradiação com (A) luz de 518 nm e (B) luz de 420 nm..... 36
- FIGURA 4.18 - Emissão do complexo RupPDIp (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI desaerado (N_2) acompanhada durante (A) a irradiação com luz de 420 nm e (B) com luz de 518 nm..... 37
- FIGURA 4.19 - Espectro de UV-Vis da solução do complexo RupPDIp (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI desaerado (N_2), irradiada com luz de 518 nm durante 30 min para a formação do pPDIp^{*} seguida pela irradiação com luz de 420 nm por 3 h para a formação do diânion pPDIp²⁻..... 38
- FIGURA 4.20 - Volta térmica no escuro (14h) do complexo RupPDIp (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI, desaerado (N_2) após 2h de irradiação com luz de 420 nm, acompanhada por UV-Vis..... 38

- FIGURA 4.21 - Espectro de EPR do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de RPMI desaerado (N_2) (A) no escuro, (B) com irradiação com luz de 518 nm por 30 min e (C) com irradiação com luz de 420 nm por 2h..... 39
- FIGURA 4.22 - Espectro de EPR do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de RPMI desaerado (N_2) (A) no escuro, (B) com irradiação com luz de 518 nm por 30 min e (C) com irradiação com luz de 420 nm por 2h..... 40
- FIGURA 4.23 - Espectro de absorção do complexo RupPDIp (25 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em tampão fosfato (pH 7,4) desaerado (N_2)..... 41
- FIGURA 4.24 - Espectros de emissão do complexo RupPDIp (25 , 50 e $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em tampão (pH 7,4) desaerados com (A) $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ e (B) $\lambda_{\text{EX}} = 500 \text{ nm}$ 42
- FIGURA 4.25 - Curva de decaimento de emissão para o complexo RupPDIp, ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução tampão (pH 7,4) desaerado (N_2), $\lambda_{\text{EM}} = 448 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 600 \text{ nm}$ 42
- FIGURA 4.26 - Espectros de absorção e de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) do complexo RupPDIp (A) $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e (B) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão (pH 7,4) desaerados (N_2), nas temperaturas de $3 \text{ }^\circ\text{C}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \text{ }^\circ\text{C}$ com variação de $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 43
- FIGURA 4.27 – Espectros de UV-Vis do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em tampão fosfato (pH 7,4) desaerado (N_2), irradiados com (A) luz de 420 nm e (B) com luz de 518 nm..... 44
- FIGURA 4.28 - Diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado proposto para o RupPDIp em DMSO..... 46
- FIGURA 4.29 - Diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado proposto para o RupPDIp em RPMI..... 47

- FIGURA 4.30 - Diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado proposto para o RupPDIp em solução tampão (pH 7,4)..... 48
- FIGURA 4.31 - Complexo RupPDIp imobilizado no filme polimérico de amido de mandioca..... 50
- FIGURA 4.32 - Filme polimérico do complexo RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (A) Espectro de absorção e (B) espectro de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ e 535 nm)..... 51
- FIGURA 4.33 - Espectro de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) do filme polimérico do complexo RupPDIp ($1,0$ a $480 \mu\text{mol.L}^{-1}$)..... 51
- FIGURA 4.34 - Curva de decaimento de emissão para o complexo RupPDIp, ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no filme polimérico, $\lambda_{\text{EM}} = 448$ nm e $\lambda_{\text{EX}} = 600$ nm..... 52
- FIGURA 4.35 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do filme polimérico com o complexo RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (A) Elétrons secundários e (B) elétrons retroespalhados..... 53
- FIGURA 4.36 - Espectros de EPR experimentais e simulados da solução de tampão fosfato (pH 7,4) contendo o complexo RupPDp e o *spin trap* TMP-OH (48 mmol.L^{-1}), sistema aberto e sem saturação de O_2 . (A) RupPDIp ($150 \mu\text{mol.L}^{-1}$) irradiado com luz de 420 nm e (B) RupPDIp ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) irradiado com luz de LED de 518 nm e (C) TMP-OH no escuro..... 55
- FIGURA 4.37 - Quantificação de $^1\text{O}_2$ por espectroscopia de EPR com *spin trap*. Os espectros de EPR foram detectados após a irradiação do complexo RupPDIp (10 a $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução tampão (pH 7,4) na presença de 48 mmol.L^{-1} de TMP-OH. Em (A) demonstra a curva de calibração do padrão TEMPOL obtida através da área dos espectros simulados. Em (B) a concentração de $^1\text{O}_2$ gerado pelo complexo RupPDIp a partir da irradiação com luz de 420 nm e em (C) com luz de LED de 518 nm..... 56

- FIGURA 4.38 - Espectros de EPR com *spin trap* de soluções de TMP-OH (48 mmol.L⁻¹) em D₂O em contato com os filmes poliméricos de RupPDIp (1,0 a 100 μmol.L⁻¹) após a irradiação com luz de 420 nm por 30 min..... 58
- FIGURA 4.39 - Espectros de EPR com *spin trap* TMP-OH (48 mmol.L⁻¹) dos filmes poliméricos do RupPDIp (100 μmol.L⁻¹) com as irradiações com (A) luz de 420 nm, (B) luz de LED de 518 nm e (C) luz solar, por 30 min. Filmes sem o complexo foram utilizados como controle..... 59
- FIGURA 4.40 - Citotoxicidade no escuro do complexo RupPDIp (0,1 a 100 μmol.L⁻¹) em células B16F10 após 24h de incubação. Células sem o complexo foram mantidas como controle..... 61
- FIGURA 4.41 - Morfologia das células B16F10 incubadas com o complexo RupPDIp (0,1 a 10 μmol.L⁻¹) por 24h no escuro. Células sem o complexo foram mantidas como controle. Imagens obtidas através da técnica de contraste de fase com um microscópio invertido..... 62
- FIGURA 4.42 - Citotoxicidade das células B16F10 tratadas com luz de 420 nm (irradiância = 1,96 mW/cm²) com as doses de (A) 0,58 J/cm² (5 min), 1,17 J/cm² (10 min) e 1,76 J/cm² (15 min), avaliada após 24h do tratamento com a irradiação e (B) de 3,52 J/cm² (30 min) avaliada imediatamente após o tratamento com a irradiação. As células mantidas no escuro foram utilizadas como controle..... 63
- FIGURA 4.43 - Fotocitotoxicidade das células B16F10 incubadas com o complexo RupPDIp (0,1 a 100 μmol.L⁻¹) por 4h, seguida pelo tratamento com a irradiação de 420 nm com as doses de 0,58 J/cm² (5 min), 1,17 J/cm² (10 min) e 1,76 J/cm² (15 min), avaliada após 24h da irradiação. Células sem o complexo no escuro e irradiadas foram mantidas como controle..... 64

- FIGURA 4.44 - Dose resposta da fotocitotoxicidade em função da concentração de complexo RupPDIp (esquerda) e da dose de luz de 420 nm (direita), avaliada pelo ensaio de MTT..... 64
- FIGURA 4.45 - Fotocitotoxicidade das células B16F10 incubadas com o complexo RupPDIp (0,1 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 4h seguida pelo tratamento com a irradiação de 420 nm com a dose de 3,52 J/cm^2 (30 min), avaliada imediatamente após a irradiação. Células sem o complexo no escuro e irradiadas foram mantidas como controle..... 65
- Figura 4.46 - Imagens no microscópio invertido das células B16F10 nas placas de 96 poços na ausência e na presença do complexo RupPDIp nas concentrações de 0,5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, com irradiação com luz de 420 nm nas doses de 0,58 J/cm^2 e de 3,52 J/cm^2 , retiradas imediatamente após o tratamento com a irradiação..... 66
- FIGURA 4.47 - Citotoxicidade e fotocitotoxicidade das células B16F10 incubadas com o complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ (0,1 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 4h, no escuro e com a irradiação de 420 nm com a dose de 0,58 J/cm^2 (5 min), avaliada após 24h da irradiação..... 67
- FIGURA 4.48 - Absorção de biomoléculas e janela fototerapêutica.⁸⁶.....68
- FIGURA 4.49 - Penetração da luz de diferentes comprimentos de onda nos tecidos..... 68
- FIGURA 4.50 - Fotocitotoxicidade das células B16F10 tratadas com luz de 518 nm com as doses de 0,069 J/cm^2 (5 min), 0,20 J/cm^2 (15 min) e 0,41 J/cm^2 (30 min), avaliada após 24h do tratamento com a irradiação..... 69
- FIGURA 4.51 - Fotocitotoxicidade das células B16F10 incubadas com o complexo RupPDIp (0,1 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 4h seguida pelo tratamento com a irradiação de 518 nm com as doses 0,069 J/cm^2 (5 min), 0,20 J/cm^2 (15 min) e 0,41 J/cm^2 (30 min), avaliada após 24h da irradiação..... 70

- FIGURA 4.52 - Dose resposta da fotocitotoxicidade em função da concentração de complexo RupPDIp (esquerda) e em função da dose de luz de LED de 518 nm (direita), avaliada pelo ensaio de MTT..... 70
- FIGURA 4.53 - Citotoxicidade e fotocitotoxicidade das células B16F10 com o filme polimérico com e sem o complexo RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) com tratamento com a irradiação de 420 nm, utilizando as doses de luz de $0,58 \text{ J/cm}^2$ (5 min), $1,76 \text{ J/cm}^2$ (5 min) e $3,52 \text{ J/cm}^2$ (5 min) e mantidas no escuro, avaliada após 24h do tratamento com a irradiação..... 72
- FIGURA 4.54 - (A) Fotos que mostram a avaliação do efeito terapêutico fotodinâmico utilizando os filmes poliméricos na ausência e na presença do complexo RupPDIp com a irradiação com luz de 420 nm. (B) Volume tumoral monitorado durante o tratamento. (C) Peso tumoral avaliado após 14 dias de tratamento..... 73

LISTA DE TABELAS

TABELA 4.1 – Progressão de Franck-Condon (A_{0-0}/A_{0-1}) do ligante livre pPDIp e do complexo RupPDIp nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em solução de DMSO desaerados (N_2).....	19
TABELA 4.2 – Progressão de Franck-Condon (A_{0-0}/A_{0-1}) do complexo RupPDIp nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 7,4), desaerados (N_2) e em diferentes temperaturas (3, 25 e 50 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)...	44
TABELA 4.3 - Quantificação de $^1\text{O}_2$ gerado a partir da irradiação do complexo RupPDIp utilizando a técnica de EPR com <i>spin trap</i>	57
TABELA 4.4 - Fotossensibilizadores testados <i>in vitro</i> para terapia fotodinâmica em células de melanoma murino B16. ^{4,87-89}	71

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 4.1 - Mecanismo proposto para a produção de $^1\text{O}_2$ a partir da ativação com luz do complexo RupPDIp.....	60
ESQUEMA 4.2 - Mecanismo proposto em termos de orbitais moleculares para a produção de $^1\text{O}_2$ a partir da ativação com luz do complexo RupPDIp.....	60

RESUMO

COMPLEXO LUMINESCENTE DE Ru(II)-PERILENO: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10 *IN VITRO* E *IN VIVO*.

O melanoma cutâneo é um dos cânceres mais temidos em todo o mundo devido à resistência aos tratamentos e a elevada capacidade em desenvolver metástases. A terapia fotodinâmica (TFD), uma modalidade terapêutica minimamente invasiva, é uma estratégia promissora de tratamento para lesões malignas e não-malignas. Complexos de Ru(II) polipiridínicos são fotossensibilizadores interessantes para a TFD devido as suas propriedades espectroscópicas e anticancerígenas singulares. Este trabalho explora a extensão e implicação do meio no processo de agregação do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ (RupPDIp) onde phen = 1,10-fenantrolina e pPDIp = perileno funcionalizado com fenantrolina, e suas consequências nas propriedades fotoquímicas e fotofísicas. A excitação com luz visível leva, inicialmente, a emissão de ambos os cromóforos: $^3\text{MLCT}$ (Ru, $d\pi \rightarrow \text{phen}$, π^*) e ILCT (pPDIp, $\pi \rightarrow \pi^*$). No entanto, o meio induz ao aumento das interações intermoleculares π - π que levam a formação da fração pPDIp na forma de ânion radical pPDIp $^{\cdot-}$ em DMSO, pPDIp $^{\cdot-}$ e pPDIp $^{2-}$ em meio de cultura celular RPMI e $^3\text{pPDIp}$ em solução tampão (pH 7.4) e em filme polimérico. Assim, demonstra-se que somente a variação do solvente pode ser utilizada para sintonizar as energias dos estados excitados levando à variações sistemáticas na fotorreatividade e nas propriedades emissivas do complexo. O complexo também exibiu um perfil interessante para atividade biológica com a ativação de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) em solução tampão (pH 7,4) sob irradiação com diferentes sistemas de luz. Foi avaliado também o potencial do complexo para aplicação em terapia fotodinâmica frente as células tumorais

de melanoma murino B16F10 *in vitro*. Não foram observados efeitos citotóxicos em concentrações do complexo menores que $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ no escuro. No entanto, o complexo apresentou um efeito fotocitotóxico significativo exibindo valores de IC_{50} de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ sob irradiação com luz Azul (420 nm, dose $0,58 \text{ J.cm}^{-2}$) e de $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com LED verde (518 nm, dose $0,41 \text{ J.cm}^{-2}$). Esses resultados demonstram que o complexo RupPDIp é um candidato promissor para aplicação como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica. Com interesse no uso tópico no tratamento de câncer de pele, o complexo foi imobilizado em um filme polimérico à base de amido de mandioca. Os ensaios espectroscópicos demonstraram que o complexo imobilizado no filme manteve suas propriedades luminescentes bem como foi capaz de ativar o $^1\text{O}_2$ com a exposição a luz Azul, LED verde e na luz solar. Os ensaios biológicos nestas condições *in vitro* e *in vivo* não foram interessantes devido ao raio de ação limitado do $^1\text{O}_2$ e à lixiviação do complexo neste material.

ABSTRACT

LUMINESCENT Ru(II)-PERYLENE COMPLEX: EVALUATION OF CYTOTOXICITY AND PHOTOCYTOTOXICITY *IN VITRO* AND *IN VIVO* IN B16F10 MURINE MELANOMA CELLS.

Cutaneous melanoma is one of the most feared cancers worldwide due to resistance to treatments and the high capacity to develop metastases. Photodynamic therapy (PDT), a minimally invasive therapeutic modality, is a promising treatment strategy for malignant and non-malignant lesions. Ru (II) polypyridine complexes are interesting photosensitizers for PDT due to their unique spectroscopic and anticancer properties. This study reports the extension and implications of medium on the aggregation process of the $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ complex (RupPDIp), where phen = 1,10-phenanthroline and pPDIp = perylene pendant group functionalized with one of the coordinated phenanthroline ligands) and its consequences on photochemical and photophysics properties. Excitation with visible light leads, initially, to emission of both chromophores inside the same molecule: $^3\text{MLCT}$ ($\text{Ru}, d\pi \rightarrow \text{phen}, \pi^*$) and $^1\text{ILCT}$ ($\text{pPDIp}, \pi \rightarrow \pi^*$); however, the medium induces increased π - π intermolecular interactions that lead to generation of the pPDIp moiety in the radical anion forms pPDIp $^{\cdot-}$ in DMSO, pPDIp $^{\cdot-}$ and pPDIp $^{2-}$ in cellular culture medium RPMI, and $^3\text{pPDIp}$ in buffer solution (pH 7.4), and starch films. Thus, it is demonstrated that variation of solvent alone can be used to tune the energy of the excited state in a manner that leads to systematic variations in the photoreactivity and emissive properties of the complex. The complex also exhibited an interesting profile for biological activity with the activation of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) in buffer solution (pH 7.4) under irradiation by different light systems. The potential of the complex for application in photodynamic therapy to B16F10 murine melanoma cells *in vitro* was also evaluated. No cytotoxic effects were

observed at concentrations of the complex of less than $10 \mu\text{molL}^{-1}$ in the dark. However, the complex showed a significant photocytotoxic effect presenting IC_{50} values of $0.5 \mu\text{molL}^{-1}$ when treated with 420 nm light at a dose of 0.58 J.cm^{-2} and $1.2 \mu\text{molL}^{-1}$ when treated with 518 nm LED light at a dose of 0.11 J.cm^{-2} . These results demonstrate that RupPDIp is a promising candidate for the application of photosensitization in photodynamic therapy. In order to facilitate the application and control of RupPDIp as an antitumor agent, the complex was immobilized on a cassava starch-based polymer film. Spectroscopic assays demonstrated that the complex adhered to the π - π aggregate form when immobilized on the film, maintaining its luminescent properties and activation of $^1\text{O}_2$ with exposure to light. *In vitro* and *in vivo* biological assays did not show significant results in antitumor activity due to the $^1\text{O}_2$ limited action radius, demonstrating that the film is not the most suitable drug delivery medium.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Câncer de pele melanoma	1
1.2 - Estratégias fotoquímicas para o câncer de pele: terapia fotodinâmica. 2	
2 - OBJETIVOS	7
2.1 - Geral.....	7
2.2 - Específicos	8
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1 - Reagentes	8
3.2 - Sínteses	9
3.3 - Imobilização do complexo RupPDIp nos filmes poliméricos	10
3.4 - Equipamentos e Metodologias.....	10
3.4.1 - Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis.....	10
3.4.2 - Luminescência	11
3.4.3 - Tempo de vida de emissão.....	11
3.4.4 - Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica	11
3.4.5 - Sistemas de luz, determinação da irradiância espectral e da dose de luz	13
3.4.6 - Ensaio Biológicos.....	14
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 - Estrutura eletrônica e propriedades ópticas	17
4.1.1 - Solução de DMSO	18
4.1.2 - Meio de cultura celular RPMI	33
4.1.3 - Tampão fosfato (pH 7,4).....	40
4.1.4 - Diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado	45

4.1.5 - Imobilização do RupPDIp no filme polimérico	49
4.2 - Detecção das espécies reativas de oxigênio.....	53
4.3 - Ensaio Biológicos.....	61
4.3.1 - Avaliação da citotoxicidade e da fotocitotoxicidade do complexo RupPDIp em células B16F10.....	61
4.3.2 - Avaliação da atividade antitumoral <i>in vivo</i> do RupPDIp imobilizado no filme polimérico.....	72
5 - CONCLUSÃO	73
6 - REFERÊNCIAS.....	76

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Câncer de pele melanoma

A incidência do câncer de pele não-melanoma e melanoma vem aumentando significativamente nas últimas décadas, fazendo deste um dos grandes problemas de saúde pública mundial, com altos custos econômicos e sociais para o paciente e órgãos governamentais.¹ Segundo a Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*), estima-se que 178.560 casos de melanoma cutâneo serão diagnosticados e cerca de 9.320 mortes por melanoma ocorrerão nos EUA em 2018.² As estimativas não são diferentes no Brasil e, segundo o Instituto Nacional do câncer (INCA), em 2017 ocorreram cerca de 1.700 óbitos por câncer de pele melanoma e para o ano de 2018 é esperado a ocorrência de aproximadamente 6.260 novos casos, reforçando a magnitude do problema no país.³

O câncer de pele é classificado pelo tipo de célula que o forma, apresentando duas classes principais: o câncer não-melanoma, que inclui o carcinoma basocelular e o espinocelular, e o câncer melanoma maligno cutâneo, que se desenvolve nos melanócitos, que são células produtoras de melanina (pigmentos que dão cor à pele). A principal função do pigmento de melanina é atuar como um protetor celular pela absorção de luz ultravioleta . Devido a uma variedade de fatores ambientais e genéticos, como por exemplo a exposição intermitente à radiação ultravioleta, os melanócitos podem se transformar em melanoma cancerígeno.⁴

A incidência de metástase no câncer não-melanoma é rara para o carcinoma espinocelular e nula para o carcinoma basocelular.⁵ O melanoma cutâneo é considerado o mais grave e de maior temeridade dos cânceres no mundo.⁶ É um câncer invasivo e agressivo com alto índice de mortalidade devido à sua elevada probabilidade de disseminar metástases para outros órgãos.⁶⁻⁸

As opções de tratamento para o câncer de pele melanoma baseiam-se principalmente no estágio da doença e no local do tumor. Em estágios iniciais, o tumor pode ser removido por cirurgia com uma taxa de sobrevivência de 99%. Em estágios mais avançados, uma vez que já se disseminaram para outras áreas do corpo, a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são os métodos convencionais de tratamento, os quais causam muita dor e efeitos colaterais secundários. Além disso, o câncer de melanoma é na maioria das vezes resistente a estas formas tradicionais de terapia e por isso novas estratégias terapêuticas estão sendo propostas e aplicadas, incluindo a imunoterapia, a terapia de genes e a terapia fotodinâmica (TFD).⁹⁻

15

1.2 - Estratégias fotoquímicas para o câncer de pele: terapia fotodinâmica

Diversos relatos sobre o uso da TFD em tratamentos clínicos para câncer de pele não-melanoma demonstraram uma resposta completa em alta porcentagem de pacientes com baixa recorrência.^{16,17} Por exemplo, no câncer de pele não-melanoma a taxa de cura usando TFD é comparável à dos tratamentos tradicionais.^{18,19} A TFD também vem sendo altamente recomendada para o tratamento de carcinoma de células basais superficiais e nodulares, evitando a excisão cirúrgica e enxertos de pele em casos onde as lesões são extensas.^{20,21}

A TFD consiste na aplicação tópica ou sistêmica de um agente fotossensibilizador (PS), que, quando ativado por uma fonte de luz com comprimento de onda específico, desencadeia reações fotoquímicas que levam à destruição seletiva do tecido através da formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) que provocam a morte celular.^{22,23}

O mecanismo de ação da TFD está representado graficamente na Figura 1.1. O PS no estado fundamental absorve a energia da luz incidente

(fótons), passando a ocupar o estado excitado singlete (^1PS). O ^1PS pode sofrer o processo não radiativo de cruzamento intersistemas (ISC) e ocupar o estado excitado tripleto do PS (^3PS). O ^3PS pode sofrer dois tipos de reações. Em primeiro lugar, no mecanismo do Tipo I, ele pode transferir um elétron para o oxigênio molecular, gerando as EROs como o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Por outro lado, no mecanismo do Tipo II, o ^3PS transfere sua energia para o oxigênio molecular gerando o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). As EROs são agentes oxidantes que reagem diretamente com diversos componentes celulares como, por exemplo, DNA, RNA, proteínas, lipídios e mitocôndrias, desencadeando efeito citotóxico e levando à morte celular.^{24,25}

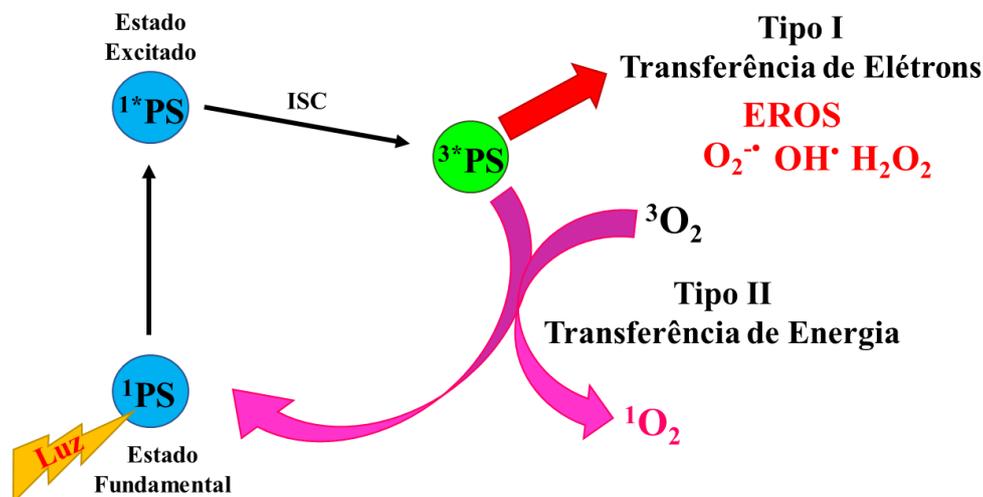


FIGURA 1.1 - Ilustração gráfica do mecanismo de ação da TFD.

A TFD permite a destruição seletiva dos tumores devido a capacidade do PS de se direcionar e acumular no tecido alvo e pela habilidade de ativá-lo por iluminação específica, fazendo com que as espécies citotóxicas sejam geradas somente na região onde a luz é aplicada, possibilitando um

controle espacial e temporal do tratamento, sem causar danos aos tecidos adjacentes saudáveis.^{26,27}

Em geral, um fotossensibilizador ideal deve ser preferencialmente localizado nos tecidos tumorais e ser excretado rapidamente do organismo. Também deve apresentar absorvidade molar alta e de preferência na região da janela terapêutica, compreendida entre 600 – 700 nm, onde a penetração da luz no tecido é maior, além de rendimento quântico de emissão significativo bem como tempo de vida de emissão tripleto longo, para que possa interagir o maior tempo possível com o oxigênio ou com outros substratos e gerar uma quantidade significativa de EROs.²⁴

O desenvolvimento de estratégias fotoquímicas para gerar e detectar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) atrai o interesse da comunidade científica devido a possibilidade de aplicação em diversas áreas da ciência, particularmente no tratamento do câncer. Por conseguinte, muitos fotossensibilizadores para administração sistêmica ou tópica vêm sendo investigados, muito deles já aprovados e disponíveis para o uso clínico, como por exemplo o Photofrin[®] (porfirina), o 5-ALA (ácido 5-aminolevulínico, precursor de porfirina) e o Foscam[®], amplamente utilizados para tratar diversos tipos de câncer.^{28,29}

Complexos metálicos de Pd(II), Cu(II), Mg(II) e Zn(II) contendo porfirazinas e ftalocianinas funcionalizadas foram investigados e alguns apresentaram propriedades anticancerígenas e antimetastáticas promissoras e estão sendo avaliados em ensaios clínicos.^{30,31} Recentemente a atenção foi voltada para fotossensibilizadores de Ru(II), principalmente porque alguns deles mostraram perfis farmacológicos favoráveis *in vitro* e *in vivo* em diferentes modelos, incluindo as linhagens celulares resistentes a platina.³²⁻³⁵ Por exemplo, a meso-4-tetrapiridilporfirina contendo quatro porções de

Ru(II)-areno pendentos produziu resultados interessantes. Após irradiação com luz de 650 nm com uma dose de 5 J.cm^{-2} , o complexo em uma concentração de 10 mmol.L^{-1} induziu a 60-80% de mortalidade em células cancerígenas Me300 de melanoma humano.^{36,37}

Complexo polipiridínicos de Ru(II)-porfirinas contendo diferentes ligantes pontes também demonstraram atividade anticancerígena eficaz no escuro e sob irradiação com luz, com IC_{50} de 118 e $175 \mu\text{M}$ em células HeLa no escuro e LD_{50} de $1 \mu\text{M}$ após a irradiação com luz amarela com doses de 2, 6,5 e $11,5 \text{ J.cm}^{-2}$.³⁸

Complexos de Ru(II) polipiridínicos são fotossensibilizadores particularmente interessantes para a TFD devido às suas propriedades espectroscópicas únicas e atividade antitumoral. A excitação com luz visível leva a 100% de população do estado excitado emissivo tripleto. Este estado excitado é de natureza de transferência de carga metal-para-ligante ($^3\text{MLCT}$, Ru, $d\pi \rightarrow \pi^*$), apresentando tempo de vida de emissão longo, o que possibilita processos de transferência de energia e de elétrons. Estes complexos podem interagir com o DNA formando aductos e podendo levar à fotoclivagem, destruindo células cancerígenas.³⁹

Apesar desses resultados encorajadores, a eficácia de qualquer aplicação do $^1\text{O}_2$ depende do acúmulo do fotossensibilizador no alvo biológico ao longo do tempo, bem como da quantidade de $^1\text{O}_2$ gerado. Este é o maior desafio a ser superado e depende das propriedades fotofísicas do primeiro estado excitado tripleto do fotossensibilizador.

Além disso, é importante assegurar que uma dose alta de $^1\text{O}_2$ seja liberada nos tecidos alvos quando a aplicação terapêutica direta é realizada. A este respeito, preparamos recentemente um complexo de Ru(II) contendo dois cromóforos: uma unidade composta pela $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$ (phen = 1,10-fenantrolina) e a outra composta pelo perileno derivatizado com a fenantrolina

(1,10-fenantrolina- perileno diimida- 1,10-fenantrolina) (pPDIp), o $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})](\text{PF}_6)_2$ (RupPDIp), Figura 1.2, que demonstrou propriedades interessantes para aplicações práticas.

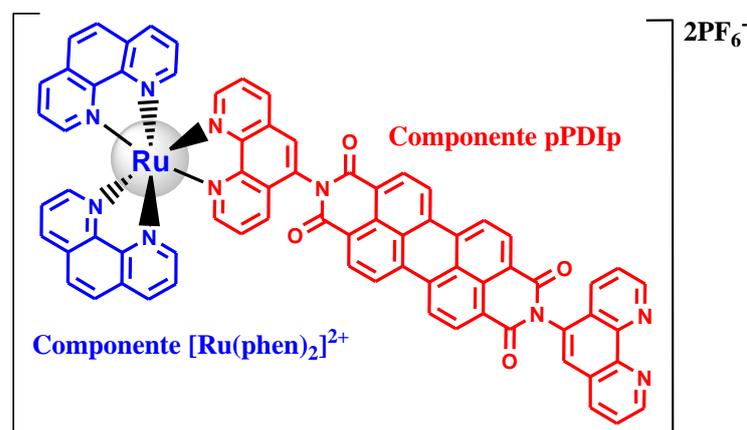


FIGURA 1.2 - Figura ilustrativa do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})](\text{PF}_6)_2$.

Compostos de perileno diimidas são caracterizados por uma absorção e fluorescência intensa na região do visível, com tempo de vida de emissão curtos, enquanto que complexos polipiridínicos de Ru(II) exibem absorção intensa e larga no visível e uma emissão com tempo de vida longo proveniente do estado $^3\text{MLCT}$. A combinação destes cromóforos em díades resultou em um sistema molecular com propriedades ópticas e físico-químicas interessantes para aplicação na geração de $^1\text{O}_2$ no estado excitado. As principais características são a absorção intensa, a emissão na região visível próxima ao infravermelho e o tempo de vida de emissão longo ($1,8 \mu\text{s}$) originado dos estados excitados tripleto do PDI. Através da excitação da componente metálica do complexo (D) e/ou da componente pPDIp na região visível, os processos de desativação sequenciais levam à geração do componente perileno diimida (A) no estado excitado tripleto ($^3\text{pPDIp}$), o qual leva à formação do $^1\text{O}_2$ com rendimento quântico $\phi_\Delta = 0,57$.⁴⁰ Esses resultados

nos motivaram a investigar a atividade no escuro e com luz do complexo RupPDIp em células de melanoma *in vitro*.

Um problema encontrado em muitos derivados de perileno diimida é a sua baixa solubilidade e a tendência à agregação em solução aquosa de tampão (pH 7,4), resultando em uma diminuição ou perda total da sua atividade fotoquímica. Esse comportamento pode ser minimizado pela adição de substituintes em suas posições imida e bay.⁴¹⁻⁴⁵ De fato, seguindo esta abordagem, muitos derivados de perileno diimidados solúveis em água foram preparados e alguns deles fotossensibilizaram a formação de oxigênio singlete e a fotocitotoxicidade em células cancerígenas.^{46,47,48} No caso do complexo RupPDIp preparado em nosso laboratório, a solubilidade em solventes orgânicos e em água é conferida ao derivado de perileno insolúvel pela fração $\{\text{Ru}(\text{phen})_3\}^{2+}$ solúvel em água.

Neste trabalho investigou-se o comportamento fotoquímico e fotofísico do complexo RupPDIp em solução de tampão (pH 7,4), meio de cultura celular e em DMSO a fim de se certificar se as propriedades espectroscópicas são compatíveis com o meio fisiológico. Investigou-se também a atividade citotóxica e fotocitotóxica do complexo *in vitro* frente a células de melanoma murino B16F10. Considerando a aplicação tópica o complexo foi imobilizado em um filme polimérico a base de amido de mandioca, como uma proposta de formulação farmacêutica para possível aplicação em terapia fotodinâmica.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Geral

Obter um fotossensibilizador polipiridínico de Ru(II)-perileno diimida que seja um candidato potencial para atuar em terapia fotodinâmica e em particular no tratamento de câncer de pele melanoma.

2.2 - Específicos

- Avaliar as propriedades espectroscópicas, fotoquímicas e fotofísicas do complexo [Ru(phen)₂(pPDIp)](PF₆)₂ em solução tampão (pH 7,4), em meio de cultura celular RPMI e em DMSO.
- Investigar a capacidade do complexo em atuar como fotossensibilizador para a ativação do oxigênio singleto (¹O₂) e/ou das suas espécies reativas (O₂^{•-}, OH^{•-}) pela irradiação com luz azul (420 nm, I = 1,96 mW.cm⁻²) e LED verde (518 nm, I = 0,23 mW.cm⁻²).
- Quantificar as EROs geradas pela fotossensibilização do complexo pela técnica espectroscópica de ressonância paramagnética de elétrons usando a armadilha de spin TMP-OH.
- Imobilizar o complexo em filmes poliméricos. Caracterizar os filmes utilizando as técnicas espectroscópicas de UV-vis, luminescência e microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Investigar a capacidade do complexo no filme polimérico em atuar como fotossensibilizador para a ativação do ¹O₂ e/ou das suas espécies reativas (O₂^{•-}, OH^{•-}) pela irradiação com luz azul (420 nm) e LED verde (518 nm).
- Investigar *in vitro* e *in vivo* a citotoxicidade no escuro e a fotocitotoxicidade do complexo RupPDIp em meio fluido e imobilizado no filme polimérico em células de melanoma murino da linhagem celular B16F10.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Reagentes

Os solventes orgânicos utilizados foram de grau de pureza HPLC e as soluções aquosas foram preparadas com água destilada. Ácido fosfórico

(H_3PO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) e fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4), todos de procedência Sigma-Aldrich, foram utilizados no preparo da solução tampão (pH 7,4).

Nos ensaios de EPR foi utilizado o sequestrador de elétrons 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol (TMP-OH) (Sigma-Aldrich), os padrões 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine *N*-oxyl (TEMPO) (Sigma-Aldrich) e cristais de MgO dopados com Cr(III) para as quantificações do oxigênio singlete e/ou das espécies reativas do oxigênio.

Para a síntese dos filmes poliméricos utilizou-se amido de mandioca (Amilogil 1500, gentilmente fornecido pela Cargill Agrícola S.A.) e glicerol ($\geq 99,5\%$) de procedência Sigma-Aldrich.

Nos ensaios biológicos para o cultivo celular utilizou-se meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com HEPES [Ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfônico)] (Sigma-Aldrich), bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), gentamicina (Hipolabor) e de soro fetal bovino (SFB, Life Technologies, tampão fosfato-salino (PBS), corante Trypan Blue (Life Technologies).

Para o ensaio de viabilidade celular utilizou-se os reagentes 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Molecular probes, Thermo Fisher Scientific), dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácido clorídrico (HCl).

3.2 - Sínteses

O ligante livre pPDIp, o complexo precursor $[\text{RuCl}(\text{phen})_2]$ e o complexo RupPDIp foram preparados pelo procedimento descrito pelo nosso grupo de pesquisa.⁴⁰

3.3 - Imobilização do complexo RupPDIp nos filmes poliméricos

Os filmes poliméricos foram preparados de acordo com o procedimento descrito na literatura.⁴⁹ Para a preparação utilizou-se 75 mg de glicerol (plastificante), 470 mg do polímero natural e 7,0 mL de água destilada. Essa solução foi aquecida em um banho termostatizado entre 75 - 80 °C, sob agitação constante até a formação de um gel incolor, evidenciando a gelatinização. Após a mistura atingir temperatura ambiente, 7 mL de soluções do complexo RupPDIp em água/etanol (H₂O/EtOH) (30% EtOH) em diferentes concentrações (100 a 1,0 µmol.L⁻¹) foram adicionadas mantendo-se sob agitação por 5 minutos. As soluções foram transferidas para placas de Petri de acrílico e secas em estufa (37 ± 2 °C) por aproximadamente 24 horas. Após a secagem os filmes foram armazenados em frascos fechados, com 75% de umidade relativa (solução saturada de cloreto de sódio), à temperatura ambiente e protegidos da luz.

3.4 - Equipamentos e Metodologias

3.4.1 - Espectroscopia de absorção eletrônica UV-Vis

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos na região do UV-Vis utilizando-se um espectrofotômetro Agilent 8453A. Utilizaram-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 10,0 mm e 3,5 mL de capacidade. Os espectros eletrônicos dos filmes poliméricos foram obtidos imobilizando-os em uma cubeta de quartzo.

3.4.2 - Luminescência

Os espectros de emissão foram obtidos no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150W e uma fotomultiplicadora do tipo R928).

3.4.3 - Tempo de vida de emissão

Os experimentos de tempo de vida de emissão foram realizados no laboratório de Fotobiofísica da FFCLRP – USP junto ao grupo do Prof. Dr. Amando Siuti Ito. A fonte de excitação é um laser pulsado Tsunami 3950 (Spectra Physics) de titânio-safira (Ti:sapphire) bombeado por laser de estado sólido Millennia Xs (Spectra Physics), de Nd:YVO₄, que tem saída com potência máxima de 10W no comprimento de onda 330 nm. O método de contagem de fótons únicos correlacionados no tempo (TCSPC) foi usado para determinar o tempo de vida de emissão. O software F900 foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais de decaimento a funções multiexponenciais, baseado no método de ajustes de funções não lineares por mínimos quadrados. A qualidade do ajuste realizado pelo software foi avaliado pelo parâmetro estatístico χ^2 (chisquare).

3.4.4 - Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

Os experimentos de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR, do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*) foram realizados junto ao grupo do Prof. Dr. Otaciro Rangel Nascimento no Instituto de Física São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP) e ao grupo do Prof. Dr. Benedito dos Santos Lima Neto no Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (IQSC/USP). No IFSC/USP, um espectrômetro Varian E109 operando em banda X (9.5 GHz) à temperatura ambiente foi utilizado.

As concentrações das espécies radicalares e o valor de g do ligante livre pPDIp e do complexo RupPDIp no escuro e após as fotólises foram determinadas utilizando um padrão de MgO dopado com Cr(III). Soluções em DMSO e em RPMI nas concentrações de 150, 100 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, desaeradas com nitrogênio ultra puro (N_2), foram transferidas para uma cubeta de quartzo contendo o padrão de Cr(III) fixado no exterior da mesma durante todas as medidas. Cada solução foi irradiada com luz azul (420 nm) e com o LED verde (518 nm) durante determinados intervalos de tempo, através de uma janela na cavidade de micro-ondas do equipamento de EPR, permitindo que a cubeta fosse mantida na mesma posição para medida dos espectros de EPR, e dessa forma, garantindo sempre a medida da mesma região da cubeta e a da mesma quantidade de amostra para comparação entre diferentes tempos de irradiação. Após a aquisição dos espectros utilizou-se a relação entre as áreas das amostras com a área do sinal do padrão para calcular o número de spins e conseqüentemente o número de moléculas com elétrons desemparelhados. As condições experimentais foram: 0,25 G de modulação, 20 mW de potência, constante de tempo de 0,0165 s, 1 scan. Condições diferentes foram utilizadas de acordo com novas espécies detectadas ao longo da reação fotoquímica. Por exemplo, para detecção apropriada do espectro da amostra em DMSO após certo tempo de irradiação em que um desdobramento hiperfino diferente foi observado, as seguintes condições foram utilizadas: 0,125 G de modulação, 0,5 mW de potência, 10×10^4 de ganho, constante de tempo de 0,016 s, 25 scans.

O composto 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TMP-OH, 48 mmol.L^{-1}) foi utilizado como armadilha de spin (do inglês *spin trap*) para verificar a formação das EROs pelo RupPDIp (10 – 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução tampão (pH 7,4) e em DMSO, sem saturação de O_2 . As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo no escuro e após as irradiações com luz *in situ* de 420 nm e de 518 nm, em determinados intervalos de tempo.

Soluções de TMP-OH no escuro e irradiadas foram mantidas como controle. Os espectros obtidos experimentalmente foram simulados para obtenção dos parâmetros de EPR como largura de linha, área do sinal de absorção, valor das constantes hiperfinas e valor de g . A concentração de $^1\text{O}_2$ gerado pelo RupPDIp em solução tampão (pH 7,4) foi determinada através de uma curva de calibração utilizando o 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine *N*-oxyl (TEMPOL) como padrão. Soluções de TEMPOL em tampão fosfato (pH 7,4) nas concentrações de 10, 5, 2, 0,5 e 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foram medidas e a curva de calibração foi obtida a partir das áreas dos espectros simulados. As condições experimentais foram: 0,25 G de modulação, 20 mW de potência, constante de tempo de 0,128 s, 16 scans.

Para a detecção de EROs produzidas pelo filme polimérico de RupPDIp, os filmes (1 cm^2) foram colocados em contato com uma solução do TMP-OH (70 mmol.L^{-1}) em tampão (pH 7,4). Alíquotas da solução no escuro e irradiada foram medidas. As condições experimentais foram: potência de 20 mW, frequência de 9,685 GHz, modulação 100 kHz, constante de tempo de 21 ms e tempo de scan de 84 s.

3.4.5 - Sistemas de luz, determinação da irradiância espectral e da dose de luz

As fotólises das soluções e os estudos biológicos de terapia fotodinâmica foram realizados utilizando um reator fotoquímico construído em nosso laboratório, composto por três lâmpadas Rayonet (RMR 4200 A) no comprimento de onda específico de 420 nm (Fig. 3.1A) (luz azul) e um sistema de LED comercial contendo 18 LEDs SMD 5050 no comprimento de onda de 518 nm, conectadas em circuito paralelo (Fig. 3.1.B) (LED verde). As medidas de irradiância espectral dos sistemas foram realizadas no Laboratório de Fotobiofísica do DF –FFCLRP – USP junto ao grupo do Prof.

Dr. Luciano Bachmann, utilizando um espectroradiômetro USB2000+ (OceanOptics) com 0,5 m de fibra óptica, acoplado a um sensor de correção cossenoidal e calibrado na fábrica para a faixa 250-850 nm. As doses de luz utilizadas na TFD foram determinadas em $J.cm^{-2}$ como resultado da multiplicação: irradiância (mW/cm^2) x tempo de irradiação (segundos).

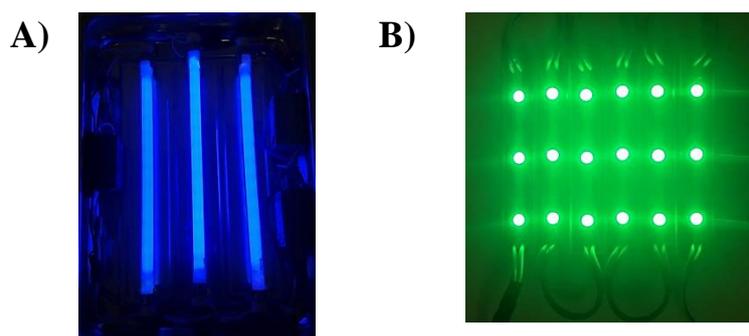


FIGURA 3.1 - Sistemas de luz utilizados neste estudo, (A) reator fotoquímico com lâmpadas Rayonet (RMR 4200 A) no comprimento de onda de 420 nm e (B) sistema com 18 LEDs SMD 5050 no comprimento de onda de 518 nm.

3.4.6 - Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina (EPM), sob orientação da Profa. Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues e auxílio de sua aluna Ms. Carolina de Amat Herbozo.

3.4.6.1 - Linhagem Celular

A linhagem celular utilizada foi a de melanoma murino B16F10. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10 $mmol.L^{-1}$ de ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfônico) (HEPES, Sigma-Aldrich), 24 $mmol.L^{-1}$ de bicarbonato de sódio (Sigma-

Aldrich), 40 mg/mL de gentamicina (Hipolabor) e 10% de soro fetal bovino (SFB, Life Technologies). As células foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂. Para manipulação das células, estas foram previamente lavadas com PBS (150 mmol.L⁻¹ NaCl, 10,5 mmol.L⁻¹ Na₂HPO₄, 2 mmol.L⁻¹ NaH₂PO₄, pH 7,4) e foi utilizado PBS/EDTA (PBS contendo 0,02% de EDTA) para desaderir as células do frasco de cultura, sendo o EDTA inativado por adição de meio (PBS) contendo soro (SFB). As células foram coletadas, centrifugadas a 2000 rpm por 5 min e ressuspensas em meio (PBS). A contagem de células viáveis foi realizada em câmara de Neubauer na presença do corante Trypan Blue (Life Technologies).

3.4.6.2 - Avaliação da citotoxicidade e da fotocitotoxicidade pela técnica do MTT

A citotoxicidade e fotocitotoxicidade do complexo RupPDIp sobre as células B16F10 foram avaliadas através da técnica colorimétrica de MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), que se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT através da enzima mitocondrial desidrogenase, provocando a clivagem do anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela para um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Estes cristais podem ser solubilizados para gerar uma solução cuja intensidade de cor é medida por absorbância e que é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. A leitura colorimétrica é feita em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.³³

As células B16F10 foram plaqueadas em placa de 96 poços (2,0 x 10³ células/poço) e incubadas por 24 h para permitir a adesão. O meio foi

removido e 200 μL do complexo RupPDIp foi adicionado nos poços nas concentrações de 100 a 0,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (diluídos em 0,033% de DMSO e meio RPMI), em quadruplicata e incubadas por 24h e 4h. As células foram mantidas no escuro (controle) e tratadas com a luz azul (420 nm) e com o LED verde (518 nm) em diferentes doses e intervalos de tempo. A solução de MTT (100 μL) em concentração final de 0,5 mg/mL foi adicionada nas placas logo em seguida as irradiações para evidenciar o efeito imediato do tratamento e em placas mantidas *overnight* na estufa após o tratamento. Após a adição do MTT as placas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO_2 por 4h. Os cristais de formazan foram solubilizados adicionando-se 100 μL de uma solução de SDS a 10% em HCl 0,01 M. Após incubação por 16h, a absorbância foi lida em dispositivo SpectramaxM2e (Molecular Devices) a 570 nm com filtro de referência de 650 nm.

No ensaio de citotoxicidade com os filmes, os filmes com o complexo RupPDIp (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) imobilizado e somente o filme de amido foram posicionados na superfície das placas de 96 poços, as quais foram irradiadas com luz de 420 nm em determinadas doses de luz por períodos de tempo. Uma placa com os filmes foi mantida no escuro como controle.

3.4.6.3 - Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do RupPDIp imobilizado no filme polimérico

Os camundongos C57BL/6 foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos em micro-isoladores com água, ração e serragem estéreis, em biotério com temperatura (22 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas. Os experimentos utilizando animais foram realizados de acordo com as regras do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIFESP.

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 6 semanas de vida. O dorso dos camundongos foi depilado para o tratamento. Utilizou-se o modelo de administração subcutânea no qual uma suspensão de células tumorais B16F10 contendo 10^5 de células viáveis em 0,1 mL de meio RPMI sem soro foi inoculada no dorso de cada camundongo. Os camundongos foram distribuídos em 2 grupos (controle e tratamento), cada um com 3 animais. Os camundongos foram tratados diariamente e os filmes sem o complexo (controle) e contendo RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$), dispostos sob o dorso dos animais. A área dos filmes utilizado foi de 5 cm^2 . O tratamento teve início no dia seguinte à inoculação, utilizando a luz de 420 nm, com a dose de luz diária de $3,52 \text{ J.cm}^{-2}$ (30 min) com a fonte de luz posicionada a 16 cm dos camundongos. O volume tumoral foi estimado diariamente a partir do sétimo dia após a inoculação, medindo-se o diâmetro menor (DM) e o diâmetro maior (DM2) com auxílio de um paquímetro. O volume tumoral foi calculado utilizando a fórmula:

$$V = (0,52) \times \text{DM}^2 \times \text{DM}$$

Após atingir o volume máximo de 2.000 mm^3 , os camundongos foram eutanasiados com 300 mg/Kg e 30 mg/Kg de ketamina/xilazina, como descrito nas Diretrizes de Eutanásia publicadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), pag 31. O volume e peso tumoral foram avaliados.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Estrutura eletrônica e propriedades ópticas

Um potencial candidato a fototerapêutico deve apresentar propriedades biológicas e espectroscópicas compatíveis com o meio fisiológico. Para determinar se o complexo RupPDIp possui propriedades

favoráveis à fotossensibilização, seu comportamento fotoquímico e fotofísico foi avaliado em DMSO, tampão fosfato (pH 7,4) e em meio de cultura celular RPMI.

4.1.1 - Solução de DMSO

A Figura 4.1 mostra os espectros de absorção do ligante livre pPDIp, do complexo RupPDIp e do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerada e no escuro.

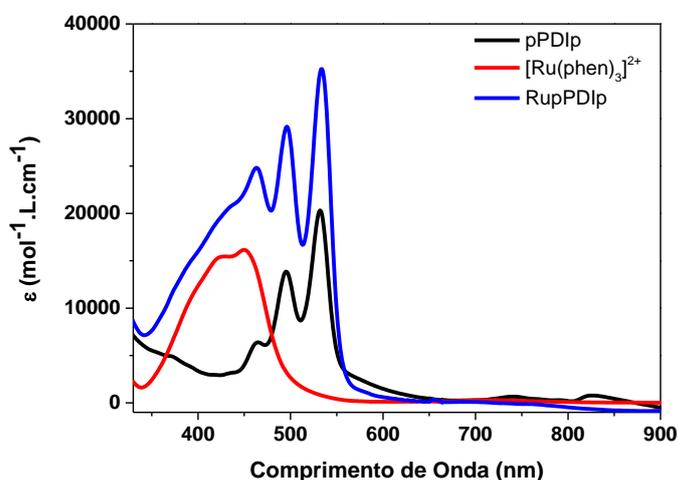


FIGURA 4.1 - Espectros de absorção do ligante livre pPDIp, dos complexos RupPDIp e $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerados (N_2).

O espectro de absorção do complexo RupPDIp em DMSO é formado pela sobreposição das absorções das duas componentes geradoras do complexo: a absorção do ligante livre pPDIp e as absorções da componente $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Esta somatória leva a um espectro de absorção com um ombro largo com máximo ao redor de 440 nm ($\epsilon = 21.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) atribuído às transições de transferência de carga metal-para-ligante (MLCT $d\pi, \text{Ru(II)}$)

$\rightarrow\pi^*,\text{phen}$ e $d\pi,\text{Ru(II)} \rightarrow \pi^*,\text{pPDIp}$) sobreposta a uma absorção larga apresentando três picos bem definidos atribuídos às transições de transferência de carga interna do ligante perileno diimida (ILCT $\pi \rightarrow \pi^*,\text{pPDIp}$). As transições vibracionais da componente pPDIp aparecem em 465 nm ($\epsilon = 25.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) referente à vibração 0-2, em 495 nm ($\epsilon = 29.000 \text{ L.mol}^{-1}$) atribuída a 0-1 e em 535 nm ($\epsilon = 35.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) atribuída a vibração 0-0.

O aumento da concentração do complexo RupPDIp leva a alterações nas intensidades das transições 0-0 em 534 nm e 0-1 em 495 da componente do pPDIp. A proporção da absorbância das transições 0-0 e 0-1 (A_{0-0}/A_{0-1}) pode ser utilizada como um indicador de agregação de derivados de PDI em solução.⁵⁰ As moléculas de PDI monoméricas exibem a progressão de Franck-Condon de aproximadamente 1,6 e valores $<1,0$ são indícios de processos de agregação.⁵¹ As análises das relações A_{0-0}/A_{0-1} para o pPDIp e para o RupPDIp estão descritas na Tabela 4.1. No ligante livre a progressão é mantida em aproximadamente 1,4 independente da concentração, indicando que o ligante está na forma monomérica. Para o complexo a progressão é mantida acima de 1,0 na faixa de concentração analisada e, portanto, o complexo se encontra na forma monomérica.

TABELA 4.1 - Progressão de Franck-Condon (A_{0-0}/A_{0-1}) do ligante livre pPDIp e do complexo RupPDIp nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em solução DMSO desaerados (N_2).

Composto	Concentração		
	25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
pPDIp	1,5	1,4	1,4
RupPDIp	1,3	1,2	1,0

O espectro do ligante pPDIp apresenta as bandas estruturadas e intensas típicas de derivado de PDI, com a transição 0-0 em 532 nm de maior intensidade, seguida pelas transições 0-1 em 495 nm e 0-2 em 465 nm.⁵⁰ Estes dados mostram que a ligação do perileno diimida ao complexo não alterou os máximos de absorção deste ligante indicando um acoplamento fraco entre as duas componentes moleculares neste solvente. Além dessas bandas, o pPDIp apresentou bandas de absorção de baixa intensidade em 740 e 825 nm, essas absorções são características do ânion radicalar do perileno diimida (PDI^{•-}).⁵²⁻⁵⁵

Para confirmar a presença do ânion radicalar no complexo foram realizadas medidas de EPR para o ligante livre pPDIp e para o complexo RupPDIp em solução de DMSO. Conforme mostrado na Figura 4.2, ambos exibiram um sinal de EPR com $g = 2,0035$, similar ao ânion radical PDI^{•-} gerado quimicamente pela adição de ditonito de sódio a uma solução de perileno diimida.⁵²⁻⁵⁵ A formação espontânea do ânion radicalar pPDIp^{•-} no complexo sem a adição de um agente redutor mostra que este é um processo espontâneo proveniente do processo de síntese e demonstra a forte capacidade π -receptora do ligante gerado no solvente dimetilformamida. Isso pode ser atribuído à funcionalização das posições axiais do perileno diimida com duas fenantrolinas, as quais permitem a deslocalização da densidade eletrônica no PDI e limitam sua mobilidade nos anéis aromáticos do PDI, atuando como uma “jaula” para os elétrons. Em solventes doadores de elétrons como o DMSO, a redução espontânea do pPDIp é favorecida provavelmente devido as fortes interações entre os solventes e os hidrogênios dos anéis aromáticos do pPDIp. Comportamento semelhante foi observado recentemente para derivados modificados de PDI e naftaleno diimida (NDI).^{56,57,58}

A concentração do ânion radical pPDIp^{•-} foi determinada pela integração dos sinais de EPR utilizando o padrão de Cr(III) como referência para calibrar o sinal. A calibração indicou que no ligante livre a quantidade de

ânion radicalar corresponde a 30% da concentração da amostra analisada. A quantidade de $\text{pPDIp}^{\bullet-}$ é drasticamente reduzida com a coordenação a componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$, de modo que aproximadamente 4% da concentração total do complexo está na forma radicalar.

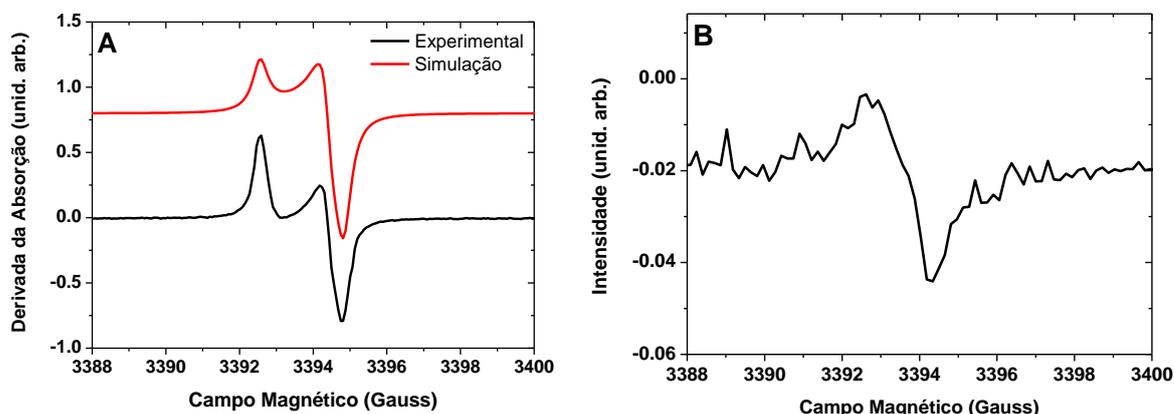


FIGURA 4.2 - Espectros de EPR experimentais e simulados do (A) ligante livre pPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (B) do complexo RupDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerado (N_2), a temperatura ambiente.

Para compreender melhor o comportamento fotofísico do RupDIp, do ligante livre pPDIp e do $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ foram realizadas medidas de emissão no estado estacionário em solução desaerada (N_2). A emissão do ligante livre em solução desaerada (Figura 4.3A) corresponde à imagem especular do espectro de absorção, sendo caracterizada como a emissão da fluorescência do monômero com máximo em 550 nm, seguido por 585 nm e 645 nm, referentes às transições vibracionais 0-0, 0-1 e 0-2 respectivamente. O complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ (Figura 4.3B) possui uma emissão fosforescente intensa com máximo em ~ 600 nm proveniente da transição $^3\text{MLCT}$ ($\text{Ru} \rightarrow \text{phen}$).

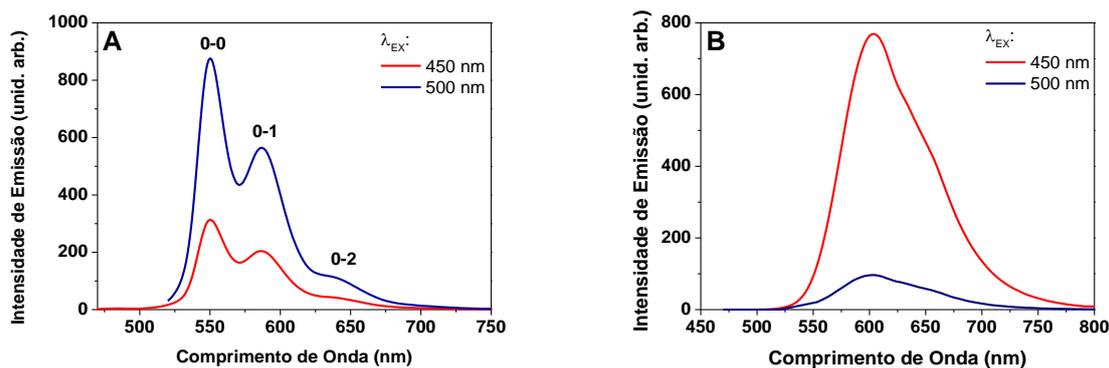


FIGURA 4.3 - Espectros de emissão do (A) ligante livre pPDIp e (B) do complexo $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerada (N_2), nos comprimentos de onda de excitação (λ_{EX}) de 450 nm e 500 nm.

A Figura 4.4 mostra a dependência da concentração e do comprimento de onda de excitação nos espectros de emissão do complexo. Quando excitado em 450 nm o espectro de emissão do complexo exibe a fosforescência proveniente da transição $^3\text{MLCT}$ correspondente à componente $[\text{Ru}(\text{phen})_2]^{2+}$, com máximo em 600 nm e um ombro em ~ 555 nm (Figura 4.4A). Quando excitado em 535 nm a emissão da fluorescência da componente pPDIp é mantida, com a banda referente à transição 0-0 em 550 nm seguida por 585 nm (0-1) e 645 nm (0-2), porém, a intensidade da emissão é bastante reduzida com o aumento da concentração (Figura 4.4B). Isso indica a presença de um caminho de decaimento não radiativo competitivo e que provavelmente envolve um estado excitado com característica de transferência de carga. Os picos das emissões das transições vibracionais 0-0 e 0-1 exibem intensidades similares, indicando interações intermoleculares entre os cromóforos de pPDIp e confirmando a presença de um processo de desativação que compete com a fluorescência do pPDIp. Como os espectros de absorção do complexo nestas concentrações não demonstram agregação no estado fundamental, a alteração na forma da banda de emissão da componente

pPDIp revelou interações das moléculas de pPDIp nos estados excitados, ou seja, resultantes de moléculas que se encontraram durante seus tempos de vida nos estados excitados. Conseqüentemente, atribuímos a banda de emissão resultante da excitação em 535 nm como a emissão de duas moléculas em um dímero do estado excitado, isto é, um excímero dinâmico que é produzido pela interação de uma molécula de pPDIp no estado fundamental interagindo com uma molécula no estado excitado ($\{^*pPDIp-pPDIp\}$). O aspecto do espectro de uma emissão quase estruturada na porção do pPDIp semelhante à do ligante livre monomérico demonstra que a interação eletrônica no excímero dinâmico gerado é relativamente fraca. Alterações semelhantes nos espectros de emissão foram associadas à formação de excímeros em outras moléculas de PDI.⁵⁹⁻⁶²

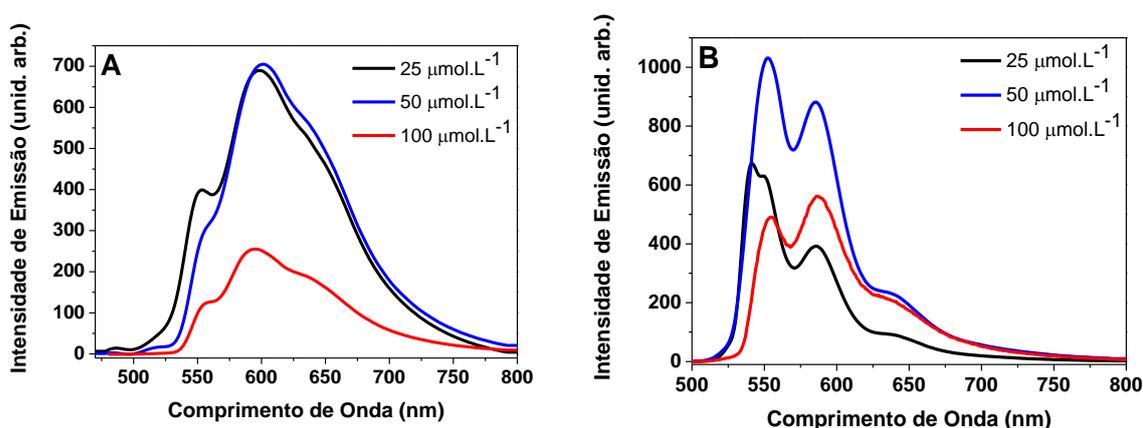


FIGURA 4.4 - Espectros de emissão do complexo RupPDIp (25, 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerados (N_2) nos comprimentos de onda de excitação de (A) $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ e (B) $\lambda_{\text{EX}} = 500 \text{ nm}$.

O tempo de vida de emissão do complexo foi determinado por um equipamento de fluorescência resolvida no tempo por contagem de fótons, com $\lambda_{\text{EX}} = 448 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EM}} = 600 \text{ nm}$. A emissão apresentou um decaimento com um ajuste triexponencial, indicando a presença de três estados emissivos,

com os tempos de 0,99 ns (12,3% da emissão total), 4,5 ns (12,6%) e 392,7 ns (75,1%), $\chi^2 = 1,1$ (Figura 4.5), com a emissão da $^3\text{MLCT}$ da componente $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ dominando o decaimento.

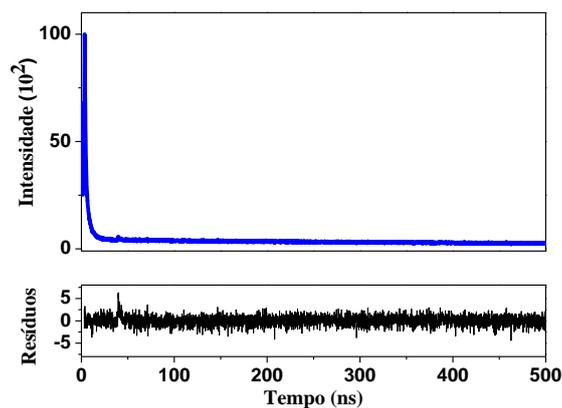
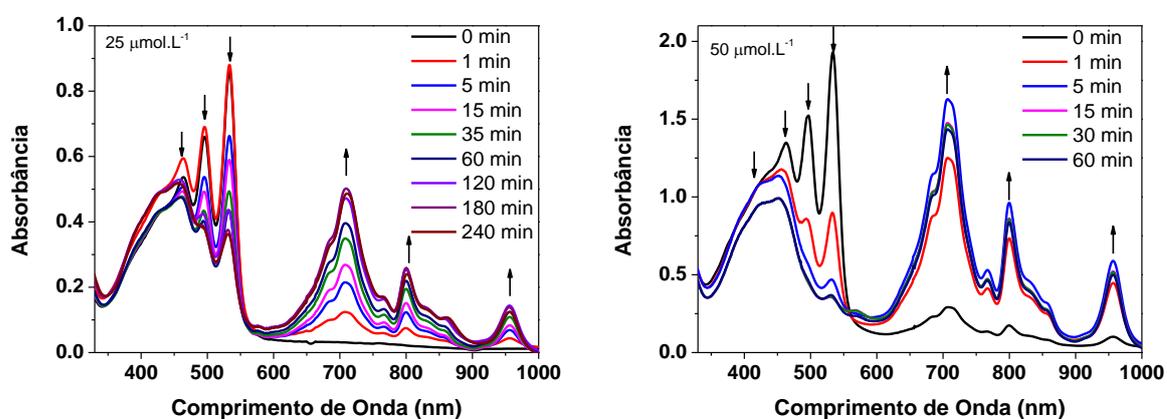
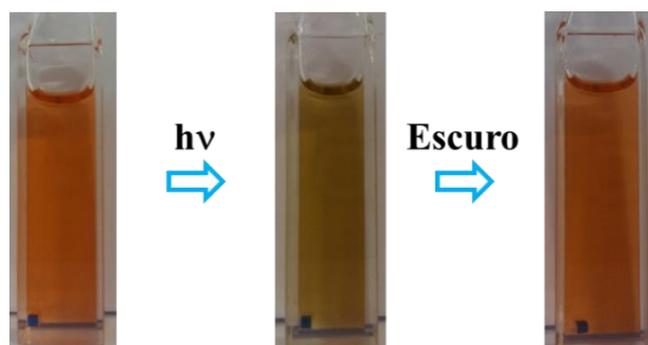


FIGURA 4.5 – Curva de decaimento de emissão para o complexo RupPDip, ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerado (N_2), $\lambda_{\text{EM}} = 448 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 600 \text{ nm}$.

As estabilidades fotoquímicas do ligante livre pPDip e do complexo RupPDip foram monitoradas por UV-Vis, luminescência e EPR. Em soluções do complexo desaeradas as irradiações com luz de 420 nm (luz azul) e de 518 nm (LED verde) apresentaram comportamentos similares, levando a diminuição da absorção da componente pPDip em 465, 495 e 535 nm acompanhadas, simultaneamente, pelo aparecimento de novas bandas em 710, 800 e 955 nm, correspondentes ao ânion radical pPDip $^{\cdot-}$, Figura 4.6. A fotólise exaustiva resultou em um espectro final estável do pPDip $^{\cdot-}$ e uma mudança de coloração da solução de laranja para esverdeado.

A



B

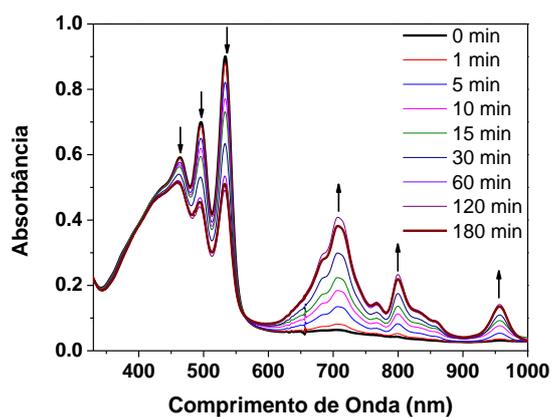


FIGURA 4.6 - Espectros de UV-Vis do complexo RupPDip em DMSO, desaerado (N_2) (A) 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ irradiados com luz de 420 nm e (B) 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ irradiado com LED 518 nm.

A fotólise acompanhada pelo espectro de emissão, Figura 4.7, também apresentou comportamento similar para ambas as irradiações. Quando excitado na região da componente pPDIp ($\lambda_{EX} = 500$ nm) demonstra um aumento na intensidade do pico referente a transição vibracional 0-0 em 550 nm em relação a transição 0-1 em 585 nm. No entanto, quando excitado na região da componente $[\text{Ru}(\text{phen})_2]^{2+}$ ($\lambda_{EX} = 450$ nm) não ocorre variação significativa na intensidade de emissão da MLCT em 600 nm. Esses resultados indicam a sobreposição entre a emissão do pPDIp $^{\bullet-}$ e do 1pPDIp , demonstrando que o estado excitado de excímero dinâmico ($^*pPDIp-pPDIp$) decai através da transferência de elétrons entre os cromóforos de pPDIp para o estado excitado de transferência de carga (CT) $\{^+pPDIp-pPDIp^{\bullet-}\}^*$, no qual o elétron desemparelhado fica delocalizado na nuvem eletrônica do sistema aromático ($^*pPDIp-pPDIp$).

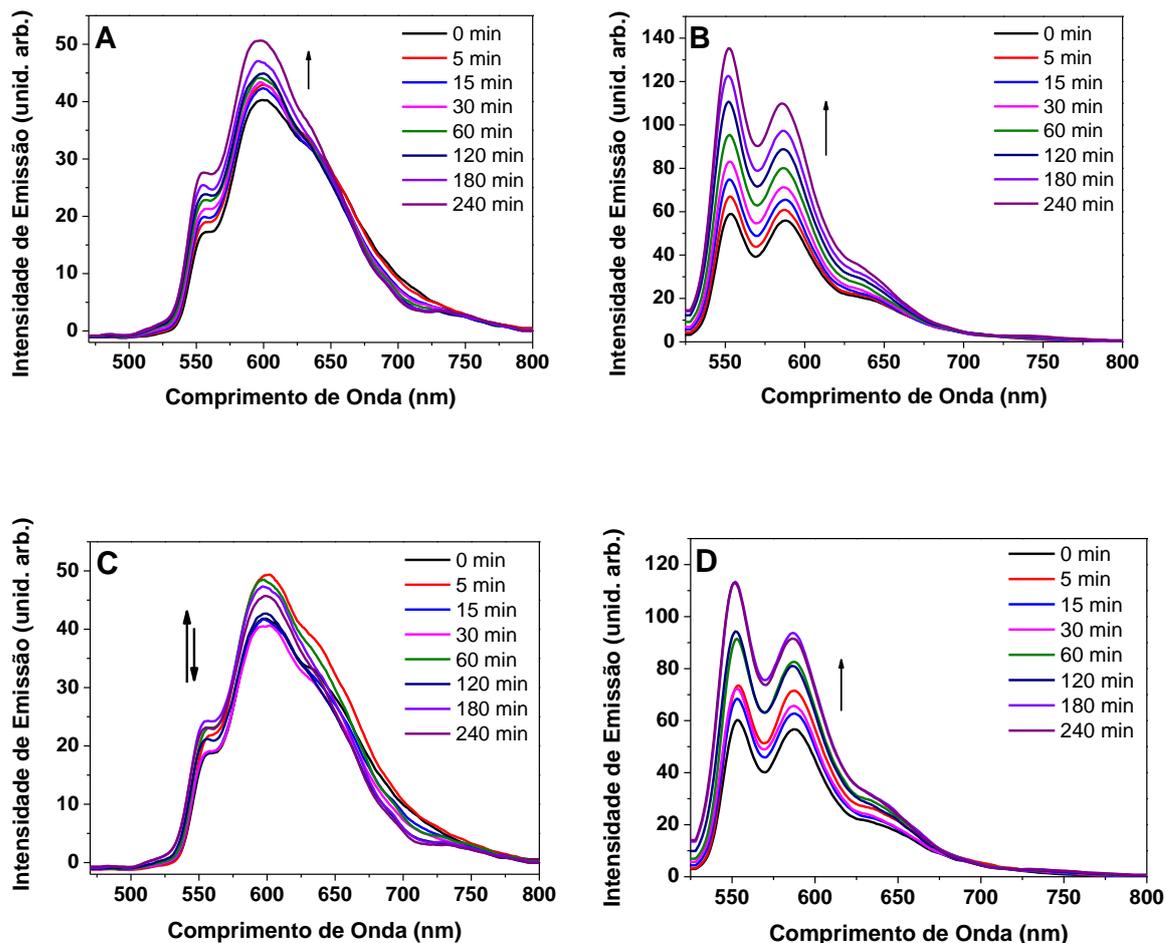


FIGURA 4.7 - Espectros de emissão do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em DMSO desaerado (N_2) acompanhada durante a irradiação com luz de 420 nm em (A) $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ e (B) $\lambda_{\text{EX}} = 500 \text{ nm}$ e com luz de 518 nm em (C) $\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$ e (D) $\lambda_{\text{EX}} = 500 \text{ nm}$.

É interessante notar que o sistema retornou a situação original quando a luz foi desligada, Figura 4.8. Nesta situação a absorção do ânion desaparece lentamente, a absorção inicial retorna em 72% e a coloração da solução volta para a cor laranja, enfatizando que as interações intermoleculares são originárias do estado excitado. O esquema luz/escuro pode ser repetido diversas vezes e as mesmas respostas são obtidas, demonstrando ser um processo cíclico.

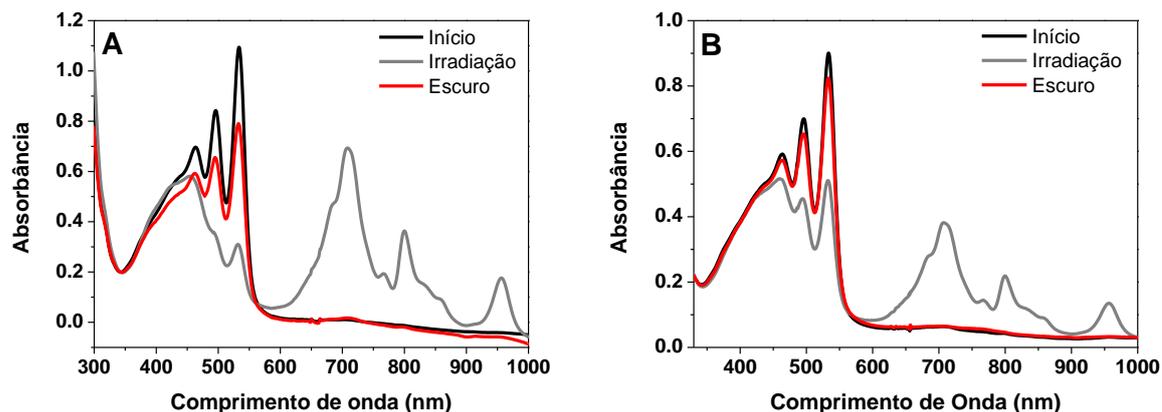


FIGURA 4.8 - Volta térmica do complexo RupPDIp no escuro (12h) ($25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em DMSO, desaerado (N_2) acompanhada por UV-Vis, (A) após 7h de irradiação com luz de 420 nm e (B) após 3h de irradiação com luz de 518 nm.

A fotólise acompanhada por EPR também demonstrou o crescimento do ânion radicalar. Conforme mostrado na Figura 4.9A, após 50 min de irradiação com a luz de 420 nm a concentração de $\text{pPDIp}^{\bullet-}$ aumentou de 2% para 33%. No final da fotólise observou-se um espectro bem resolvido com múltiplas linhas com $g = 2,0031$, Figura 4.9B. A simulação do espectro de EPR obtido experimentalmente com o ajuste dos parâmetros utilizando oito hidrogênios e dois nitrogênios presentes no ligante pPDIp, confirmou a delocalização do elétron desemparelhado nos anéis aromáticos da componente pPDIp. A simulação foi obtida usando o formato de linha Gaussiana com largura de 0,37 G e parâmetros de hiperfina de 1,78 G e 1,81 G para os dois núcleos de nitrogênio e de 0,700 G, 0,688 G, 0,594 G, 0,581 G, 0,571 G, 0,568 G e 0,421 G para os oito núcleos de hidrogênio. Além disso, esse resultado com hiperfinas bem resolvidas indica que não ocorre agregação do $\text{pPDIp}^{\bullet-}$ durante a fotólise. O espectro de EPR nas condições analisadas não indicou a presença de Ru(III) no escuro e sob a irradiação, sugerindo que o

solvente DMSO desempenha uma função fundamental na estabilização do estado CT e conseqüentemente do ânion radical.

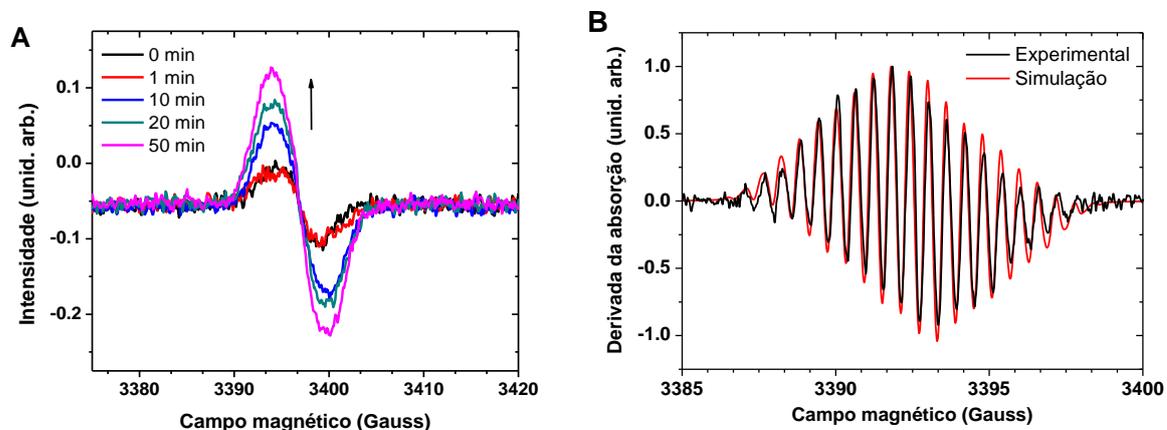


FIGURA 4.9 - (A) Espectros de EPR experimentais do complexo RupPDIp ($150 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerado acompanhando durante a fotólise com luz de 420 nm por 50 min. (B) Espectro de EPR experimental e simulado do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de DMSO desaerado após 2h de irradiação com luz de 420 nm.

Quando a fotólise foi realizada usando uma cubeta aberta ao ar para permitir o contato com o oxigênio, a formação do ânion acompanhada por UV-VIS foi menos eficiente, Figura 4.10. Quando investigada por medidas de emissão na região da banda de MLCT da componente $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$ ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) mostrou o aumento de intensidade da banda de MLCT com o tempo de irradiação (Fig. 4.11A). Em 500 nm o espectro de emissão apresentou perfil idêntico ao esperado para o pPDIp. A irradiação resultou no aumento da emissão desta banda, Figura 4.11B. Estes dados indicam que o oxigênio suprime a formação do ânion radicalar nos estados excitados impedindo a formação do excímero dinâmico.

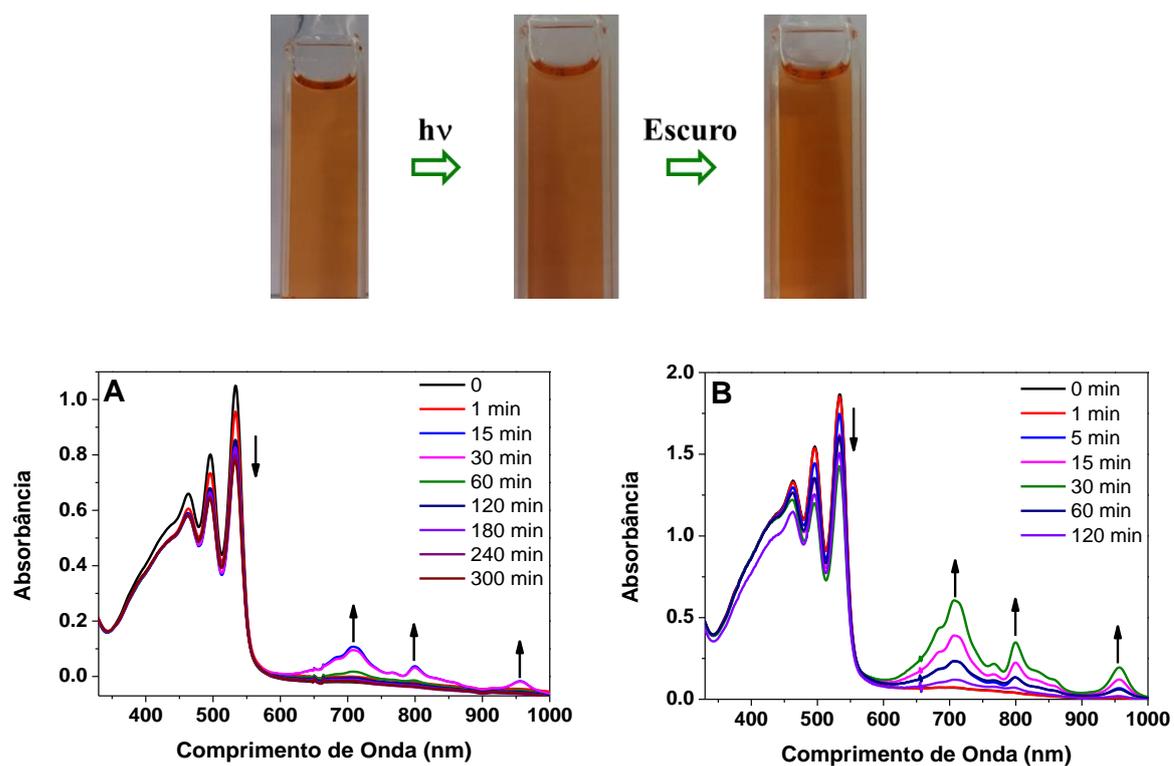


FIGURA 4.10 - Solução do complexo RupPDIp (A) $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e (B) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em DMSO na presença de O_2 (sistema aberto) com irradiação com luz de 420 nm.

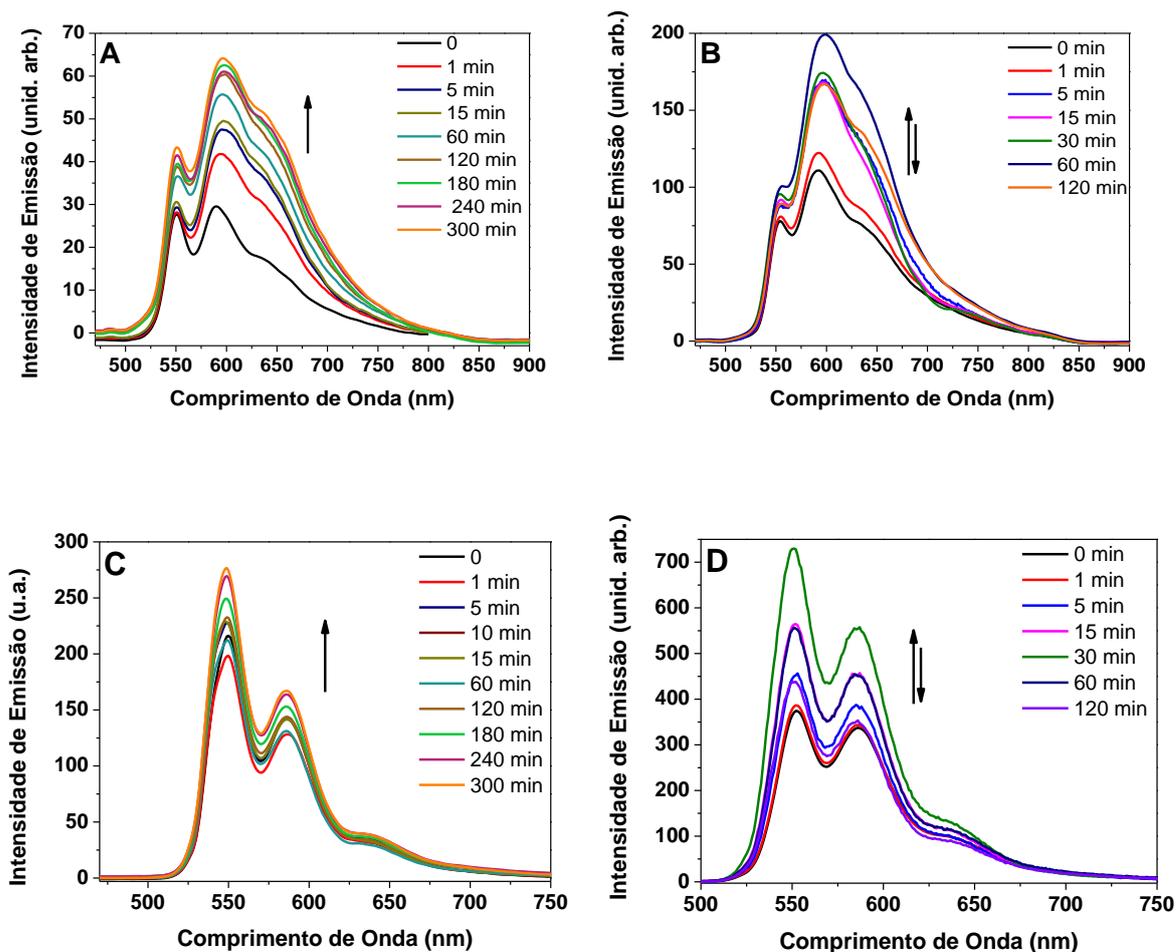


FIGURA 4.11 - Emissão do complexo RupPDIp em DMSO sistema aberto na presença de O_2 , acompanhada durante a irradiação com luz de 420 nm sendo (A) $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e (B) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com comprimento de onda de excitação de 450 nm, (C) $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e (D) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com comprimento de onda de excitação de 500 nm.

O ligante livre pPDIp em solução de DMSO des aerado foi irradiado com luz de 420 nm. A irradiação não levou a alterações na coloração da solução, no espectro de absorção e de emissão do pPDIp como demonstrado na Figura 4.12. Esses resultados demonstram a estabilidade fotoquímica do ligante livre e que a formação do ânion pPDIp^- induzida pela luz é um processo que ocorre somente no complexo.

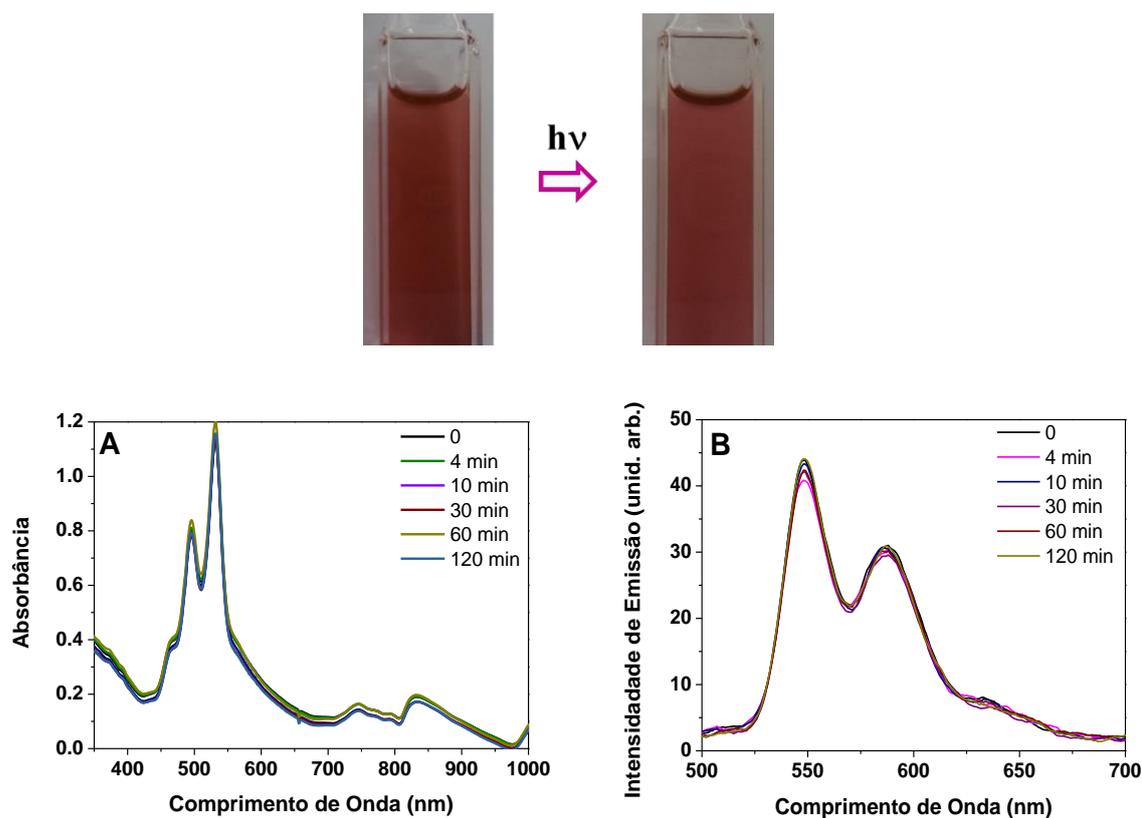


FIGURA 4.12 - Solução do ligante livre pPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em DMSO, desaerado (N_2) com irradiação com luz de 420 nm por 2 h, espectros de (A) absorção e de (B) emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 500 \text{ nm}$) acompanhados durante a irradiação.

A partir desses resultados é provável que o aumento da formação do ânion radicalar durante a fotólise seja consequência de um processo de transferência de carga e o solvente deve desempenhar uma função crucial na estabilização do processo de estado excitado. A formação do excímero dinâmico é favorecida devido à forte tendência do pPDIp agregar na forma de empilhamento π - π e o aumento da habilidade π receptora do pPDIp no estado excitado. Além disso, a formação do ânion radicalar em DMSO relatado aqui pode ser justificado devido à característica doadora e aprótica do solvente DMSO, que circunvizinha rapidamente o "par iônico" formado no estado excitado ($\{^+\text{pPDIp-pPDIp}^-\}^*$) por interações eletrostáticas e,

conseqüentemente, aumenta o tempo de permanência desta espécie nos estados excitados.^{63,64}

4.1.2 - Meio de cultura celular RPMI

As características eletrônicas e ópticas do complexo RupPDIp foram avaliadas em meio de cultura celular RPMI. Conforme demonstrado na Figura 4.13, o espectro de absorção apresenta mudanças nas intensidades relativas das bandas vibracionais da componente pPDIp no complexo. A banda de absorção referente a transição 0-0 em 550 nm ($\epsilon = 16.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) diminui de intensidade em relação a banda da transição 0-1 em 510 nm ($\epsilon = 24.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e a transição referente a MLCT (Ru \rightarrow phen) com máximo em 450 nm ($\epsilon = 19.600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) é favorecida sobrepondo a transição 0-2 em 475 nm ($\epsilon = 20.000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) da ILCT. A relação A_{0-0}/A_{0-1} igual a 0,65 é um indicativo de agregação do tipo-H fracamente acoplada encontrada em derivados de PDI.⁶⁵ Comparado com o espectro de absorção em DMSO, as mudanças de intensidade entre as vibrações 0-0 e 0-1 indicam mudanças na geometria molecular devido ao empilhamento π - π dos anéis aromáticos da componente pPDIp.

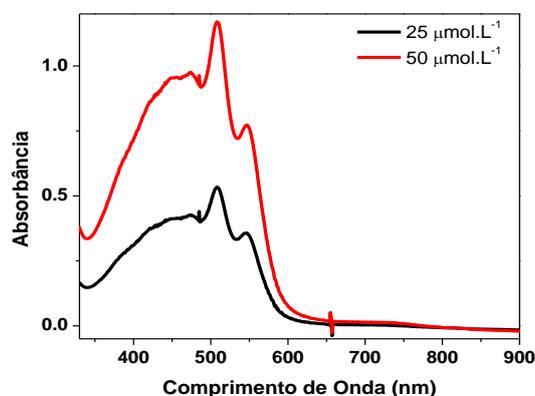


FIGURA 4.13 - Espectro de absorção do complexo RupPDIp (25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em meio de cultura celular RPMI, desaerado (N_2).

O processo de agregação também é aparente no espectro de emissão. A emissão da MLCT (Ru → phen) ($\lambda_{EX} = 450$ nm) com máximo em 600 nm foi preservada e predominou em todo o espectro, isto é, é independente do comprimento de onda de excitação, enquanto que a fluorescência da componente pPDIp foi completamente suprimida, Figura 4.14. O meio RPMI apresenta emissão em 525 nm, como demonstrado na Figura 4.15.

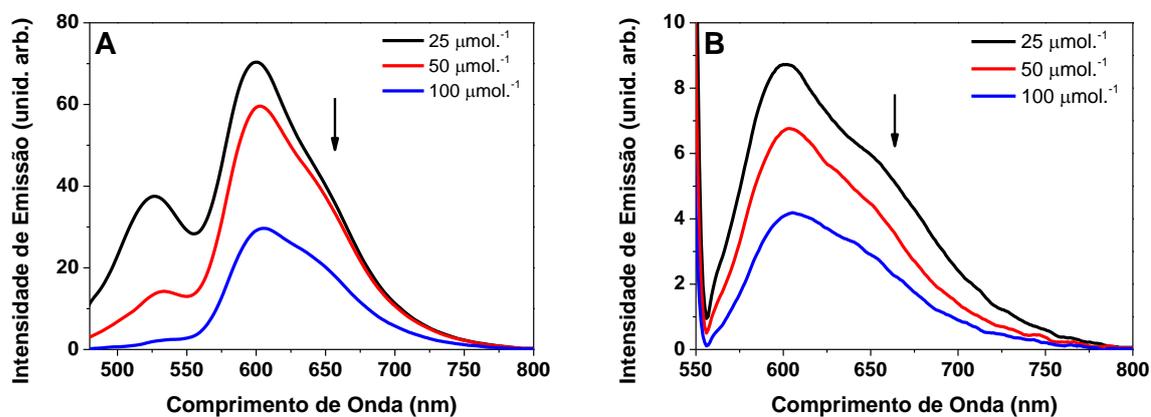


FIGURA 4.14 - Espectros de emissão do complexo RupPDIp (25, 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI, (A) $\lambda_{EX} = 450$ e (B) $\lambda_{EX} = 530$ nm, desaeado (N_2).

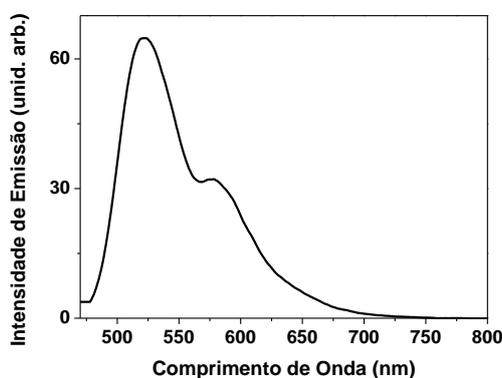


FIGURA 4.15 - Espectro de emissão do meio de cultura celular RPMI com $\lambda_{EX} = 450$ nm, desaeado (N_2).

O tempo de vida de emissão do complexo em RPMI apresentou um decaimento com ajuste triexponencial, indicando a presença de três estados emissivos, similar com o decaimento em DMSO, porém, houve um aumento no tempo de vida e na contribuição do emissão da 3*MLCT da componente $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$: $\tau = 0,46 \text{ ns } /90,2\%$), $4,14 \text{ ns } (11,3\%)$ e $622,6 \text{ ns } (88,5\%)$; $\chi^2 = 1,1$, Figura 4.16.

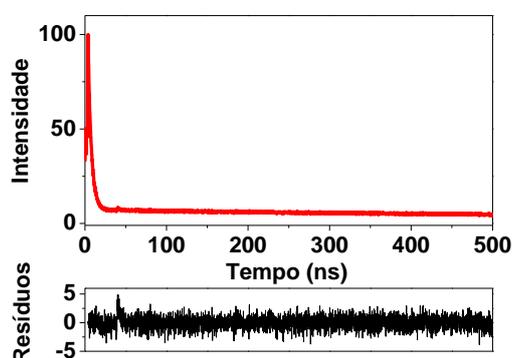


FIGURA 4.16 - Curva de decaimento de emissão para o complexo RupPDIp, ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de RPMI desaerado (N_2), $\lambda_{\text{EM}} = 448 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 600 \text{ nm}$.

Quando soluções desaeradas do complexo foram submetidas a fotólise contínua com luz de 518 nm , as alterações espectroscópicas foram consistentes com a formação do ânion radicalar $\text{pPDIp}^{\cdot-}$, evidenciado pela diminuição das bandas de absorção da componente pPDIp em $485, 510$ e 550 nm com a concomitante formação das bandas em $735, 820$ e 975 nm , atribuídas ao $\text{pPDIp}^{\cdot-}$, Figura 4.17A. Por outro lado, a irradiação com luz de 420 nm resultou em um espectro final consistente com a formação do diânion pPDIp^{2-} , com o aparecimento de uma banda de absorção larga em $\sim 665 \text{ nm}$, Figura 4.17B. Não observou-se alteração na coloração da solução, mantendo sempre o rosa predominante do meio RPMI.

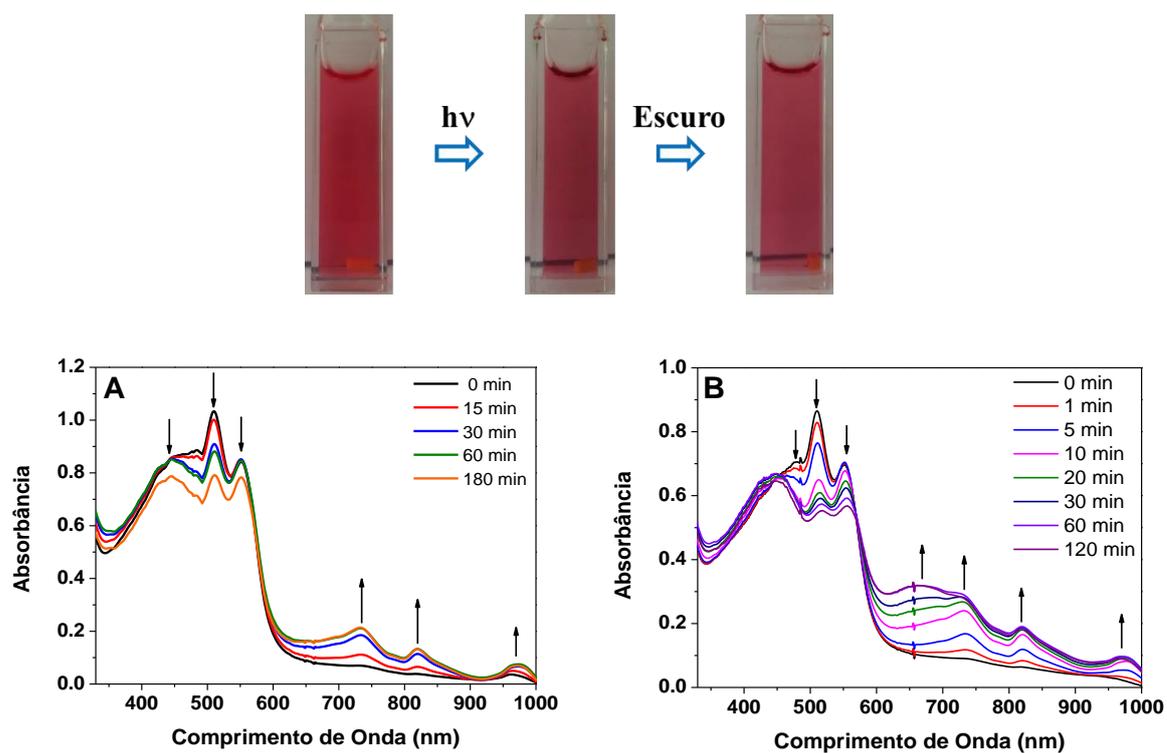


FIGURA 4.17 - Solução do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI, desaerado (N_2), com irradiação com (A) luz de 518 nm e (B) luz de 420 nm.

Ao monitorar a emissão do complexo desaerado durante as fotólises, observou-se que a irradiação com luz de 420 nm levou a uma diminuição da emissão $^3\text{MLCT}$ ($\text{Ru} \rightarrow \text{phen}$) enquanto que a irradiação com luz de 518 nm não leva a alterações significativas nos espectros, Figura 4.18.

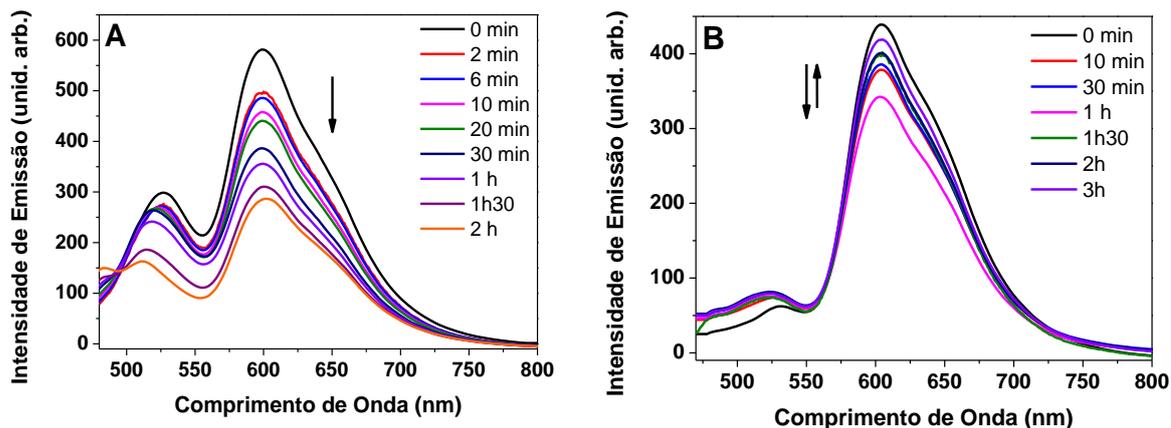


FIGURA 4.18 - Emissão do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI desaerado (N_2) acompanhada durante (A) a irradiação com luz de 420 nm e (B) com luz de 518 nm.

Para investigar esses eventos com mais detalhes a fotólise foi realizada com luz de 518 nm para gerar o pPDIp^{\bullet} , em seguida a irradiação foi interrompida e a estabilidade da solução no escuro foi observada por absorção UV-Vis. Ao cessar a irradiação a intensidade das bandas de absorção do fragmento pPDIp retornaram, enquanto que as bandas do pPDIp^{\bullet} foram consumidas. Com uma irradiação adicional usando a luz de 420 nm, a absorção do diânion pPDIp^{2-} apareceu, Figura 4.19. A quantidade de ânion radicalar formado após a fotólise exaustiva foi determinada por espectroscopia EPR, resultando em 5% da quantidade total de complexo com a irradiação de 420 nm e 2% sob a irradiação de 518 nm. Esses valores são menores do que os encontrados em DMSO.

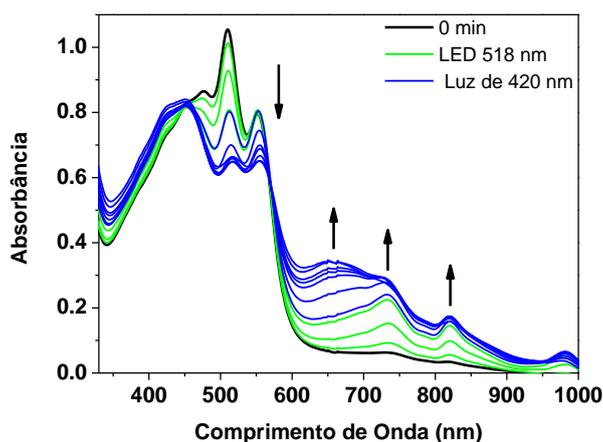


FIGURA 4.19 - Espectro de UV-Vis da solução do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI desaerado (N_2), irradiada com luz de 518 nm durante 30 min para a formação do $\text{pPDIp}^{\cdot-}$ seguida pela irradiação com luz de 420 nm por 3 h para a formação do diânion pPDIp^{2-} .

A reação de volta é observada quando a luz é desligada, onde as absorções do ânion e do diânion desaparecem lentamente e a absorção inicial retorna em 88% após 14h, Figura 4.20, demonstrando o comportamento cíclico do complexo.

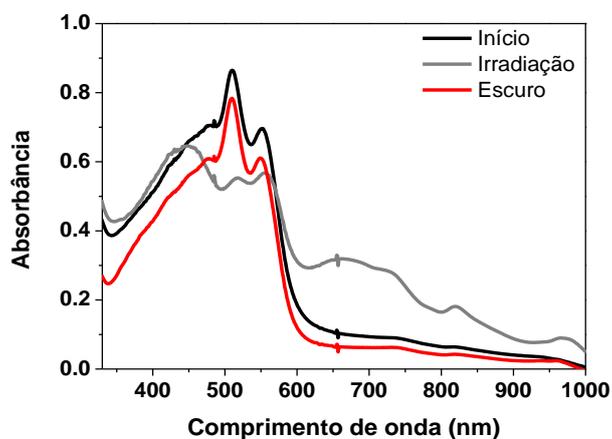


FIGURA 4.20 - Volta térmica no escuro (14h) do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em RPMI, desaerado (N_2) após 2h de irradiação com luz de 420 nm, acompanhada por UV-Vis.

No decorrer da fotólise monitorada por EPR não foi detectada o desdobramento das linhas hiperfinas, Figura 4.21. Os espectros EPR reafirmam que as subunidades de pPDIp compartilham um elétron adicional, de modo que, em DMSO o espectro mostra a divisão hiperfina e em RPMI essa característica não é observada. A ausência de hiperfinas para o ânion radicalar de pPDIp^{•-} indica que há interação entre os elétrons desemparelhados causando um alargamento do espectro de EPR para o complexo dissolvido em RPMI e confirmando agregação entre as unidades de pPDIp^{•-} neste solvente. Este comportamento já foi observado em outros derivados de PDI.⁶⁶⁻⁶⁹

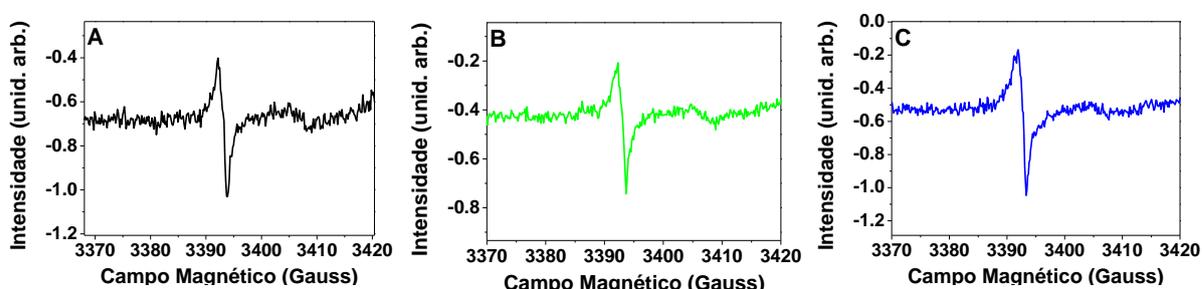


FIGURA 4.21 - Espectro de EPR do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de RPMI desaerado (N_2) (A) no escuro, (B) com irradiação com luz de 518 nm por 30 min e (C) com irradiação com luz de 420 nm por 2h.

Em soluções aeradas as fotólises não levam a alterações no espectro de absorção, como demonstrado na Figura 4.22. O ânion pPDIp^{•-} favorecido pela irradiação é rapidamente consumido pelo oxigênio presente em solução.

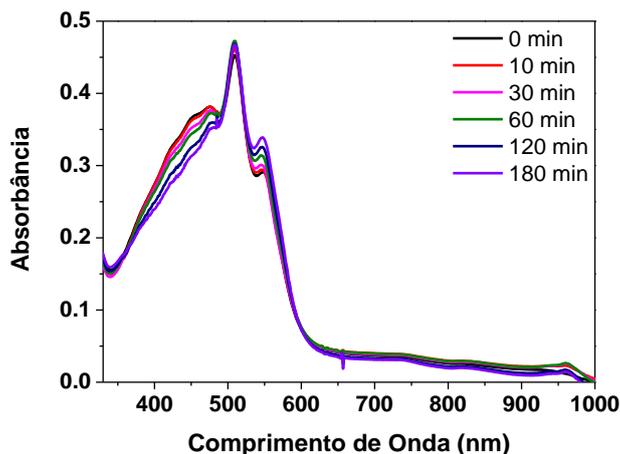


FIGURA 4.22 - Espectro de EPR do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução de RPMI des aerado (N_2) (A) no escuro, (B) com irradiação com luz de 518 nm por 30 min e (C) com irradiação com luz de 420 nm por 2h.

Esses resultados demonstraram que os estados de MLCT e ILCT possuem energias razoavelmente próximas em RPMI, de modo que a variação no comprimento de onda de irradiação pode ser utilizada para "sintonizar" as energias dos estados excitados desejados alterando a via fotoquímica. Isso explica o aumento da ativação do ânion radicalar com a fotólise. A irradiação com luz induz a um forte deslocamento de carga nas transições eletrônicas do pPDIp (ILCT) e do $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$ (MLCT) para o estado de transferência de carga e/ou da componente pPDIp, dependendo do comprimento de onda de irradiação. Como resultado, a carga delocalizada no pPDIp aumenta mas não pode se espalhar porque está limitada à porção aromática.

4.1.3 - Tampão fosfato (pH 7,4)

Em solução tampão (pH 7,4) a tendência do complexo em formar agregados aumenta em relação ao DMSO e ao RPMI. No espectro de

absorção houve uma inversão nas intensidades das vibrações 0-0 em relação a 0-1 e a relação A_{0-0}/A_{0-1} atingiu o valor de 0,66, Figura 4.23.

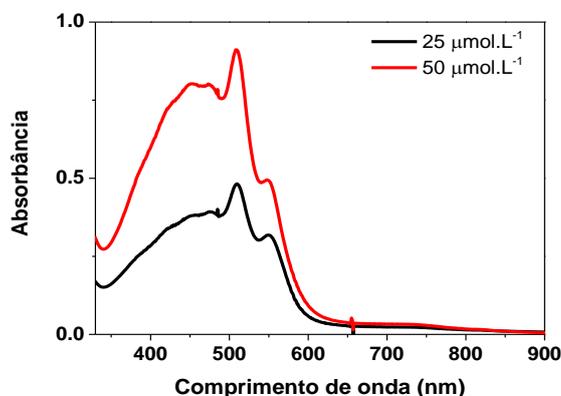


FIGURA 4.23 - Espectro de absorção do complexo RupPDip (25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em tampão fosfato (pH 7,4) des aerado (N_2).

A emissão da MLCT ($\text{Ru} \rightarrow \text{phen}$) ($\lambda_{\text{EX}} = 450 \text{ nm}$) com máximo em 600 nm foi preservada, enquanto que a fluorescência da componente pPDip ($\lambda_{\text{EX}} = 535 \text{ nm}$) foi completamente suprimida, Figura 4.24. Assim como observado em RPMI, o tempo de vida de emissão em tampão (pH 7,4) apresentou um decaimento com ajuste tri-exponencial, Figura 4.25. A população do $^3\text{MLCT}$ (504 ns, 99%) é maior quando comparada com RPMI enquanto que a $^1\text{ILCT}$ da componente pPDip (5,0 ns, 0,25%) é similar. O tempo de vida curto de 37 ns (0,26%) indica a formação de um excímero, assim como observado em sistemas similares.⁷⁰

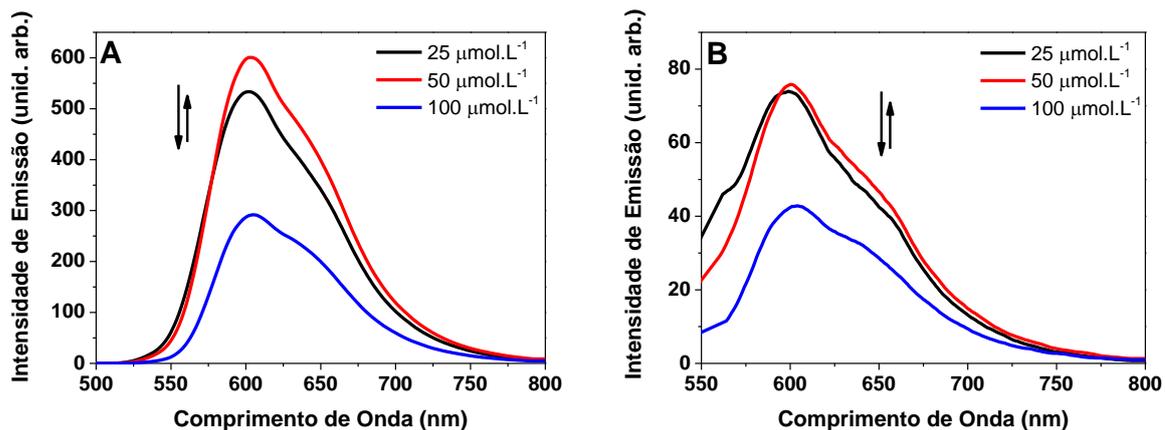


FIGURA 4.24 - Espectros de emissão do complexo RupPDIp (25, 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em tampão (pH 7,4) desaeardos com (A) $\lambda_{\text{EX}}= 450 \text{ nm}$ e (B) $\lambda_{\text{EX}}= 500 \text{ nm}$.

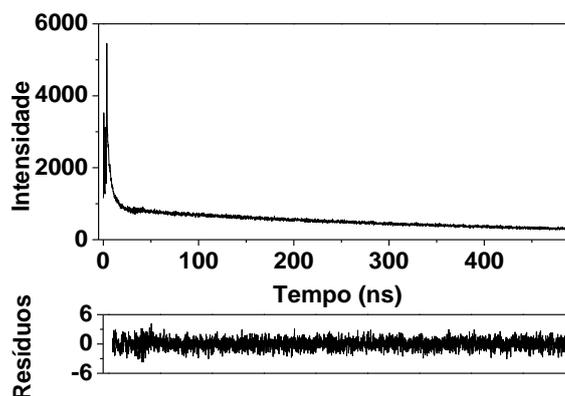


FIGURA 4.25 - Curva de decaimento de emissão para o complexo RupPDIp, ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução tampão (pH 7,4) desaeardado (N_2), $\lambda_{\text{EM}} = 448 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 600 \text{ nm}$.

A Figura 4.26 mostra os espectros de absorção e de emissão do complexo RupPDIp em tampão fosfato (pH 7,4) em função da concentração e da temperatura a fim de investigar a estabilidade térmica do complexo. Os espectros de absorção exibem as características típicas de agregados, com o

aumento da intensidade da transição 0-1 em 510 nm em relação a transição 0-0 em 545 nm e sem alterações na posição espectral com o aumento da concentração e da temperatura. A progressão de Franck-Condon em todos os parâmetros analisados é menor que 1,0 (Tabela 4.2). A emissão é mantida com o máximo em 600 nm. Embora não haja quase nenhuma alteração na posição espectral com a alteração da temperatura, com o aquecimento observa-se uma diminuição significativa na absorbância e nas intensidades de emissão devido a maior mobilidade das moléculas de complexo em solução. Esses resultados indicam que a agregação é de tipo intermolecular entre as porções de pPDIp e os agregados formados são estáveis em solução mesmo com o aumento da temperatura.

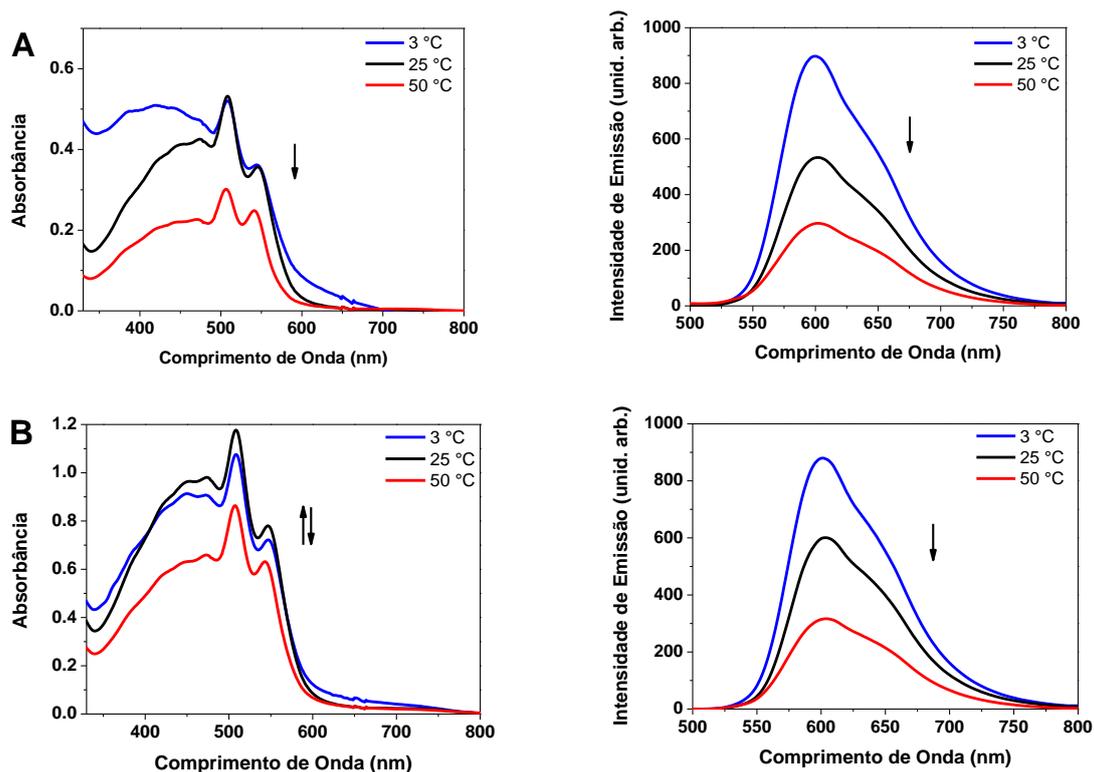


FIGURA 4.26 - Espectros de absorção e de emissão ($\lambda_{EX}= 450$ nm) do complexo RupPDIp (A) 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e (B) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão (pH 7,4) desaerados (N_2), nas temperaturas de 3 °C, 25 °C e 50 °C com variação de ± 2 °C.

TABELA 4.2 - Progressão de Franck-Condon (A_{0-0}/A_{0-1}) do complexo RupPDIp nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato (pH 7,4), desaerados (N_2) e em diferentes temperaturas (3, 25 e 50 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Concentração de RupPDIp	Temperatura		
	3 $^{\circ}\text{C}$	25 $^{\circ}\text{C}$	50 $^{\circ}\text{C}$
25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,69	0,66	0,80
50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,67	0,65	0,73

Em tampão não ocorre a formação do ânion radicalar e do diânion com as irradiações, Figura 4.27. Esses resultados reafirmam o efeito do solvente na agregação com o empilhamento π - π do complexo, de forma que em solução tampão a maior tendência em formar agregados diminui a habilidade de redução da componente pPDIp, impedindo os processos fotoquímicos de formação do ânion e do diânion observados nos outros meios analisados, porém houve a formação do estado excitado tripleto $^3\text{pPDIp}$

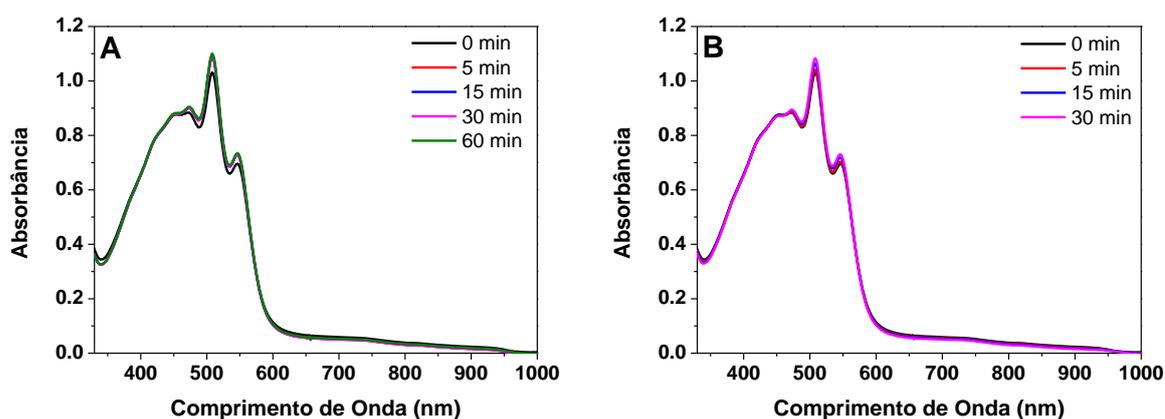


FIGURA 4.27 – Espectros de UV-Vis do complexo RupPDIp ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em tampão fosfato (pH 7,4) desaerado (N_2), irradiados com (A) luz de 420 nm e (B) com luz de 518 nm.

4.1.4 - Diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado

Com base nesses resultados, os dados aqui apresentados demonstram que o solvente e o comprimento de onda de irradiação podem ser usados para sintonizar as propriedades fotofísicas do complexo RuPDIp. Com a irradiação de 420 nm tanto o estado excitado de transferência de carga interna do ligante (ILCT) do pPDIp e o estado excitado $^3\text{MLCT}$ do $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$ podem ser alcançados, enquanto que com a irradiação de 518 nm apenas a componente pPDIp é atingida. Assim, independentemente da luz irradiada, a componente $^1\text{pPDIp}$ é alcançada, seguido por uma rápida desativação que decai para o estado de excímero dinâmico ($^*\text{pPDIp-pPDIp}$) o qual, subsequentemente, decai por transferência de elétrons para o perileno formando o estado de transferência de carga $^{*}\{\text{pPDIp-pPDIp}^{\bullet-}\}$ e o estado excitado tripleto $^3\text{pPDIp}$.

O solvente influencia diretamente o empilhamento π - π intermolecular entre os anéis aromáticos da componente pPDIp do complexo e favorece a geração do $\text{pPDIp}^{\bullet-}$ e do pPDIp^{2-} . Qualitativamente o comportamento fotoquímico observado em DMSO foi mantido em RPMI, no entanto, existem duas características importantes que dependem do meio. Primeiro, a geração do ânion radicalar é influenciada pela identidade do solvente seguindo a ordem geral $\text{DMSO} > \text{RPMI} \gg \text{tampão}$. Em segundo lugar, quando os estados excitados de menor energia de MLCT e ILCT são razoavelmente próximos em energia, uma alteração no comprimento de onda de irradiação pode reverter a ordem energética e consequentemente a reatividade fotoquímica, resultando na formação do diânion em RPMI ou do $^3\text{pPDIp}$ em tampão.

Em DMSO a formação do excímero dinâmico é mais eficiente e a contribuição do estado CT é maior. Além disso, a capacidade doadora do

DMSO estabiliza o estado de CT através de interações eletrostáticas, aumentando a quantidade de ânion radical formado durante a fotólise. O diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado proposto para o RupPDIp em DMSO é mostrado na Figura 4.28.

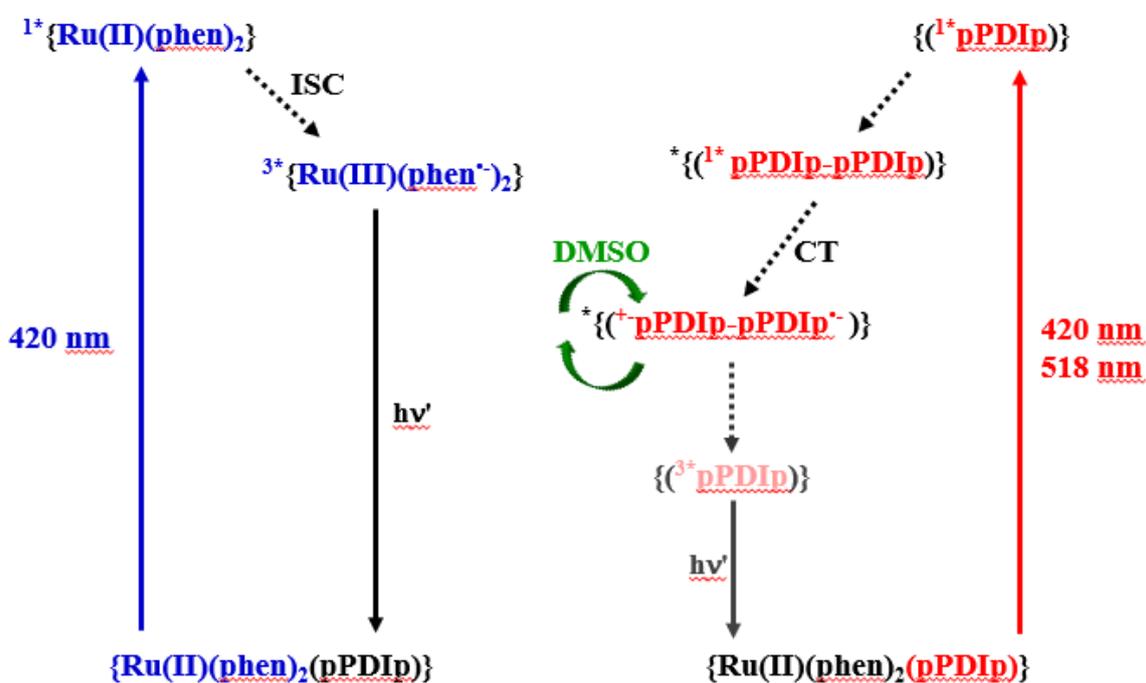


FIGURA 4.28 - Diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado proposto para o RupPDIp em DMSO.

Em RPMI a interação intermolecular entre anéis aromáticos da componente pPDIp é favorecida, facilitando as interações π - π no estado fundamental. Como consequência, a contribuição da formação do excímero ($^*\{\text{pPDIp-pPDIp}\}$) aumenta e a contribuição do estado de transferência de carga (CT) diminui. Com a excitação em 450 nm, o estado excitado 1^*MLCT é alcançado e decai através do cruzamento intersistema (ISC) para o estado excitado tripleto 3^*MLCT , o qual rapidamente relaxa para o estado excitado

$\{\text{Ru}^{3+}(\text{phen}^{\bullet-})(^+\text{pPDIp-pPDIp}^{\bullet-})\}$. Nestas condições, a transferência de elétrons é altamente favorecida e a fotólise resulta na formação das espécies pPDIp^{2-} e $^3\text{pPDIp}$. O diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado proposto para o complexo RuPDIp em RPMI é mostrado na Figura 4.29.

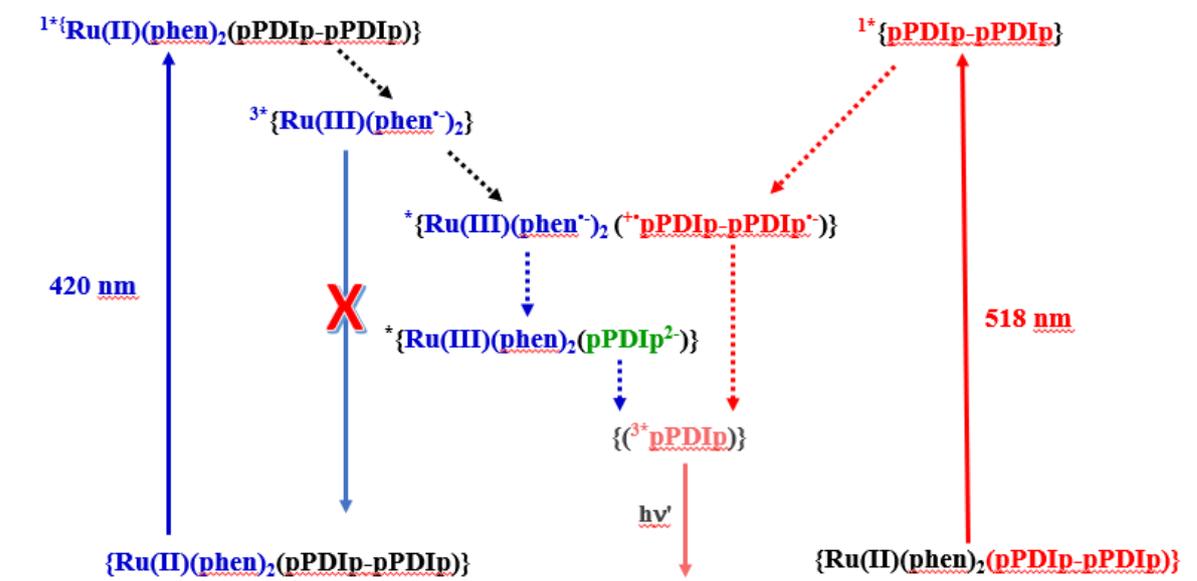


FIGURA 4.29 - Diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado proposto para o RuPDIp em RPMI.

Por outro lado, na solução tampão (pH 7,4) a energia do estado $^3\text{MLCT}$ é favorecida independente do comprimento de onda de irradiação usado Figura 4.30. Em um trabalho do nosso grupo de pesquisa, determinamos a formação do $^3\text{pPDIp}$, o qual apresentou um longo tempo de vida de emissão de $1,8 \mu\text{s}$ em acetonitrila.⁴⁰ No trabalho aqui apresentado não possuímos evidência direta da formação do $^3\text{pPDIp}$ nos meios investigados mas a redução da formação do ânion radical na presença de oxigênio e a ativação do $^1\text{O}_2$ e das espécies reativas de oxigênio após as fotólises das soluções, dados estes apresentados na próxima seção, nos dão indícios da formação do $^3\text{pPDIp}$ e que ele compete com a formação do ânion radicalar.

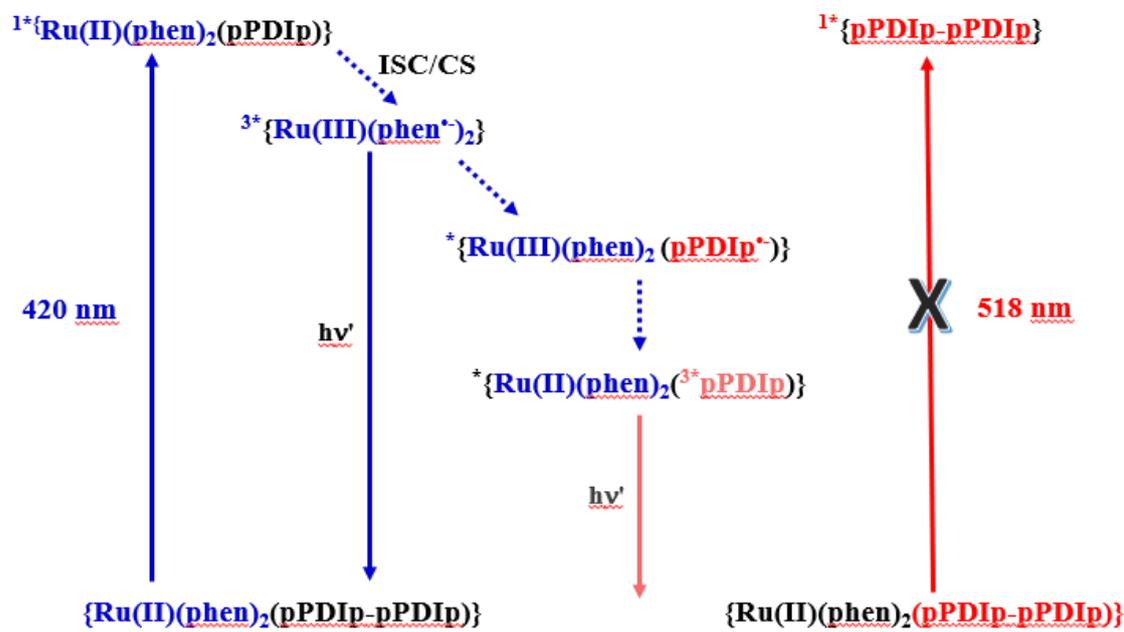


FIGURA 4.30 - Diagrama qualitativo dos níveis energéticos do estado excitado proposto para o RupPDIp em solução tampão (pH 7,4).

A variação do solvente leva a diversas alterações no comportamento fotofísico e fotoquímico do complexo RupPDIp. Dentre elas as bandas de absorção e de emissão sofrem várias alterações, o que indica mudanças nas energias dos estados excitados de MLCT ou nos fatores de Franck-Condon. Além disso, pode-se esperar que o solvente influencie diretamente nas velocidades de desativação não radiativas. As alterações podem ser o resultado das diferenças na capacidade doadora do solvente ou, possivelmente, de efeitos nos processos de recombinação dos elétrons no estado excitado. Assim, para o RupPDIp os estados excitados de menor energia 3^* MLCT e CT possuem energias similares, as mudanças no solvente podem ser suficientes para reverter a ordem desses estados, enquanto a sensibilidade da componente pPDIp no meio para a agregação e orientação dos agregados são significativas para o comportamento fotoquímico do complexo. Especificamente, a extensão da agregação altera a organização das

moléculas no complexo influenciando as características fotoquímicas do complexo. Os solventes oferecem a possibilidade de "ajustar" o $\text{pPDIp}^{\cdot-}$ para menores energias, como em DMSO e RPMI ou para energias mais elevadas como em solução tampão e acetonitrila, onde as energias dos estados $^3\text{pPDIp}$ provavelmente serão pouco perturbadas pelo solvente.

Essas observações sustentam a perspectiva de que a variação do comprimento de onda de irradiação e do solvente podem ser utilizadas para selecionar as características fotofísicas do complexo, de modo a alcançar as espécies excitadas $^3\text{pPDIp}$, $\text{pPDIp}^{\cdot-}$ e/ou pPDIp^{2-} .

4.1.5 - Imobilização do RupPDIp no filme polimérico

Diversos trabalhos na literatura demonstram as propriedades fotossensibilizadas dos complexos polipiridínicos de Ru(II) tanto em solução como imobilizados em filmes poliméricos.⁷⁶ Neste contexto, apesar dos resultados promissores com o complexo RupPDIp em meio fluido, não é uma condição apropriada para a aplicação prática do complexo, uma vez que nestas condições sua recuperação e reutilização não são possíveis. Dessa forma, para conseguirmos um material de baixo custo e que permita a reutilização, imobilizamos o complexo em um filme a base de amido de mandioca demonstrado na Figura 4.31. O amido é um material com grande potencial para ser utilizado como matéria-prima na produção de biomateriais devido à sua biocompatibilidade à sua maleabilidade para a aplicação almejada. Além disso, esse filme em específico foi selecionado devido à sua porosidade que permite permeabilidade de gases, como no caso, o oxigênio.⁴⁹



FIGURA 4.31 - Complexo RupPDIp immobilizado no filme polimérico de amido de mandioca.

Os filmes obtidos são visualmente translúcidos, flexíveis e podem ser facilmente moldados e cortados conforme o necessário. As propriedades eletrônicas e ópticas do filme do complexo RupPDIp foram analisadas. Os ensaios espectroscópicos demonstraram que a esfera de coordenação do complexo foi mantida durante a fabricação do filme. O espectro de absorção (Fig. 4.32A) é característico de agregados, apresentando mudanças nas intensidades relativas das bandas vibracionais da componente pPDPp, com a vibração molecular referente a transição 0-2 em 457 nm de maior intensidade, seguida da transição 0-1 em 507 nm e 0-0 em 545 nm, sendo esta última a de menor intensidade. A absorção da transição MLCT (Ru \rightarrow phen) apresenta máximo em \sim 440 nm. As mudanças nos máximos de absorção da componente pPDIp indicam interações π - π entre as moléculas. A relação A_{0-0}/A_{0-1} é de 0,76 sendo um indicativo de agregação do tipo-H. A emissão da MLCT (Ru \rightarrow phen) (λ_{EX} = 450 nm) foi deslocada para o vermelho, apresentando máximo em 640 nm, enquanto que a fluorescência da componente pPDIp (λ_{EX} = 535 nm) foi completamente suprimida, Figura 4.32B.

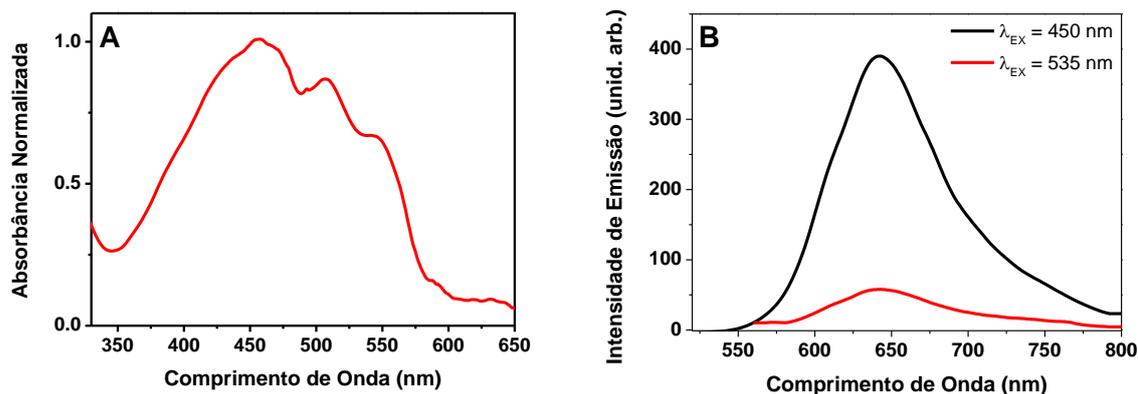


FIGURA 4.32 - Filme polimérico do complexo RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (A) Espectro de absorção e (B) espectro de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ e 535 nm).

Para analisar efeitos da concentração do complexo no filme polimérico, foi realizado um estudo de emissão nas concentrações de $1,0$ a $480 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Como demonstrado na Figura 4.33, em maiores concentrações ocorre a diminuição da intensidade de emissão, indicando supressão da emissão da MLCT.

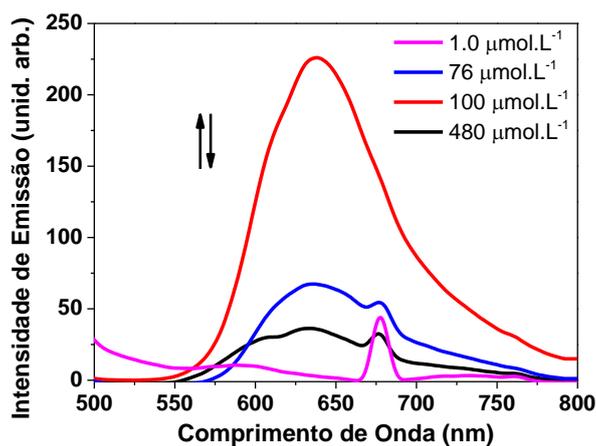


FIGURA 4.33 - Espectro de emissão ($\lambda_{\text{EX}} = 450$ nm) do filme polimérico do complexo RupPDIp ($1,0$ a $480 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

A cinética de decaimento dos estados emissivos do RupPDIp é caracterizada por um decaimento triexponencial, sugerindo a presença de três espécies emissivas: 1,8 ns (0,02%), 351 ns (3,95%) e 1659 ns (96,03%), $\chi^2 = 1,0$. O perfil de decaimento é demonstrado na Figura 4.34. O tempo de vida de 351 ns é típico de complexos polipiridínicos de Ru(II). A espécie com maior proporção apresenta também o tempo de vida mais longo de $\sim 1,7 \mu\text{s}$. O mesmo valor de tempo de vida foi obtido para este complexo em acetonitrila, sendo proveniente da desativação do estado excitado $^3\text{pPDIp}$.⁴⁰ Essa similaridade mostra que a imobilização no filme limita significativamente os decaimentos não radiativos e favorece a população do estado excitado $^3\text{pPDIp}$.

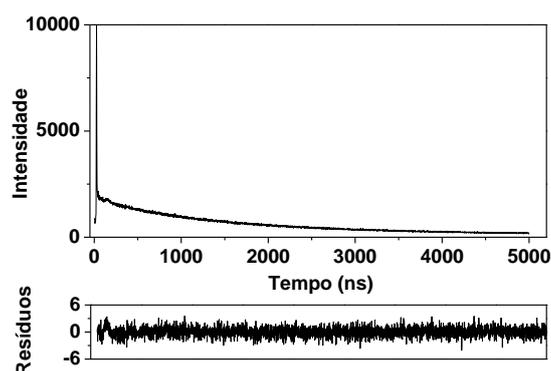


FIGURA 4.34 - Curva de decaimento de emissão para o complexo RupPDIp, ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) no filme polimérico, $\lambda_{\text{EM}} = 448 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{EX}} = 600 \text{ nm}$.

A morfologia e a distribuição do complexo no filme polimérico foi analisada utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Através da análise de elétrons secundários, que fornece informações sobre o relevo da amostra, observa-se que a superfície do filme apresenta poucos defeitos (Fig. 4.35A). De acordo com a análise de elétrons retroespalhados, a qual fornece informações sobre a composição através do contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra,

observa-se que o complexo está distribuído de maneira uniforme pelo filme (Fig. 4.35B).

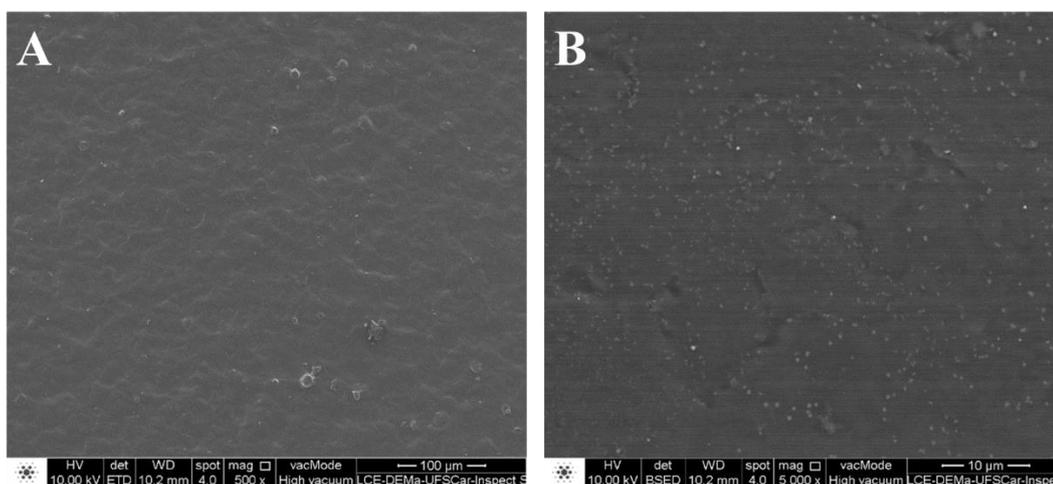


FIGURA 4.35 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do filme polimérico com o complexo RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (A) Elétrons secundários e (B) elétrons retroespalhados.

4.2 - Detecção das espécies reativas de oxigênio

Espectroscopia de EPR com armadilhas de spin (do inglês, *spin trap*) é uma técnica eficaz e sensível para detectar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Como descrito anteriormente, a irradiação com luz faz com que o fotossensibilizador (PS) no estado fundamental atinja o estado excitado tripleto podendo participar de reações com o oxigênio molecular pelo processo do Tipo I (transferência de elétrons) e/ou do Tipo II (transferência de energia) para gerar as EROs. EROs não podem ser detectadas diretamente por EPR devido aos seus tempos de vida curtos, entretanto, reagem rapidamente com os sequestradores de spins, como por exemplo as nitronas diamagnéticas, formando adutos de spin estáveis que podem ser caracterizados pelo espectro de EPR.^{71,72,73}

Neste trabalho utilizamos a técnica de EPR com o *spin trap* 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinol (TMP-OH) para detectar o $^1\text{O}_2$ gerado pela ativação com luz do complexo RupPDIp. De acordo com NAKAMURA et al. 74, o TMP-OH reage com o $^1\text{O}_2$ gerando a espécie paramagnética 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine *N*-oxyl (TEMPOL).

Após irradiadas com luz de 420 nm e de 518 nm, as soluções de RupPDIp (10 a 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e TMP-OH (48 mmol.L^{-1}) em tampão fosfato (pH 7,4), sem saturação de oxigênio, apresentaram um sinal com desdobramento hiperfino de mesma intensidade entre 3380-3420 Gauss, Figuras 4.36A e 4.36B. Esse espectro é característico da espécie paramagnética TEMPOL proveniente da oxidação do TMP-OH pelo $^1\text{O}_2$, com um elétron desemparelhado entre o aduto de nitrogênio com o oxigênio.⁷⁴ No escuro, o espectro de EPR mostrou um sinal desprezível de TEMPOL causado pela impureza do *spin trap* (Figura 4.36C) e um sinal em ~ 3393 Gauss mantido constante durante a fotólise, que corresponde a 0,33% da concentração do complexo, o qual foi atribuído anteriormente como impureza do ânion radical pPDPp $^{\cdot-}$ do ligante livre.

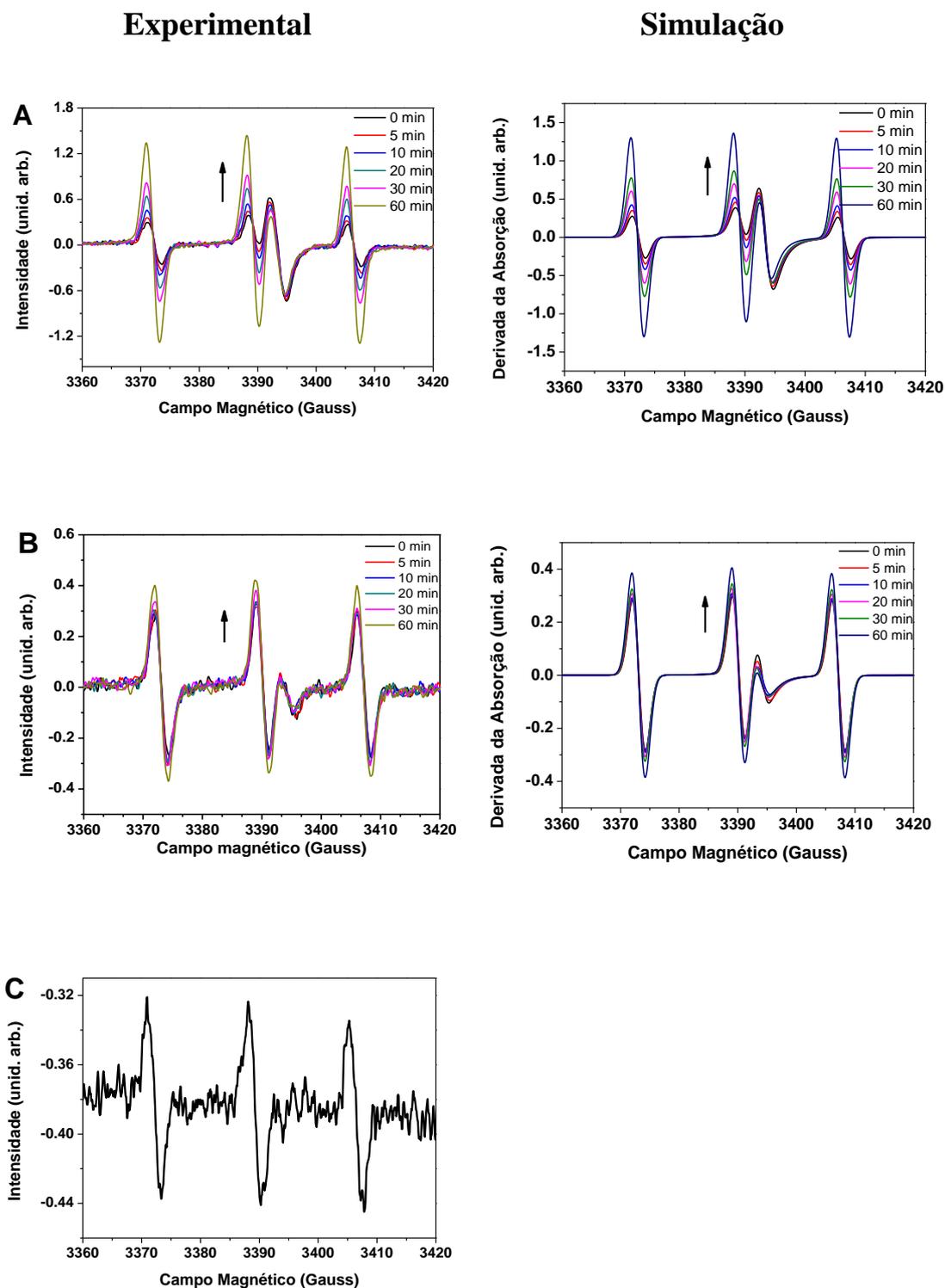


FIGURA 4.36 - Espectros de EPR experimentais e simulados da solução de tampão fosfato (pH 7,4) contendo o complexo RupPDp e o *spin trap* TMP-OH (48 mmol.L^{-1}), sistema aberto e sem saturação de O_2 . (A) RupPDp ($150 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) irradiado com luz de 420 nm e (B) RupPDp ($25 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) irradiado com luz de LED de 518 nm e (C) TMP-OH no escuro.

A concentração de $^1\text{O}_2$ gerado com a irradiação do complexo RupPDIp foi obtida através de uma curva de calibração utilizando o TEMPOL como padrão (Fig 4.37A), a partir da área dos espectros simulados.⁷⁵ Os resultados obtidos demonstraram que a concentração de $^1\text{O}_2$ depende do comprimento de onda da irradiação de luz, do período de irradiação e da concentração de complexo, Figuras 4.37B e 4.37C, Tabela 4.3.

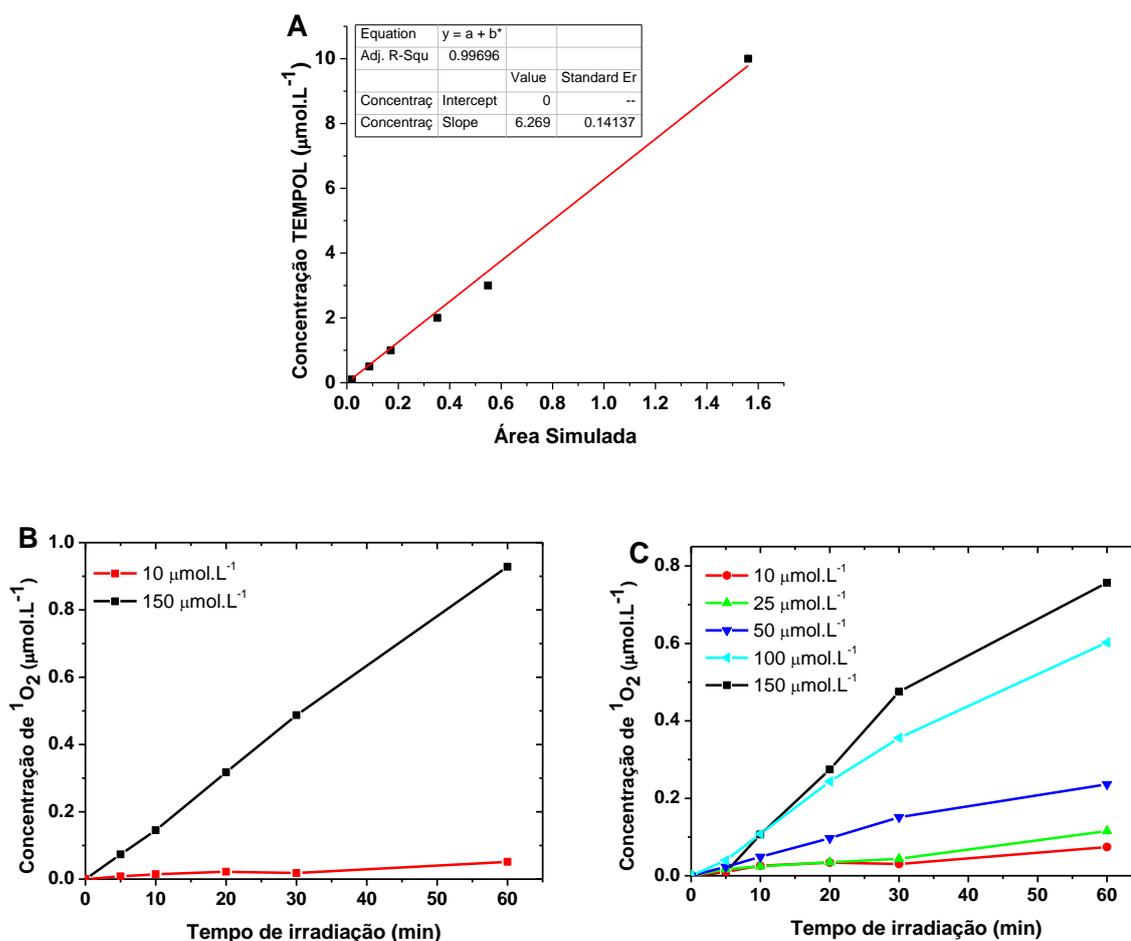


FIGURA 4.37 - Quantificação de $^1\text{O}_2$ por espectroscopia de EPR com *spin trap*. Os espectros de EPR foram detectados após a irradiação do complexo RupPDIp (10 a 150 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em solução tampão (pH 7,4) na presença de 48 mmol.L^{-1} de TMP-OH. Em (A) demonstra a curva de calibração do padrão TEMPOL obtida através da área dos espectros simulados. Em (B) a concentração de $^1\text{O}_2$ gerado pelo complexo RupPDIp a partir da irradiação com luz de 420 nm e em (C) com luz de LED de 518 nm.

TABELA 4.3 - Quantificação de $^1\text{O}_2$ gerado a partir da irradiação do complexo RupPDIp utilizando a técnica de EPR com *spin trap*.

RupPDIp	Luz	Tempo de Irradiação				
		5 min	10 min	20 min	30 min	60 min
10 μM	518 nm	0,01	0,02	0,03	0,03	0,07
	420 nm	0,007	0,01	0,02	0,01	0,05
25 μM	518 nm	0,01	0,02	0,03	0,04	0,11
50 μM	518 nm	0,02	0,04	0,09	0,15	0,23
100 μM	518 nm	0,03	0,10	0,24	0,35	0,60
150 μM	518 nm	0,01	0,10	0,27	0,47	0,75
	420 nm	0,07	0,14	0,31	0,48	0,92

A capacidade do complexo RupPDIp em gerar $^1\text{O}_2$ após a imobilização no filme polimérico foi analisada. A irradiação de 420 nm do filme de RupPDIp ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em contato com uma solução de TMP-OH em D_2O também produziu os sinais atribuídos a formação do $^1\text{O}_2$ que aumentaram linearmente com a concentração de RupPDIp nos filmes, Figura 4.38, demonstrando que, assim como observado em solução, a concentração de $^1\text{O}_2$ gerado está relacionada com a concentração de complexo e apresenta um comportamento paralelo com o aumento da fosforescência relatado no tópico anterior, sugerindo que com uma maior população dos estados excitados ocorre o aumento da supressão pelo O_2 e, conseqüentemente, maior geração de $^1\text{O}_2$. Na ausência do complexo o filme não levou à formação de $^1\text{O}_2$.

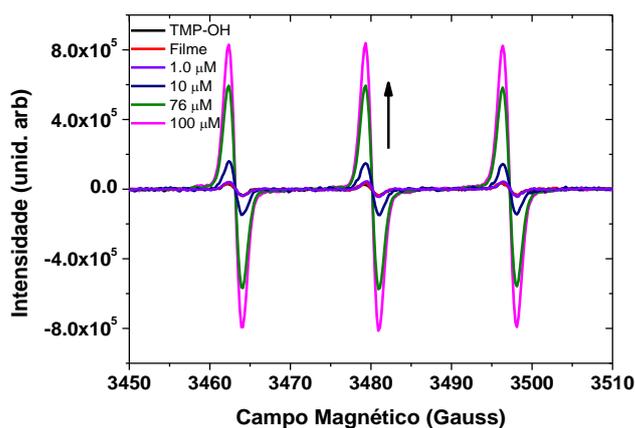


FIGURA 4.38 - Espectros de EPR com *spin trap* de soluções de TMP-OH (48 mmol.L^{-1}) em D_2O em contato com os filmes poliméricos de RupPDIp ($1,0$ a $100 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) após a irradiação com luz de 420 nm por 30 min .

Para comparação, os filmes em contato com o TMP-OH em solução tampão ($\text{pH } 7,4$) foram irradiados com luz de 420 nm , LED de 518 nm e com luz solar. A eficiência do RupPDIp em diferentes condições é demonstrada na Figura 4.39. Observa-se que o $^1\text{O}_2$ foi gerado em todas as condições analisadas. No entanto, a uma distância de $0,5 \text{ cm}$ do filme para a solução contendo TMP-OH não foi possível a detecção. Dessa forma, o método restringe a detecção apenas do $^1\text{O}_2$ gerado na superfície dos filmes, o que significa que um contato direto entre a solução e o filme é necessário.

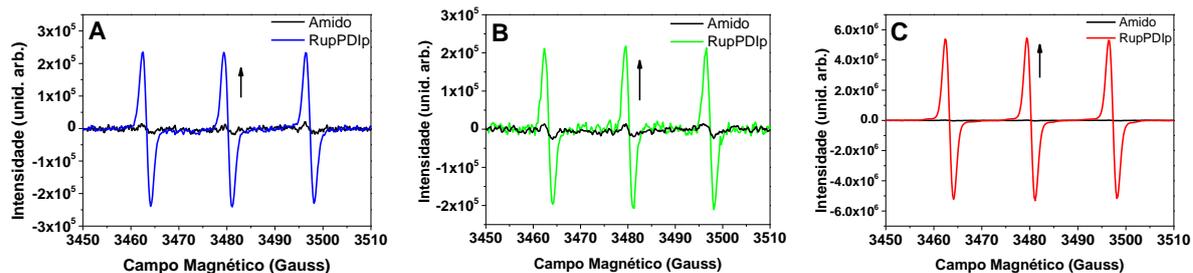


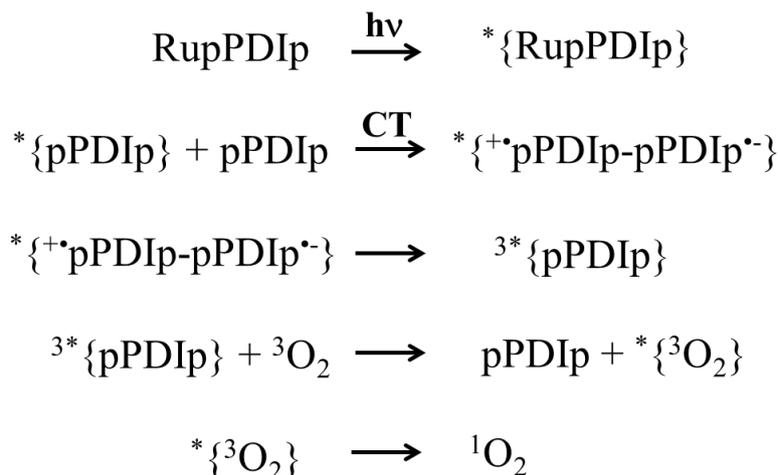
FIGURA 4.39 - Espectros de EPR com *spin trap* TMP-OH (48 mmol.L^{-1}) dos filmes poliméricos do RupPDIp ($100 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$) com as irradiações com (A) luz de 420 nm, (B) luz de LED de 518 nm e (C) luz solar, por 30 min. Filmes sem o complexo foram utilizados como controle.

Foram realizados ensaios de EPR utilizando o *spin trap* DMPO seguindo a mesma metodologia utilizada com o TMP-OH, e não foi observado a formação de outras EROs como o $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou o $\text{OH}^{\cdot-}$.

Nesta etapa do nosso trabalho é importante fazer um sumário dos resultados para uma conclusão que englobe os estudos realizados:

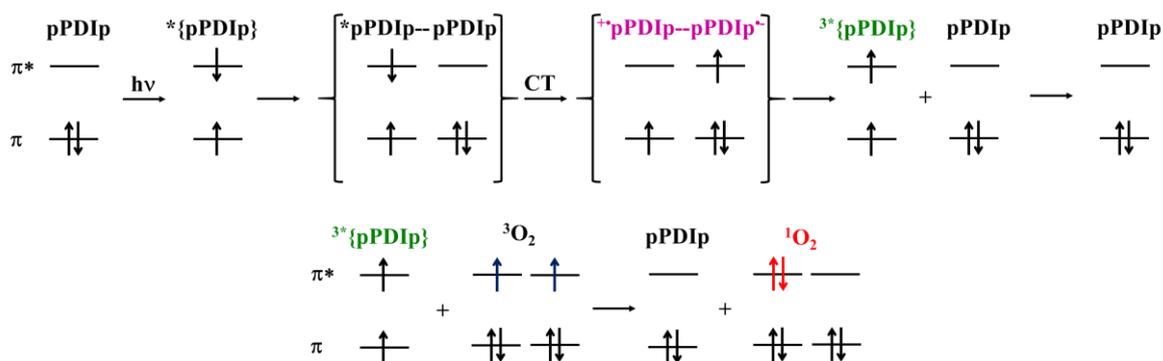
a) Supressão por O_2 – Em soluções do complexo desaeradas, a absorção do ânion radical $\text{pPDIp}^{\cdot-}$ no UV-Vis e no espectro de EPR aumenta de intensidade com a irradiação com luz. Em solução aerada ocorre um comportamento similar, porém em menor quantidade, demonstrando que a presença de O_2 no sistema está suprimindo a formação do estado de CT e consequentemente do $\text{pPDIp}^{\cdot-}$.

b) Os experimentos de EPR com TMP-OH mostram a formação do $^1\text{O}_2$ com a irradiação do complexo. A geração do $^1\text{O}_2$ ocorre através de um processo de transferência de energia do estado excitado tripleto da componente pPDIp ($^3\text{pPDIp}$) para o oxigênio molecular em seu estado fundamental, como representado no Esquema 4.1.



ESQUEMA 4.1 - Mecanismo proposto para a produção de ${}^1\text{O}_2$ a partir da ativação com luz do complexo RupPDIp.

Visualizando o esquema pela distribuição dos elétrons na forma de orbitais o mecanismo pode ser representado pelo Esquema 4.2.



ESQUEMA 4.2 - Mecanismo proposto em termos de orbitais moleculares para a produção de ${}^1\text{O}_2$ a partir da ativação com luz do complexo RupPDIp.

4.3 - Ensaios Biológicos

4.3.1 - Avaliação da citotoxicidade e da fotocitotoxicidade do complexo RupPDIp em células B16F10

A citotoxicidade e a fotocitotoxicidade do complexo RupPDIp *in vitro* na linhagem celular de melanoma murino B16F10 foi avaliada através do teste de viabilidade celular MTT.

4.3.1.1 - Citotoxicidade no escuro do RupPDIp

As células B16F10 incubadas no escuro expostas ao complexo nas concentrações de 10 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ durante 24h apresentaram valores de IC_{50} de 28 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As células incubadas no escuro sem o complexo mantidas como controle permaneceram viáveis. O complexo não mostrou-se citotóxico no escuro em concentrações até 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ nos períodos de incubação de 24 h, Figura 4.40. De fato, nenhuma alteração aparente na morfologia celular foi observada na presença do complexo nas concentrações de 0,1 a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, Figura 4.41, confirmando o efeito não citotóxico do complexo nesta faixa de concentração.

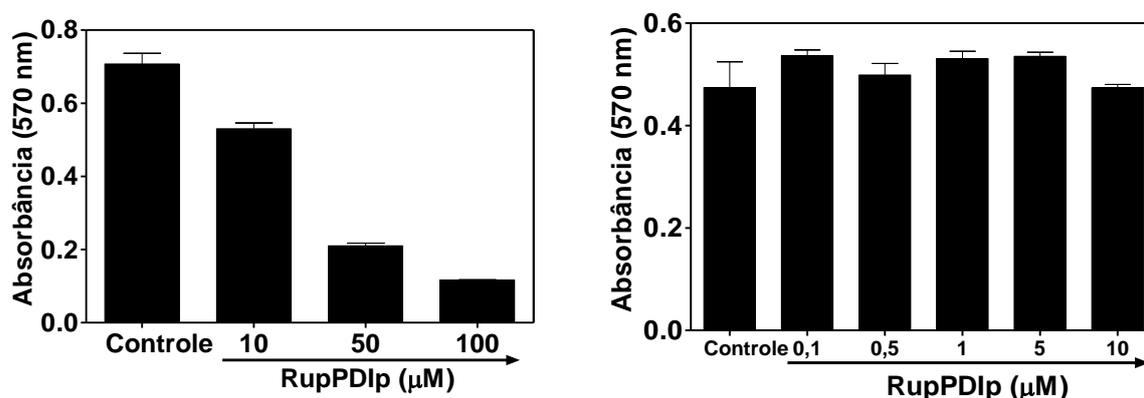


FIGURA 4.40 - Citotoxicidade no escuro do complexo RupPDIp (0,1 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em células B16F10 após 24 h de incubação. Células sem o complexo foram mantidas como controle.

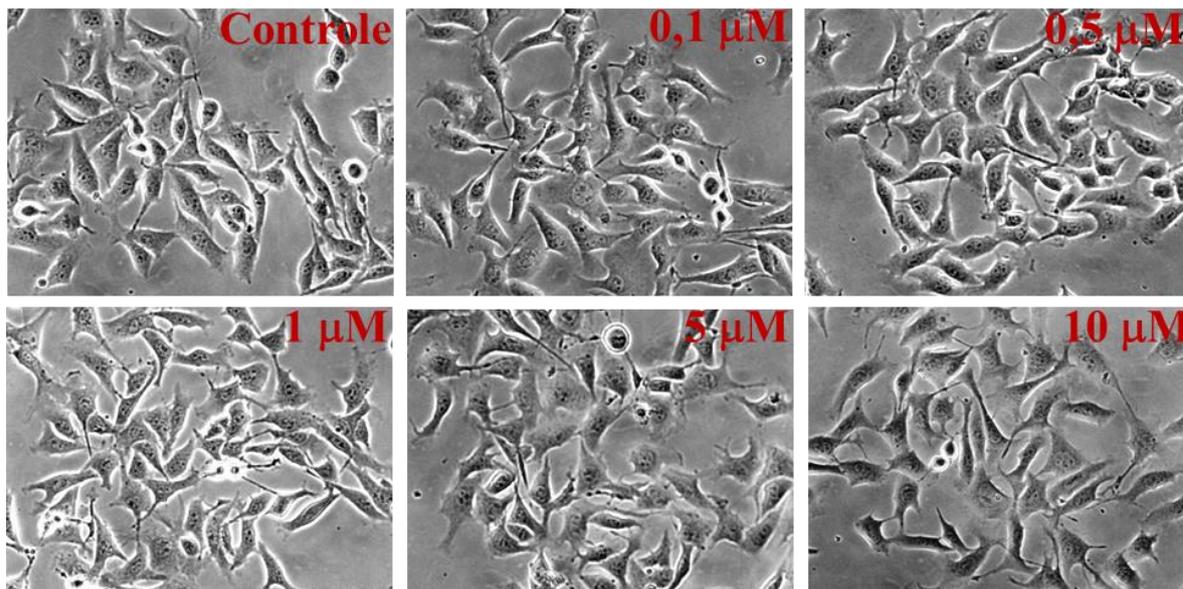


FIGURA 4.41 - Morfologia das células B16F10 incubadas com o complexo RupPDIp (0,1 a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 24h no escuro. Células sem o complexo foram mantidas como controle. Imagens obtidas através da técnica de contraste de fase com um microscópio invertido.

4.3.1.2 - Fotocitotoxicidade da luz de 420 nm

O efeito fotocitotóxico da luz azul UVA (420 - 400 nm) para o tratamento de tumores superficiais, incluindo a linhagem celular de melanoma B16F10, é bem relatado na literatura.⁷⁷⁻⁸¹ Por esta razão, inicialmente realizamos os experimentos para avaliar o efeito fotocitotóxico do nosso sistema de luz de 420 nm sob as células B16F10.

A exposição das células B16F10 a irradiação com luz de 420 nm (irradiância = $1,96 \text{ mW/cm}^2$) com as doses de luz de $0,58 \text{ J/cm}^2$ (5 min), $1,17 \text{ J/cm}^2$ (10 min) e $1,76 \text{ J/cm}^2$ (15 min), avaliada após 24h do tratamento induziu a um efeito fotocitotóxico dependente da dose, de modo que a porcentagem de sobrevivência celular variou de 92,8% ($\pm 0,01$) a 70,74% ($\pm 0,14$) na menor e na maior dose de luz, respectivamente, Figura 4.42A. As células mantidas no escuro foram utilizadas como controle. Ao aumentar a

dose de luz para $3,52 \text{ J/cm}^2$ (30 min) e avaliar a fotocitotoxicidade imediatamente ao tratamento com a luz, a porcentagem de sobrevivência das células foi de $74,85\% (\pm 0,02)$, demonstrando efeito fotocitotóxico imediato, Figura 4.42B.

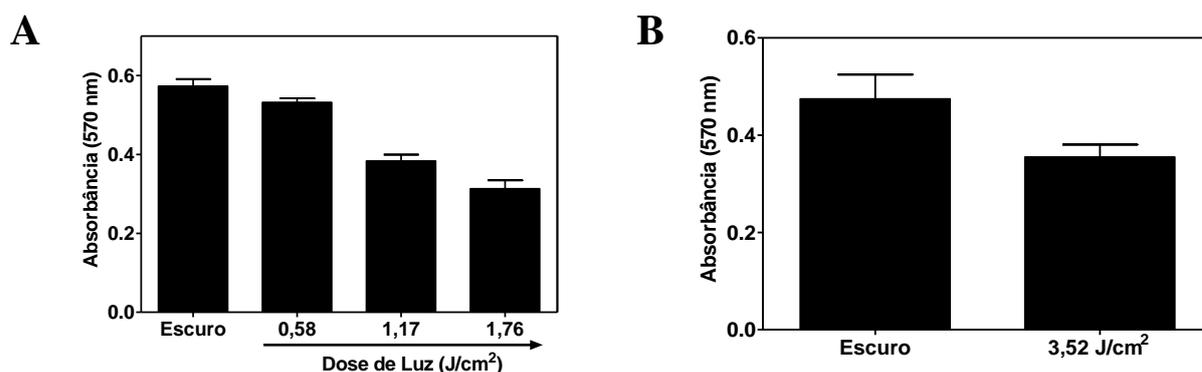


FIGURA 4.42 - Citotoxicidade das células B16F10 tratadas com luz de 420 nm (irradiância = $1,96 \text{ mW/cm}^2$) com as doses de (A) $0,58 \text{ J/cm}^2$ (5 min), $1,17 \text{ J/cm}^2$ (10 min) e $1,76 \text{ J/cm}^2$ (15 min), avaliada após 24h do tratamento com a irradiação e (B) de $3,52 \text{ J/cm}^2$ (30 min) avaliada imediatamente após o tratamento com a irradiação. As células mantidas no escuro foram utilizadas como controle.

4.3.1.3 - Fotocitotoxicidade do RupPDip com luz de 420 nm

O efeito fotocitotóxico na presença do complexo foi significativamente maior do que somente com a lâmpada. Após 4h de incubação com o RupPDip ($0,1$ a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$), as células foram irradiadas com luz de 420 nm com as doses de luz de $0,58 \text{ J/cm}^2$ (5 min), $1,17 \text{ J/cm}^2$ (10 min) e $1,76 \text{ J/cm}^2$ (15 min). A fotocitotoxicidade foi determinada após 24h do tratamento com as irradiações e está demonstrada na Figura 4.43. As células sem o complexo no escuro e tratadas com a irradiação foram mantidas como

controle. O IC_{50} obtido foi de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a dose de $0,58 \text{ J/cm}^2$. A curva de dose resposta está demonstrada na Figura 4.44.

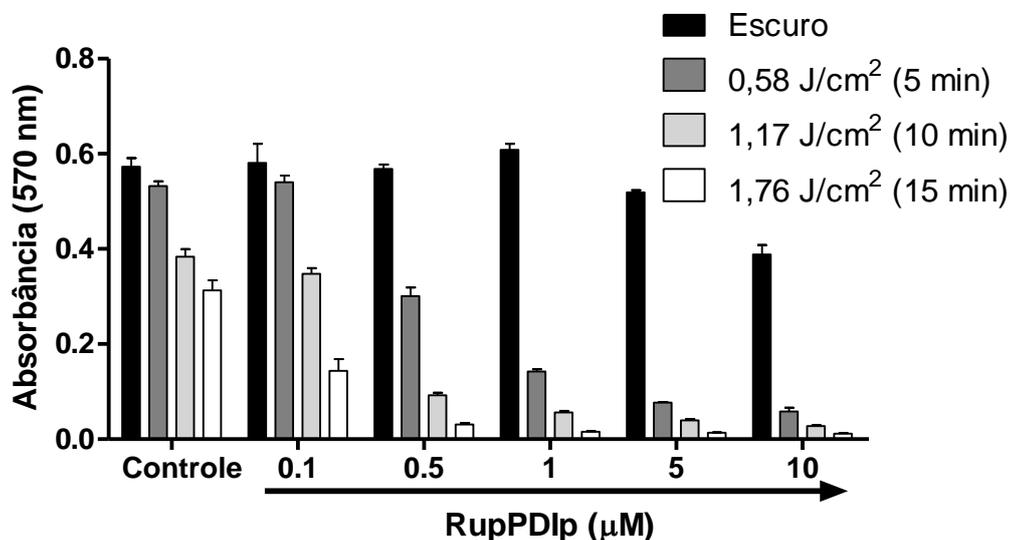


FIGURA 4.43 - Fotocitotoxicidade das células B16F10 incubadas com o complexo RupPDIp ($0,1$ a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) por 4h, seguida pelo tratamento com a irradiação de 420 nm com as doses de $0,58 \text{ J/cm}^2$ (5 min), $1,17 \text{ J/cm}^2$ (10 min) e $1,76 \text{ J/cm}^2$ (15 min), avaliada após 24h da irradiação. Células sem o complexo no escuro e irradiadas foram mantidas como controle.

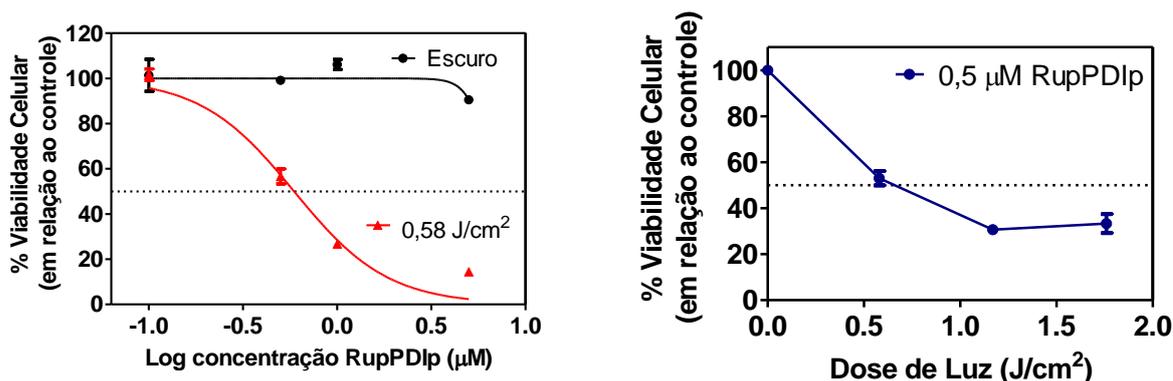


FIGURA 4.44 - Dose resposta da fotocitotoxicidade em função da concentração de complexo RupPDIp (esquerda) e da dose de luz de 420 nm (direita), avaliada pelo ensaio de MTT.

Ao aumentar a dose de luz para $3,52 \text{ J/cm}^2$ (30 min) o efeito fotocitotóxico do RupPDIp, analisando imediatamente após ao tratamento com a luz, levou a inibição de $\sim 100\%$ da viabilidade celular, Figura 4.45. Esses resultados demonstram que o complexo RupPDIp potencializa o efeito citotóxico da luz de 420 nm, gerando um efeito sinérgico.

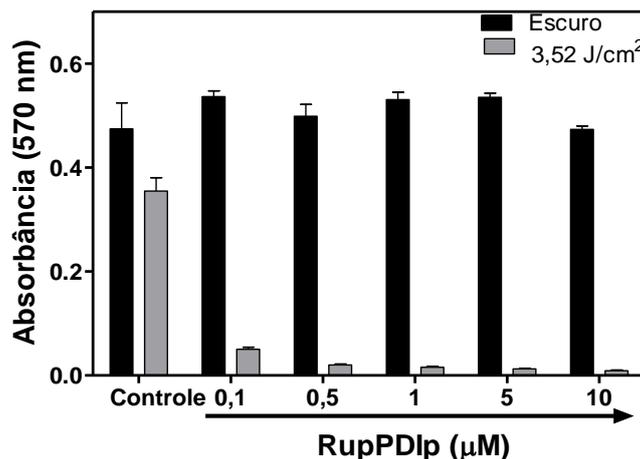


FIGURA 4.45 - Fotocitotoxicidade das células B16F10 incubadas com o complexo RupPDIp ($0,1$ a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) por 4h seguida pelo tratamento com a irradiação de 420 nm com a dose de $3,52 \text{ J/cm}^2$ (30 min), avaliada imediatamente após a irradiação. Células sem o complexo no escuro e irradiadas foram mantidas como controle.

A fim de avaliar a morfologia celular com o tratamento com o complexo RupPDIp e com a luz de 420 nm foram realizadas imagens das células nas placas de 96 poços com um microscópio invertido, imediatamente após o tratamento com a irradiação. A morfologia celular mudou drasticamente após irradiação com luz durante 5 e 30 min. Conforme mostrado na Figura 4.46, na presença de RupPDIp as células tornaram-se arredondadas, encolheram e exibiram perda expressiva de volume. Essas características fenotípicas são típicas de morte por apoptose.^{82,83,84}

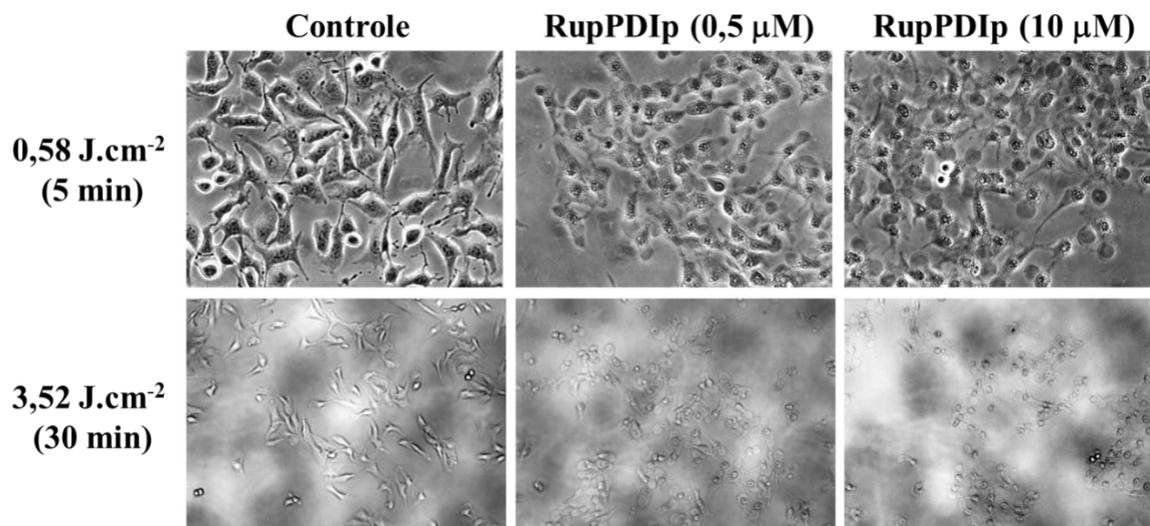


Figura 4.46 - Imagens no microscópio invertido das células B16F10 nas placas de 96 poços na ausência e na presença do complexo RupPDIp nas concentrações de 0,5 e 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, com irradiação com luz de 420 nm nas doses de 0,58 J/cm^2 e de 3,52 J/cm^2 , retiradas imediatamente após o tratamento com a irradiação.

4.3.1.4 - Citotoxicidade e fotocitotoxicidade com luz de 420 nm do complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$

O estudo de citotoxicidade também foi realizado com o complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ no escuro e com a irradiação com luz de 420 nm. Como demonstrado na Figura 4.47, o complexo precursor não apresentou citotoxicidade significativa frente as células B16F10. Dessa forma, o efeito terapêutico pode ser atribuído a coordenação do pPDIp no $\{\text{Ru}(\text{phen})_2\}^{2+}$.

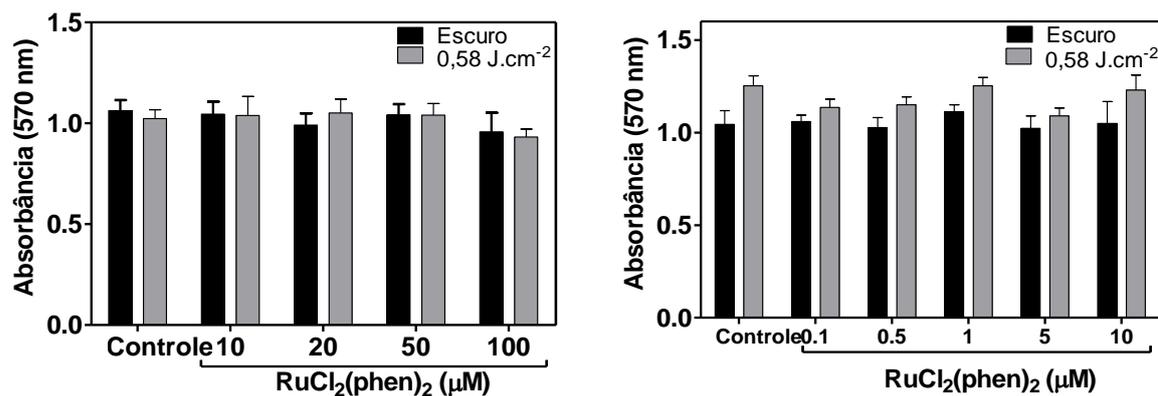


FIGURA 4.47 - Citotoxicidade e fotocitotoxicidade das células B16F10 incubadas com o complexo precursor $[\text{RuCl}_2(\text{phen})_2]$ (0,1 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 4h, no escuro e com a irradiação de 420 nm com a dose de 0,58 J/cm^2 (5 min), avaliada após 24h da irradiação.

4.3.1.5 - Fotocitotoxicidade da luz de LED de 518 nm

Apesar dos resultados fotocitotóxicos do RupPDIp com a luz de 420 nm em conjunto serem significativos, a emissão da lâmpada ocorre em uma região espectral onde diversas biomoléculas absorvem a radiação incidente (Figura 4.48), podendo levar a efeitos secundários indesejados de componentes celulares sadios. Dessa forma, buscamos utilizar luz com emissão em maior comprimento de onda e mais próxima da região espectral correspondente a janela fototerapêutica, na qual a membrana celular apresenta considerável transparência à radiação eletromagnética, minimizando os efeitos indesejados e melhorando a penetração da luz nos tecidos, como demonstrado na Figura 4.49.⁸⁵

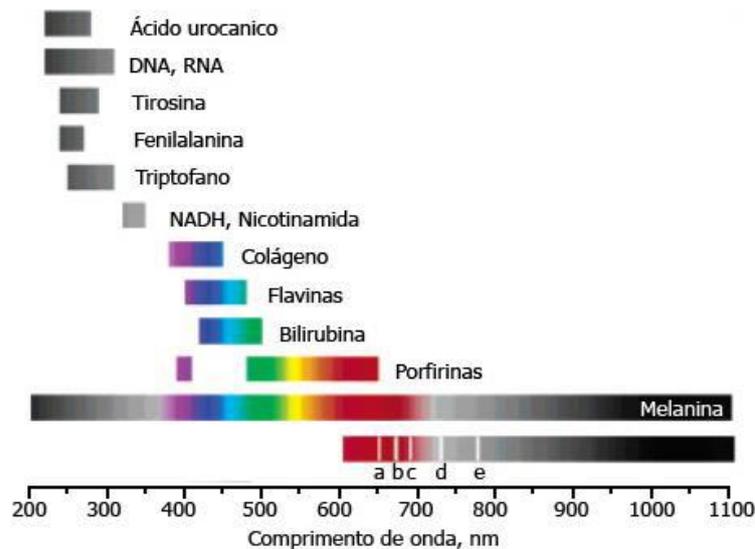


FIGURA 4.48 - Absorção de biomoléculas e janela fototerapêutica.⁸⁶

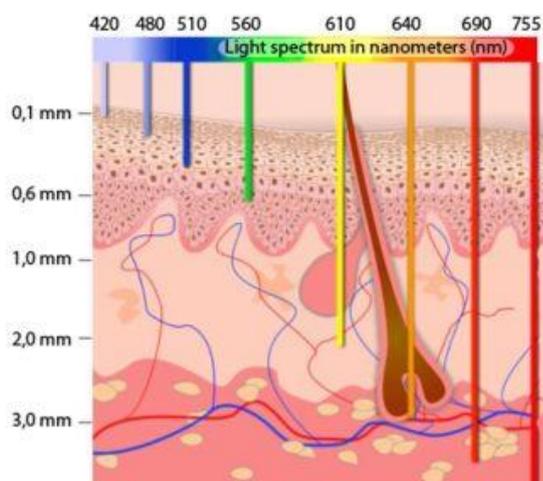


FIGURA 4.49 - Penetração da luz de diferentes comprimentos de onda nos tecidos.

A exposição das células B16F10 à irradiação com luz de 518 nm com as doses de $0,069 \text{ J/cm}^2$ (5 min), $0,20 \text{ J/cm}^2$ (15 min) e $0,41 \text{ J/cm}^2$ (30 min) avaliada após 24h do tratamento, não demonstrou efeito fotocitotóxico, Figura 4.50. As células mantidas no escuro foram utilizadas como controle.

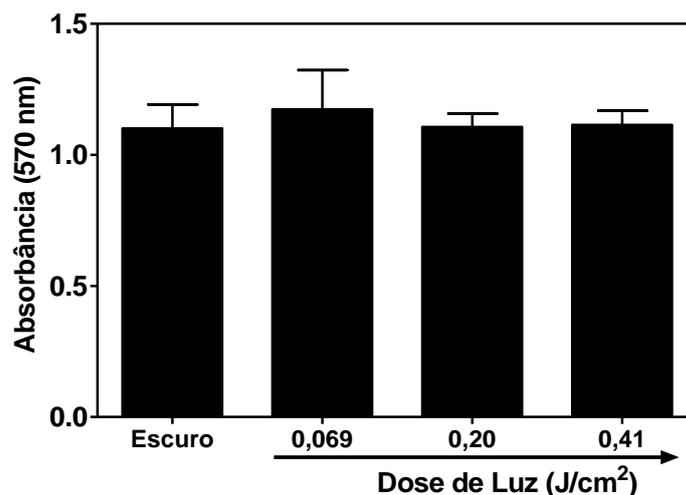


FIGURA 4.50 - Fotocitotoxicidade das células B16F10 tratadas com luz de 518 nm com as doses de 0,069 J/cm² (5 min), 0,20 J/cm² (15 min) e 0,41 J/cm² (30 min), avaliada após 24h do tratamento com a irradiação.

4.3.1.6 - Fotocitotoxicidade do RupPDIp com luz de LED de 518 nm

Após 4h de incubação com o RupPDIp (0,1 a 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), as células foram irradiadas com luz de 518 nm com as doses de luz de 0,069 J/cm² (5 min), 0,20 J/cm² (15 min) e 0,41 J/cm² (30 min). A fotocitotoxicidade foi determinada após 24h do tratamento com as irradiações e está demonstrada na Figura 4.51. As células sem o complexo no escuro e tratadas com a irradiação foram mantidas como controle. O efeito fotocitotóxico foi observado com o complexo em maiores doses de luz e o IC₅₀ obtido para a dose de 0,41 J/cm² foi de 1,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A curva de dose resposta é mostrada na Figura 4.52.

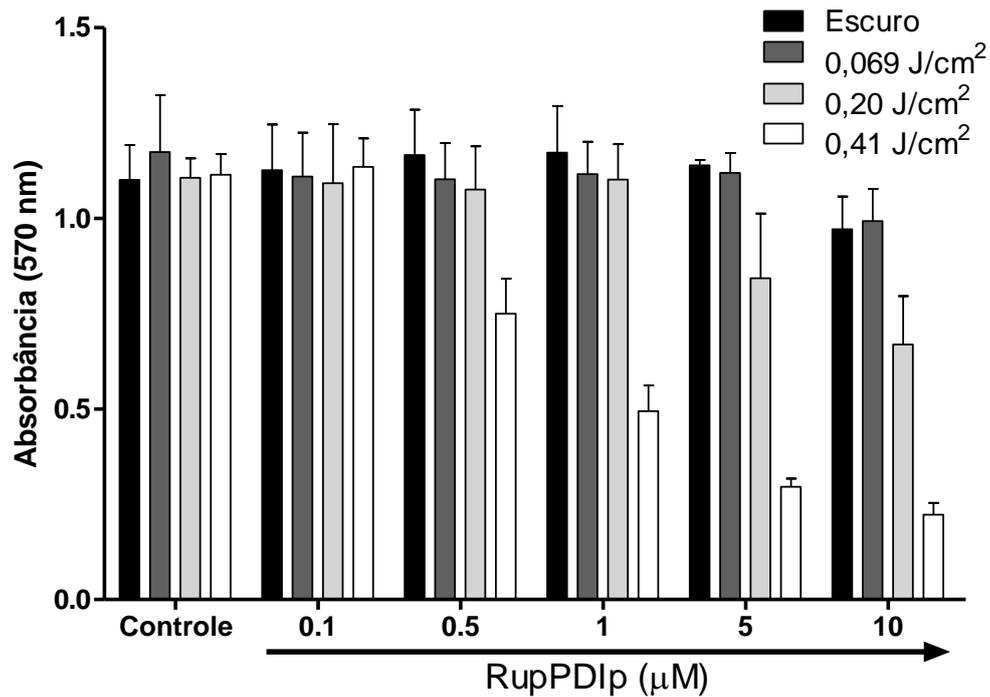


FIGURA 4.51 - Fotocitotoxicidade das células B16F10 incubadas com o complexo RupPDip (0,1 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por 4h seguida pelo tratamento com a irradiação de 518 nm com as doses 0,069 J/cm^2 (5 min), 0,20 J/cm^2 (15 min) e 0,41 J/cm^2 (30 min), avaliada após 24h da irradiação.

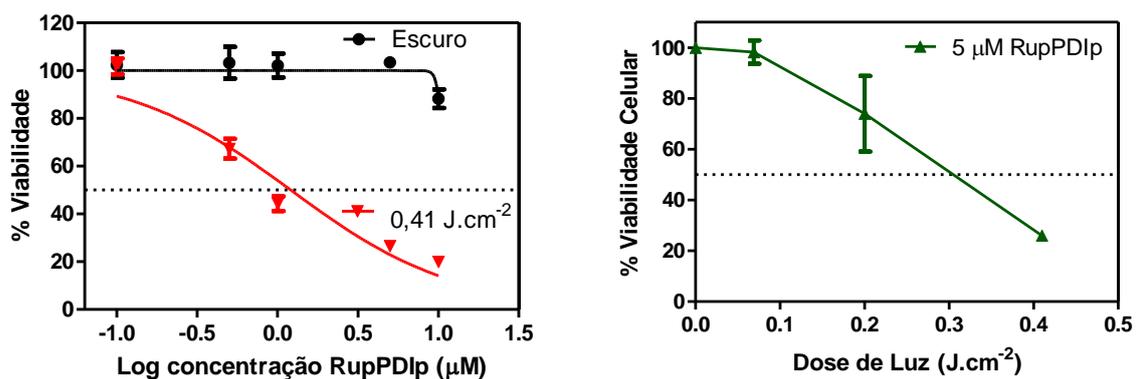


FIGURA 4.52 - Dose resposta da fotocitotoxicidade em função da concentração de complexo RupPDip (esquerda) e em função da dose de luz de LED de 518 nm (direita), avaliada pelo ensaio de MTT.

Os resultados fotocitotóxicos em células de melanoma murino B16F10 obtidos com o complexo RupPDIp apresentam valores superiores a diversos compostos propostos como fotossensibilizadores nesta linhagem celular (Tabela 4.4), inclusive em relação ao fármaco 5-ALA utilizado clinicamente na terapia de câncer.

TABELA 4.4 - Fotossensibilizadores testados *in vitro* para terapia fotodinâmica em células de melanoma murino B16.^{4,87-89}

Fotossensibilizador	Concentração	Luz	Dose	Inibição celular
RupPDIp	0,5 μM	Lâmpadas Rayonet 420 nm	0,58 J.cm^{-2}	50%
	1,2 μM	LED verde 518 nm	0,41 J.cm^{-2}	50%
5-ALA	0,3 mM	Laser Ar 514 nm	10 – 15 J.cm^{-2}	90%
Librium®	30 μM	Lâmpada de Xenônio 350 nm	0,79 J.cm^{-2}	50%
Azul de Metileno	25 μM	Red Diode Laser 650 nm	100 J.cm^{-2}	54,7%

4.3.1.7 - Fotocitotoxicidade do RupPDIp imobilizado no filme polimérico com luz de 420 nm

A viabilidade celular com o filme polimérico foi verificada pelo ensaio de MTT, sob diferentes tempos de tratamento com irradiação de 420 nm. Os filmes de RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e sem o complexo (controle) foram mantidos na superfície das placas de 96 poços, a uma distância de ~0,5 cm do sobrenadante. Como demonstrado na Figura 4.53, no escuro não houve efeito citotóxico nas condições analisadas. O tratamento com as irradiações

levou a um efeito fotocitotóxico na ausência do filme, como demonstrando anteriormente. Com o filme de RupPDIp o efeito fotocitotóxico foi menor em relação ao filme sem o complexo mantido como controle, demonstrando que filme com o complexo protege as células dos danos causados pela luz de 420 nm.

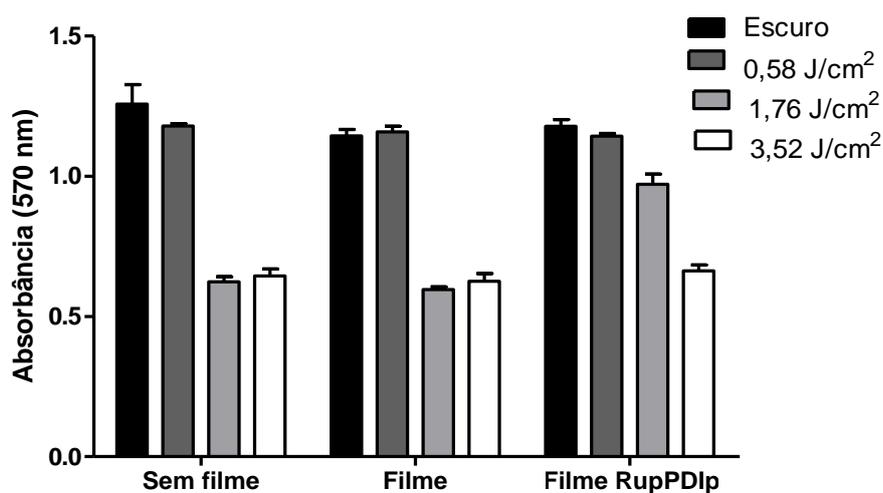


FIGURA 4.53 - Citotoxicidade e fotocitotoxicidade das células B16F10 com o filme polimérico com e sem o complexo RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) com tratamento com a irradiação de 420 nm, utilizando as doses de luz de $0,58 \text{ J/cm}^2$ (5 min), $1,76 \text{ J/cm}^2$ (5 min) e $3,52 \text{ J/cm}^2$ (5 min) e mantidas no escuro, avaliada após 24h do tratamento com a irradiação.

4.3.2 - Avaliação da atividade antitumoral *in vivo* do RupPDIp imobilizado no filme polimérico

As células B16F10 foram inoculadas no dorso de camundongos C57BL/6 e foram tratados topicamente com o filme de RupPDIp ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e sem o complexo (controle) sob irradiação com luz de 420 nm com uma dose diária de $3,52 \text{ J/cm}^2$ (30 min), Figura 4.54. Não houve alterações nos volumes e nos pesos tumorais dos controles e dos camundongos tratados

com o filme de RupPDIp. Como relatado anteriormente pelos ensaios de EPR, o raio de ação das EROs é limitado a região em que estão sendo formadas, não sendo capaz de se difundir em grandes distâncias. Como o modelo de administração tumoral utilizado neste estudo foi o modelo subcutâneo, as EROs produzidas pelos filmes de RupPDIp não foram capazes de ultrapassar as camadas da pele do camundongo e levar ao efeito antitumoral esperado.

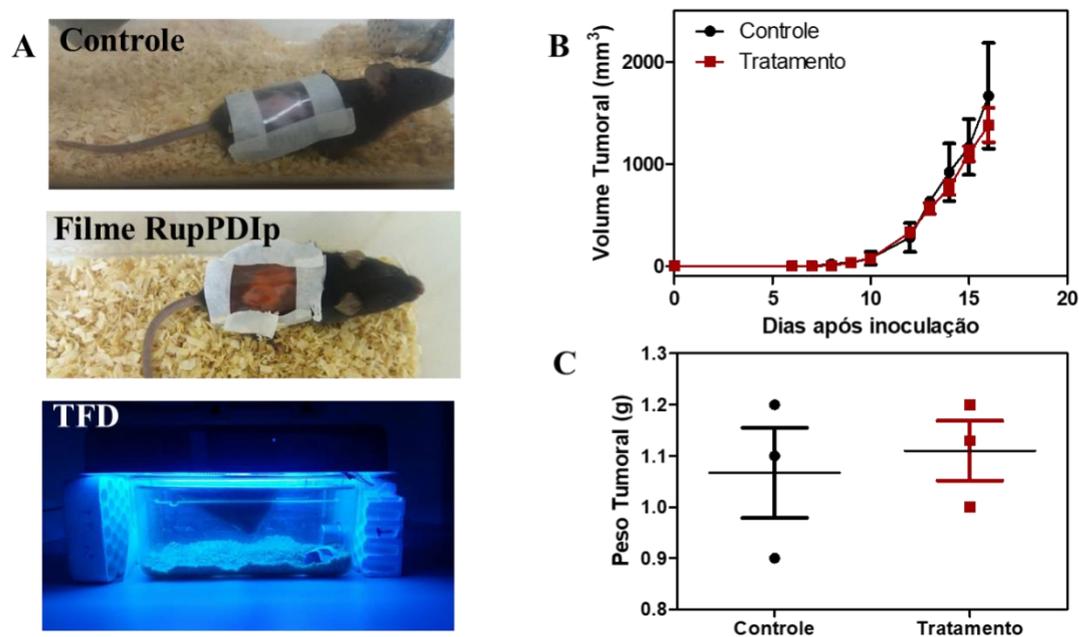


FIGURA 4.54 - (A) Fotos que mostram a avaliação do efeito terapêutico fotodinâmico utilizando os filmes poliméricos na ausência e na presença do complexo RupPDIp com a irradiação com luz de 420 nm. (B) Volume tumoral monitorado durante o tratamento. (C) Peso tumoral avaliado após 14 dias de tratamento.

5 - CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se chegar as seguintes conclusões:

- O comportamento fotoquímico e fotofísico do complexo RupPDIp em solução indicam que o DMSO promove uma grande separação entre as unidades de pPDIp no estado fundamental e estabiliza o estado excitado da transferência de carga (CT) $\{^+pPDip-pPDIp^-\}$ através de interações eletrostáticas. Em RPMI as interações $\pi-\pi$ no estado fundamental são favorecidas e a variação do comprimento de onda de irradiação é utilizada para sintonizar as energias com o estado MLCT de uma maneira que leva à formação do ânion radical pPDIp $^{\cdot-}$ e do diânion pPDIp $^{2-}$. Em contraste, em solução tampão a agregação é significativa e impede o processo fotoquímico.

- O RupPDIp em solução ativou o oxigênio singleto (1O_2) com a irradiação com luz azul (420 nm, $I = 1,96 \text{ mW/cm}^2$) e LED verde (518 nm, $I = 0,23 \text{ mW/cm}^2$), em condições brandas, sem saturação de O_2 .

- Os resultados obtidos exibiram um perfil interessante para atividade biológica em células de melanoma murino da linhagem B16F10, sem indícios de citotoxicidade no escuro em concentrações abaixo de $10 \mu\text{M}$ enquanto que quando fotoativado apresentou efeito fotocitotóxico com IC_{50} de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com a luz de 420 nm com dose de $0,58 \text{ J/cm}^2$ e de $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ com a luz de LED de 518 nm com a dose de $0,41 \text{ J/cm}^2$. É importante ressaltar que o RupPDIp apresentou resultados mais promissores em relação ao resultados do fármaco comercial 5-ALA utilizado na TFD clínica frente à linhagem celular de melanoma murino, colocando este complexo como um candidato em potencial para o tratamento deste tipo de câncer.

- Quando imobilizado no filme polimérico, o RupPDIp manteve suas propriedades luminescentes, com característica de agregados e permitiu a detecção do estado excitado 3pPDIp favorecido. Também manteve a característica de ativação do 1O_2 com as irradiações. Porém, os ensaios biológicos com os filmes *in vitro* e *in vivo* não foram promissores devido ao

raio de ação limitado do $^1\text{O}_2$ para o estudo in vivo realizado neste trabalho e devido a lixiviação do complexo da matriz polimérica.

Os estudos realizados nesta dissertação demonstram que o complexo pode ser um bom sensibilizador para produção de oxigênio singlete e de radical superóxido sob irradiação com luz. Além disso, este complexo só precisa de água e luz visível para ativar o oxigênio aos estados excitados. Isso abre a oportunidade de aplicação em diversas áreas da ciência tais como terapia fotodinâmica e no tratamento de água residencial contaminada com microrganismos patogênicos.

6 - REFERÊNCIAS

1. APALLA, Z.; NASHAN, D.; WELLER, R. B. & CASTELLSAGUÉ, X. "Skin cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches". *Dermatol. Ther. (Heidelb)*., **7**, 5–19, 2017.
2. AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts and Figures 2018*. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2018.
3. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ GOMES DA SILVA. *Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2018*. Disponível em: < <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>> . Acesso em: 07 fev. 2018.
4. (A) BOWDEN, G. T. "Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signaling". *Nat Rev Cancer*., **4** (1): 23-35, 2004. (B) DAVIDS, L. M. & KLEEMANN, B. "Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant tool". *Cancer Treatment Reviews* **37**, 465-475, 2011.
5. ROWE, D. E.; CARROLL, R. J. & DAY, C. L. JR. "Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip: implications for treatment modality selection". *J. Am. Acad. Dermatol.*, **26** (6): 976-990, 1992.
6. DUMMER, R.; HAUSCHILD, A.; GUGGENHEIM, M.; KEILHOLZ, U. & PENTHEROUDAKIS, G. "Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up". *Annals of Oncology*, **26** (5): 126-132, 2015.
7. MCKIE, R. M. "Incidence, risk factors and prevention of melanoma". *Eur. J.Cancer*, **34** (3): S3-6, 1998.
8. HALPERN, A. & ALTMAN, J. "Genetic predisposition to skin cancer". *Curr. Opin. Oncol.*, **11** (2): 132-138, 1999.
9. YAMAMURA, H.; UGAWA, S.; UEDA, T.; MORITA, A. & SIMADA, S. "TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma". *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **295** (2): C296-301, 2008.
10. FRANKLIN, C.; LIVINGSTONE, E.; ROESCH, A.; SCHILLING, B. & SCHADENDORF, D. "Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions". *European Journal of Surgical Oncology*, **43** (3): 604-611, 2017.

11. LO, J. A. & FISHER, D. E. “The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics”. *Science*, **346**, 945–949, 2014.
12. GEORGE, D. D.; ARMENIO, V. A. & KATZ, S. C. “Combinatorial immunotherapy for melanoma”. *Cancer Gene Therapy*, **24**, 141-147, 2017.
13. RESNIER, P.; LEQUINIO, P.; LAUTRAM, N.; ANDRÉ, E.; GAILLARD, C.; BASTIAT, G.; BENOIT, J.-P. & PASSIRANI, C. “Efficient in vitro gene therapy with PEG siRNA lipid nanocapsules for passive targeting strategy in melanoma”. *Biotechnology Journal*, **9** (11): 1389-1401, 2014.
14. BITEGHE, F. A. N. & DAVIDS, L. M. “A combination of photodynamic therapy and chemotherapy displays a differential cytotoxic effect on human metastatic melanoma cells”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **166**, 18-27, 2017.
15. KAWCZYK-KRUPKA, A.; BUGAJ, A. M.; LATOS, W.; ZAREMBA, K. & SIERON, A. “Photodynamic therapy in treatment of cutaneous and choroidal melanoma”. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **10** (4): 503-9, 2013.
16. CHRISTENSEN, E.; MØRK, C. & SKOGVOLL, E. “High and sustained efficacy after two sessions of topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for basal cell carcinoma: a prospective, clinical and histological 10-year follow-up study”. *Br. J. Dermatol.*, **166** (6):1342–1348, 2012.
17. ALLISON, R. R. & SIBATA C. H. “Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review”. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **7** (2): 61-75, 2010.
18. BRAATHEN, L. R.; SZEIMIES, R. M.; BASSET-SEGUIN, N.; BISSONNETTE, R.; FOLEY, P.; PARISER, D.; ROELANDTS, R.; WENNBERG, A. M.; MORTON, C. A. & INTERNATIONAL SOCIETY FOR PHOTODYNAMIC THERAPY IN DERMATOLOGY. “Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005”. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **56** (1):125-43, 2007.
19. ARITS, A. H.; MOSTERD, K.; ESSERS, B. A.; SPOORENBERG, E.; SOMMER, A.; DE ROOIJ, M. J.; VAN PELT, H. P.; QUAEDVLIEG, P. J.; KREKELS, G. A.; VAN NEER, P. A.; RIJZEWIJK, J. J.; VAN GEEST, A. J.; STEIJLEN, P. M.; NELEMANS, P. J. & KELLENERS-SMEETS, N. W. “Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: a single blind, non-inferiority, randomised controlled trial”. *Lancet Oncol.*, **14** (7): 647-54, 2013.
20. SAVOIA, P.; DEBOLI, T.; PREVIGLIANO, A. & BROGANELLI, P. “Usefulness of photodynamic therapy as a possible therapeutic alternative in

the treatment of basal cell carcinoma” *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (10): 23300–23317, 2015.

21. WAN, M. T. & LIN, J. Y. “Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology”. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.*, 7, 145–163, 2014.

22. ISSA, M. & MANELA-AZULAY, M. “Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation”. *An. Bras. Dermatol.*, 85 (4): 501 – 511, 2010.

23. AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R. JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KOBERLIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. & GOLAB, J. “Photodynamic therapy of cancer: an update”. *CA Cancer J. Clin.*, 61 (4): 250-281, 2011.

24. CHAVANTES, M. C. “Laser em bio-medicina: princípios e aplicações”. São Paulo, Editora Atheneu, 2009.

25. CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N. & HAMBLIN, M. R. “Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization”. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 1 (4): 279-93, 2004.

26. MARI, C.; PIERROZ, V.; FERRARI, S. & GASSER, G. “Combination of Ru (II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy”. *Chem. Sci.*, 6 (5): 2660-2686, 2015.

27. JOSEFEN, L. B. & BOYLE, R. W. “Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met. Based Drugs*, 2008, 276109, 2008.

28. COSGAREA, R.; SUSAN, M.; CRISAN, M. & SENILA, S. “Photodynamic therapy using topical 5-aminolaevulinic acid vs. surgery for basal cell carcinoma”. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 27 (8):980-984, 2013.

29. SAINI, R.; LEE, N. V.; LIU, K. Y. P. & POH, C. F. “Prospects in the application of photodynamic therapy in oral cancer and premalignant lesions”. *Cancers (Basel)*, 8 (9): 83, 2016.

30. SIMONE, B. C.; MAZZONE, G.; RUSSO, N.; SICILIA, E. & TOSCANO, M. “Metal Atom Effect on the Photophysical Properties of Mg(II), Zn(II), Cd(II), and Pd(II) Tetraphenylporphyrin Complexes Proposed as Possible Drugs in Photodynamic Therapy”. *Molecules*, 22 (7): E1093, 2017.

31. ROSTAMI, M.; RAFIEE, L.; HASSANZADEH, F.; DADRASS, A. R. & KHODARAHMI, G. A. "Synthesis of some new porphyrins and their metalloderivatives as potential sensitizers in photo-dynamic therapy". *Res. Pharm. Sci.*, 10 (6): 504-513, 2015.
32. ZENG, L.; CHEN, Y.; LIU, J.; HUANG, H.; GUAN, R.; JI, L. & CHAO, H. "Ruthenium(II) complexes with 2-phenylimidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline derivatives that strongly combat cisplatin-resistant tumor cells". *Scientific Reports*, 6, 19449, 2016.
33. CARDOSO, C. R.; LIMA, M. V. S.; CHELESKI, J.; PETERSON, E. J.; VENÂNCIO, T.; FARRELL, N. P. & CARLOS, R. M. "Luminescent ruthenium complexes for theranostic applications". *J. Med. Chem.*, 57 (11): 4906-4915, 2014.
34. HUMMER, A. A.; HEFFETER, P.; BERGER, W.; FILIPITS, M.; BATCHELOR, D.; BÜCHEL, G. E.; JAKUPEC, M. A.; KEPPLER, B. K. & ROMPEL, A. "X-ray absorption near edge structure spectroscopy to resolve the *in vivo* chemistry of the redox-active indazolium trans-tetrachlorobis(1Hindazole)ruthenate(III) (KP1019)". *J. Med. Chem.*, 56 (3): 1182-1196, 2013.
35. ANTONARAKIS, E. S. & EMADI, A. "Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?". *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 66 (1): 1-9, 2010.
36. SCHMITT, F.; GOVINDASWAMY, P.; SÜSS-FINK, G.; ANG, W. H.; DYSON, P. J.; JULLERAT-JEANNERET, J. & THERRIEN, B. "Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer". *J. Med. Chem.*, 51 (6): 1811-1816, 2008.
37. O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M. & BYRNE, A. T. "Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy". *Photochem. Photobiol.*, 85 (5): 1053-74, 2009.
38. ZHANG, J. X.; ZHOU, J. W.; CHAN, C. F.; LAU, T. C. K.; KWONG, D. W. J.; TAM, H. L.; MAK, N. K.; WONG, K. L. & WONG, W. K. "Comparative studies of the cellular uptake, subcellular localization, and cytotoxic and phototoxic antitumor properties of ruthenium(II)-porphyrin conjugates with different linkers". *Bioconjugate Chem.*, 23 (8): 1623-1638, 2012.
39. SCHATZSCHNEIDER, U. "Photoactivated biological activity of transition-metal complexes". *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010 (10): 1451-1467, 2010.

40. SANTOS, E. R.; PINA, J.; VENÂNCIO, T.; SERPA, C.; MARTINHO, J. M. G. & CARLOS, R. M. "Photoinduced energy and electron-transfer reactions by polypyridine ruthenium(II) complexes containing a derivatized perylene diimide" *J. Phys. Chem. C*. 120 (40): 22831-22843, 2016.
41. BONNET, R. "Chemical aspects of photodynamic therapy". Gordon and Breach Science: Amsterdam, 2000.
42. BONNET, R. & MARTINEZ, G. "Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy". *Tetrahedron*, **57**, 9513-9547, 2001.
43. KILLORAN, J.; ALLEN, L.; GALLAGHER, J. F.; GALLAGHER, W. M. & O'SHEA, D. F. "Synthesis of BF₂ chelates of tetraarylazadipyrromethenes and evidence for their photodynamic therapeutic behavior". *Chem Commun (Camb)*., 7 (17): 1862-3, 2002.
44. GORMAN, A.; KILLORAN, J.; O'SHEA, C.; GALLAGHER, W. M. & O'SHEA, D. F. "In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy". *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (34): 10619-10631, 2004.
45. ZHAO, Y. & WASIELEWSKI, M. R. "3,4: 9,10-Perylenebis(dicarboximide) chromophores that function as both electron donors and acceptors". *Tetrahedron Letters*, 40 (39): 7047-7050, 1999.
46. YUKRUK, F.; DOGAN, A. L.; CANPINAR, H.; GUC, D. & AKKAYA, E. U. "Water-soluble green perylenediimide (PDI) dyes as potential sensitizers for photodynamic therapy". *Org. Lett.*, 7 (14): 2885-2887, 2005.
47. KAISER, T. E.; STEPANENKO, V. & WÜRTHNER, F. "Fluorescent J-aggregates of core-substituted perylene bisimides: studies on structure-property relationship, nucleation-elongation mechanism, and sergeants-and-soldiers principle". *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (19): 6719-6732, 2009.
48. SALAVAGIONE, H. J.; MARTÍNEZ, G.; GÓMEZ, R. & SEGURA, J. L. "Synthesis of water-soluble perylenediimide-functionalized polymer through esterification with poly(vinyl alcohol)". *J. Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 48 (16): 3613-3622, 2010.
49. JÚNIOR, A. C. R. Reatividade química de um novo nitrosilsulfito complexo *trans*-[Ru(NH₃)₄(isn)(N(O)SO₃)](PF₆), e desenvolvimento de filmes de amido doadores de óxido nítrico. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – IQSC-USP, 2015. Tese de doutorado, 175 p.
50. DWIVEDI, A. K.; PANDEESWAR, M. & GOVINDARAJU, T. "Assembly modulation of PDI derivative as a supramolecular fluorescence switching probe for detection of cationic surfactant and metal ions in aqueous media". *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6 (23): 21369-21379, 2014.

51. ECHUE, G.; LLOYD-JONES, G. C. & FAUL, C. F. J. "Chiral perylene diimides: building blocks for ionic self-assembly". *Chem. Eur. J.*, 21 (13): 5118-5128, 2015.
52. JIAO, Y.; LIU, K.; WANG, G.; WANG, Y. & ZHANG, X. "Supramolecular free radicals: near-infrared organic materials with enhanced photothermal conversion". *Chem. Sci.*, 6 (7): 3975-3980, 2015.
53. SCHMIDT, D.; BIALAS, D. & WÜRTHNER, F. "Ambient stable zwitterionic perylene bisimide-centered radical". *Angew. Chem., Int. Ed.*, 54 (12): 3611-3614, 2015.
54. BALAKRISHNAN, K.; DATAR, A.; NADDO, T.; HUANG, J.; OITKER, R.; YEN, M.; ZHAO, J. & ZANG, L. "Effect of side-chain substituents on self-assembly of perylene diimide molecules: morphology control". *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (22): 7390-7398, 2006.
55. ARULKASHMIR, A.; JAIN, B.; JOHN, J. C.; ROYA, K. & KOTHANDAM, K. "Chemically doped perylene diimide lamellae based field effect transistor with low operating voltage and high charge carrier mobility". *Chem. Commun.*, 50 (3): 326-328, 2014.
56. KANG, R.; MIAO, R.; QI, Y.; CHANG, X.; SHANG, C.; WANG, L. & FANG, Y. "Tuning the formation of reductive species of perylene-bisimide derivatives in DMF via aggregation matter". *Chem. Commun.*, 53 (72): 10018-10021, 2017.
57. SONG, Q.; LI, F.; WANG, Z. & ZHANG, X. "A supramolecular strategy for tuning the energy level of naphthalenediimide: promoted formation of radical anions with extraordinary stability". *Chem. Sci.*, 6 (6): 3342-3346, 2015.
58. GUHA, S.; GOODSON, F. S.; CORSON, L. J. & SAHA, S. "Boundaries of anion/naphthalenediimide interactions: from anion- π interactions to anion-induced charge-transfer and electron-transfer phenomena". *J. Am. Chem. Soc.*, 134 (33): 13679-13691, 2012.
59. CHEN, Z. J.; STEPANENKO, V.; DEHM, V.; PRINS, P.; SIEBBELES, L. D. A.; SEIBT, J.; MARQUETAND, P.; ENGEL, V. & WÜRTHNER, F. "Photoluminescence and conductivity of self-assembled π - π stacks of perylene bisimide dyes". *Chem. Eur. J.*, 13 (2): 436-449, 2007.
60. GÖRL, D.; ZHANG, X. & WÜRTHNER, F. "Molecular assemblies of perylene bisimide dyes in water". *Ang. Chem.*, 51 (26): 6328-6348, 2012.
61. GIAIMO, J. M.; LOCKARD, J. V.; SINKS, L. E.; SCOTT, A. M.; WILSON, T. M. & WASIELEWSKI, M. R. "Excited singlet states of covalently bound, cofacial dimers and trimers of perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide)s". *J. Phys. Chem. A*, 112 (11): 2322-2330, 2008.

62. LEFLER, K. M.; BROWN, K. E.; SALAMANT, W. A.; DYAR, S. M.; KNOWLES, K. E. & WASIELEWSKI, M. R. "Triplet state formation in photoexcited slip-stacked perylene-3,4:9,10-bis(dicarboximide) dimers on a xanthene scaffold". *J. Phys. Chem. A.*, 117 (40):10333-45, 2013.
63. WANG, X. Y.; GUERZO, A. D. & SCHMEHL, R. H. "Photophysical behavior of transition metal complexes having interacting ligand localized and metal-to-ligand charge transfer states". *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 5 (1): 55-77, 2004.
64. EL-KHOULY, M. E.; ITO, O.; SMITH, P. M. & D'SOUZA, F. "Intermolecular and supramolecular photoinduced electron transfer processes of fullerene-porphyrin/phthalocyanine systems". *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 5 (1): 79-104, 2004.
65. SPANO, F. C. "The spectral signatures of Frenkel polarons in H- and J-aggregates". *Acc. Chem. Res.*, 43 (3): 429-39, 2010.
66. CHE, Y.; DATAR, A.; YANG, X.; NADDO, T.; ZHAO, J. & ZANG L. "Enhancing one-dimensional charge transport through intermolecular π -electron delocalization: conductivity improvement for organic nanobelts". *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (20): 6354-6355, 2007.
67. WILSON, T. M.; TAUBER, M. J. & WASIELEWSKI, M. R. "Toward an n-type molecular wire: electron hopping within linearly linked perylenediimide oligomers". *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (25): 8952-8957, 2009.
68. WILSON, T. M.; ZEIDAN, T. A.; HARIHARAN, M.; LEWIS, F. D. & WASIELEWSKI, M. R. "Electron hopping among cofacially stacked perylenediimides assembled by using DNA hairpins". *Angew. Chem., Int. Ed.*, 49 (13): 2385-2388, 2010.
69. (A) WU, Y.; YOUNG, R. M.; FRASCONI, M.; SCHNEEBELI, S. T.; SPENST, P.; GARDNER, D. M.; BROWN, K. E.; WGRTHNER, F.; STODDART, J. F. & WASIELEWSKI, M. R. "Ultrafast photoinduced symmetry-breaking charge separation and electron sharing in perylenediimide molecular triangles". *J. Am. Chem. Soc.*, 137 (41): 13236-13239, 2015. (B) SCHUSTER, N. J.; PALEY, D. W.; JOCKUSCH, S.; NG, F.; STEIGERWALD, M. L. & NUCKOLLS, C. "Electron delocalization in perylene diimide helicenes". *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 55 (43): 13519-13523, 2016.
70. HARTNETT, P. E.; DYAR, S. M.; MARGULIES, E. A.; SHOER, L. E.; COOK, A. W.; EATON, S. W.; MARKS, T. J. & WASIELEWSKI, M. R. "Long-lived charge carrier generation in ordered films of a covalent perylenediimide-diketopyrrolopyrrole-perylenediimide molecule". *Chem. Sci.*, 6, 402-411, 2015.

71. LION, Y.; DELMELLE, M. & VAN DE VORST, A. "New method of detecting singlet oxygen production". *Nature*, **263**, 442-443, 1976.
72. HUANG, H.; ZHANG, P.; YU, B.; JIN, C.; JI, L. & CHAO, H. "Synthesis, characterization and biological evaluation of mixed-ligand ruthenium(II) complexes for photodynamic therapy". *Dalton Trans*, 44 (39): 17335-45, 2015.
73. MOAN, J. & WOLD, E. "Detection of singlet oxygen production by ESR". *Nature*, **279**, 450-451, 1979.
74. NAKAMURA, K.; ISHIYAMA, K.; IKAI, H.; KANNO, Y.; SASAKI, K.; NIWANO, Y. & KOHNO, M. "Reevaluation of analytical methods for photogenerated singlet oxygen". *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 49 (2): 87-95, 2011.
75. PRASAD, A.; FERRETTI, U.; SEDLÁŘOVÁ, M. & POSPÍŠIL, P. "Singlet oxygen production in *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress". *Scientific Reports*, **6**, 20094, 2016.
76. (A) VALKOV, A.; NAKONECHNY, F. & NISNEVITCH, M. "Polymer-immobilized photosensitizers for continuous eradication of bacteria". *Int. J. Mol. Sci.*, 15 (9): 14984-96, 2014. (B) SUBRAMANIAN, G.; PARAKH, P. & PRAKASH, H. "Photodegradation of methyl orange and photoinactivation of bacteria by visible light activation of persulphate using a tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) complex". *Photochem. Photobiol Sci.*, 12 (3): 456-66, 2013. (C) SUBRAMANIAN, G.; PARAKH, P. & PRAKASH, H. "Visible light water disinfection using [Ru(bpy)₂(phendione)](PF₆)₂·2H₂O and [Ru(phendione)₃]Cl₂·2H₂O complexes and their effective adsorption onto activated carbon". *Sep. Purific. Technol.*, **109**, 9-17, 2013. (D) LEI, W.; ZHOU, Q.; JIANG, G.; ZHANG, B. & WANG, X. "Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by Ru(II) complexes". *Photochem Photobiol Sci.*, 10 (6): 887-90, 2011. (E) LIU, Y.; HAMMITT, R.; LUTTERMAN, D. A.; JOYCE, L. E.; THUMMEL, R. P. & TURRO, C. "Ru(II) Complexes of New Tridentate Ligands: Unexpected High Yield of Sensitized ¹O₂". *Inorg. Chem.* 48 (1): 375-385, 2009.
77. GE, J.; WOOD, D. K.; WEINGEIST, D. M.; PRASONGTANAKIJ, S.; NAVASUMRIT, P.; RUCHIRAWAT, M. & ENGELWARD, B. P. "Standard fluorescent imaging of live cells is highly genotoxic". *Cytometry A*, 83 (6): 552-560, 2013.
78. SPARSA, A.; FAUCHER, K.; SOL, V.; DUROX, H.; BOULINGUEZ, S.; DOFFOEL-HANTZ, V.; CALLISTE, C. A.; COOK-MOREAU, J.; KRAUSZ, P.; STURTZ, F. G.; BEDANE, C.; JAUBERTEAU-MARCHAN, M. O.; RATINAUD, M. E. & BONNETBLANC, J. M. "Blue light is phototoxic for B16F10 murine melanoma and bovine endothelial cell lines by direct cytotoxic effect". *Anticancer Research*, **30**, 143-148, 2010.

79. VANDERSEE, S.; BEYER, M.; LADEMANN, J. & DARVIN, M. E. “Blue-violet light irradiation dose dependently decreases carotenoids in human skin, which indicates the generation of free radicals”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2015**, 7 páginas, 2015.
80. OH, P.-S.; HWANG, H.; JEONG, H.-S.; KWON, J.; KIM, H.-S.; KIM, M., LIM, S. T.; SOHN, H. & JEONG, H.-J. “Data in support of effect of blue LED irradiation in human lymphoma cells”. *Data in Brief*, **6**, 630–633, 2016.
81. KIMURA, H.; LEE, C.; HAYASHI, K.; YAMAUCHI, K.; YAMAMOTO, N.; TSUCHIYA, H.; TOMITA, K.; BOUVET, M. & HOFFMAN, R. M. “UV light killing efficacy of fluorescent protein-expressing cancer cells *in vitro* and *in vivo*”. *Journal of Cellular Biochemistry*, **110**, 1439-1446, 2010.
82. BORTNER, C. D. & CIDLOWSKI, J. A. “Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell”. *Cell Death and Differentiation*, **9** (12): 1307-1310, 2002.
83. KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. “Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics”. *British Journal of Cancer*, **26** (4): 239-257, 1972.
84. BRIGHT J. J. & KHAR, A. “Apoptosis: Programmed cell death in health and disease”. *Bioscience Reports*, **14** (2): 67-68, 1994.
85. MACHADO, A. E. H. “Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas”. *Quim. Nova*, **23** (2): 237-243, 2000.
86. SILVA, D. E. S. Complexos de metais de transição multifuncionais para o tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2016. Dissertação de mestrado, 103 p.
87. VENA, F. C. B.; TURCHIELLO, R. F.; LAVILLE I., PIGLAGIO, S.; BLAIS, J. & TEDESCO, A. C. “5-Aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line”. *Lasers Med. Sci.*, **19**, 119–26, 2004.
88. OUÉDRAOGO, M.; MAESSCHALCK, E. D.; SOENTJENS-WERTS, V. & DUBOIS, J. “*In vitro* cytotoxicity study of oxaziridines generated after chlordiazepoxide, demoxepam, and desmethylchlordiazepoxide UV irradiation”. *Drug and Chemical Toxicology*, **32** (4): 417-423, 2009.
89. CHEN, Y.; ZHENG, W.; LI, Y.; ZHONG, J.; JI, J. & SHEN, P. “Blackwell Publishing Asia Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics”. *Cancer Sci.*, **99** (10): 2019-2027, 2008.