

Pedro Alencar Gomes Pereira

**Detecção e caracterização por ressonância  
paramagnética eletrônica de espécies reativas  
de oxigênio produzidas por terapia fotodinâmica**

IFD-UnB

2020

Pedro Alencar Gomes Pereira

**Detecção e caracterização por ressonância paramagnética eletrônica de espécies reativas de oxigênio produzidas por terapia fotodinâmica**

Dissertação apresentada como requisito parcial obrigatório à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Física Experimental, do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Física

Programa de Pós-Graduação

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza

IFD-UnB

2020

Pedro Alencar Gomes Pereira

Detecção e caracterização por ressonância paramagnética eletrônica de espécies reativas de oxigênio produzidas por terapia fotodinâmica/ Pedro Alencar Gomes Pereira. – IFD-UnB, 2020-

75 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Física

Programa de Pós-Graduação, 2020.

1. ERO. 2. TFD. 3. Ftalocianina. I. Orientador Narcizo, PS. II. Universidade de Brasília. III. Instituto de Física. IV. Mestrado

Pedro Alencar Gomes Pereira

**Detecção e caracterização por ressonância paramagnética eletrônica de espécies reativas de oxigênio produzidas por terapia fotodinâmica**

Dissertação apresentada como requisito parcial obrigatório à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Física Experimental, do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

Trabalho aprovado. IFD-UnB, 17 de Abril de 2020:

---

**Prof. Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza**  
Orientador

---

**Prof. Dr. Sebastião William da Silva**  
Membro da Banca

---

**Prof. Dr. Alan Rocha Baggio**  
Membro da Banca

---

**Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza**  
Membro Suplente

IFD-UnB  
2020

*Dedico este trabalho aos meus pais e a todas as pessoas vítimas de câncer de pele*

# Agradecimentos

Aos meus pais, pelo apoio incondicional e presença marcante, em toda a minha vida.

Ao meu orientador, Paulo, que desde a graduação me ensinou muito sobre física e sempre esteve presente na minha jornada científica.

À professora Fabiane, que me auxiliou com toda a parte de preparação de amostras, conhecimentos em áreas fora da minha graduação e presença proativa nos experimentos que foram feitos.

Aos Professores Doutores da banca, pela disponibilidade e orientações. Em especial ao Alan, pelo auxílio nas medidas de fluorescência.

Aos meus irmãos e respectivos cônjuges, Ricardo, Sylvia, Leonardo, Lilian, Marina e Marcos, por me aturarem.

Aos demais membros familiares, em especial minha vó Olarina, com quem tenho conversas muito interessantes e engrandecedoras. Aproveito também para agradecer meus padrinhos, Durang e Graça pelos diversos momentos de diversão.

Aos meus amigos mais antigos, Beatriz, Henrique, Rafael, Palloma, Paola, Lucas, Lara e Rodrigo, que me acompanharam desde o ensino médio e sempre me incentivaram a buscar mais e ser melhor.

À Fernanda, que sempre me ouvia chorando minhas pitangas.

Às pessoas que deram dicas e revisaram minha dissertação, Rosângela, Dara, Lígia, Ricardo, Beatriz e Renan.

Aos amigos da física, Thales, Matheus, João, Guilherme e Filipe, que estiveram lá nos momentos mais difíceis do curso.

Aos amigos da produção, Daniel, Cleto, Eduardo, Victor, Débora, Jade, Rafael, Giovana, Rafaela, Camila, Juca, Lucas e Vinícius, que me ajudaram a levar tanta coisa ao mesmo tempo.

À Universidade de Brasília, ao CNPq, à Capes e à FAP-DF, por viabilizarem os experimentos e equipamentos utilizados neste trabalho. Em especial, à FAP DF proc. 193.001.730/2017.

E a todos que me ensinaram, agregaram positivamente e estiveram presentes nos diversos momentos de minha vida.

*A coisa que o EPR mais faz é gente chorar*  
*Paulo Eduardo Narcizo de Souza*

# Resumo

Este trabalho teve como objetivo determinar a presença de espécies reativas de oxigênio, especificamente o oxigênio singlete, produzidas pela molécula de cloreto alumínio-ftalocianina, uma das principais substâncias utilizadas na terapia fotodinâmica. A terapia fotodinâmica vem sendo amplamente estudada pela sua taxa de sucesso, com poucos efeitos colaterais, no tratamento de doenças, como por exemplo, o câncer de pele. Para esta determinação, escolheu-se utilizar, como marcador de *spin*, as hidroxilaminas cíclicas, pela sua estabilidade depois de marcadas pelas espécies reativas. A técnica de medição principal escolhida foi a espectroscopia paramagnética de ressonância eletrônica. Para critérios de validação de resultados, foram utilizadas técnicas complementares, sendo elas: a fluorescência e o UV-Vis. Conclui-se, com este trabalho, que a caracterização do oxigênio singlete não é possível de ser realizado com este marcador de *spin* e é extremamente não recomendável a utilização deste marcador para quantificação de outras espécies reativas de oxigênio, no sistema apresentado neste trabalho.

**Palavras-chave:** ERO. TFD. ftalocianina.

# Abstract

This research aims to determine the reactive oxygen species, specially the singlet oxygen, using the aluminum-phthalocyanine chloride molecule, one of the main substances used in photodynamic therapy. Photodynamic therapy has been widely studied for its success rate, with few side effects, in the treatment of diseases, such as skin cancer. For this determination, it was chosen to use, as a spin trapper, cyclic hydroxylamines, due to their stability after being marked by reactive species. The main measurement technique chosen was electron resonance paramagnetic spectroscopy. After a set of unsatisfactory results for the detection of singlet oxygen, it was sought, with the help of complementary techniques, the determination of the production or not of singlet oxygen by phthalocyanine when it is in solution with cyclic hydroxylamine. It is concluded that the characterization of singlet oxygen is not possible to be carried out with this spin trapper and the use of this trapper for quantification of other reactive oxygen species in the system presented is not recommended.

**Keywords:** ROS. PDT. phthalocyanine.

# Lista de ilustrações

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 – Expectativas de Vida das pessoas no Brasil, na América Latina e no Mundo (BANK, 2019). Os dados possuem tendência de crescimento para todo o mundo, em destaque para o Brasil e a região onde ele está localizado . . . . . | 15 |
| Figura 2 – Molécula de Ftalocianina . . . . .  | 18 |
| Figura 3 – Molécula da AIPcCl . . . . .  | 18 |
| Figura 4 – Mecanismo de produção de ERO. . . . .   | 20 |
| Figura 5 – Detalhe da Absorção (WEBER, 2011). . . . .  | 29 |
| Figura 6 – Exemplo de Espectro (WEBER, 2011). . . . .  | 29 |
| Figura 7 – Momentos possíveis para os elétrons em um campo magnético estático (WEBER, 2011). . . . .   | 29 |
| Figura 8 – Interação Hiperfina (WEBER, 2011). . . . .  | 31 |
| Figura 9 – A divisão do sinal está localizada a $B_I$ do sinal original (WEBER, 2011). . . . .   | 32 |
| Figura 10 – Número de linhas resultantes de interações hiperfinas para valores de <i>spin</i> quântico nuclear maior que 1/2 (WEBER, 2011) . . . . .   | 32 |
| Figura 11 – Interação construtiva, resultando em uma linha com o dobro da intensidade, comparada às outras (WEBER, 2011). . . . .  | 33 |
| Figura 12 – Diagrama de Jablonski (ISLER et al., 2018) . . . . .   | 35 |
| Figura 13 – Desenho técnico do Fluorímetro Fluorlog 3 . . . . .  | 37 |
| Figura 14 – Curva da função $-\log(x)$ . . . . .   | 39 |
| Figura 15 – Nesta curva de $[CM\bullet]$ em função da $[AIPcCl]$ , foi escolhida a concentração de $20 \mu\text{g/mL}$ de AIPcCl. No detalhe à direita, vemos o regime linear da produção de ERO. . . . .                              | 42 |
| Figura 16 – $[CM\bullet]$ com a variação da fluência de energia luminosa. A fluência escolhida nesta pesquisa foi de $131 \text{ mW/cm}^2$ , garantindo assim a excitação de toda a amostra. . . . .                                   | 43 |
| Figura 17 – Produção de $[CM\bullet]$ sob a incidência de luz ambiente. . . . .  | 44 |
| Figura 18 – $[CM\bullet]$ com SOD. A linha vermelha apresenta o controle (AIPcCl e CMH) feito no dia do experimento para determinação da concentração de SOD. . . . .  | 46 |
| Figura 19 – $[CM\bullet]$ com catalase. A linha vermelha apresenta o controle (AIPcCl ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) e CMH ( $400\mu\text{M}$ )) feito no dia do experimento para determinação da concentração de catalase. . . . .           | 48 |
| Figura 20 – $[CM\bullet]$ com DMTU. A linha vermelha apresenta o controle (AIPcCl ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) e CMH ( $400\mu\text{M}$ )) feito no dia do experimento para determinação da concentração de DMTU. . . . .                   | 50 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 21 – [CM•] com azida sódica (amostra A). A variação aqui não foi significativa o suficiente para garantir a eficácia da azida sódica. . . . .  | 51 |
| Figura 22 – [CM•] com DABCO. A linha vermelha apresenta o controle (AlPcCl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e CMH (400 $\mu\text{M}$ )) feito no dia do experimento para determinação da concentração de DABCO. Como os resultados foram muito mais altos que o controle, o DABCO foi descartado para determinação das ERO, já que torna o sistema imprevisível. . . . . | 53 |
| Figura 23 – [CM•] com SOD, catalase, DMTU e os três sequestradores juntos (todos). Os valores encontrados para a catalase. Todos e água podem ser distinguidos entre si, de maneira estatística, usando o teste ANOVA. . . . .  | 55 |
| Figura 24 – Emissão da AlPcCl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <b>a)</b> Livre; <b>b)</b> com CMH (400 $\mu\text{M}$ ); e <b>c)</b> Solvente. . . . .  | 57 |
| Figura 25 – Emissão da AlPcCl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) <b>a)</b> Livre; <b>b)</b> com TEMP (100 $\mu\text{M}$ ); e <b>c)</b> Solvente. . . . .   | 58 |
| Figura 26 – UV-Vis da AlPcCl com DBF. Pela sensibilidade da técnica é possível observar que o CMH diminui a produção de oxigênio singleto. . . . .  | 59 |
| Figura 27 – Espectro do EPR para o TEMP . . . . .   | 70 |
| Figura 28 – Amplitude normalizada do TEMP vs exposição à luz ambiente . . . . .   | 71 |
| Figura 29 – Amplitude normalizada do TEMP vs potência máxima do <i>LED</i> . . . . .  | 72 |
| Figura 30 – Amplitude normalizada do TEMP com azida sódica . . . . .  | 72 |
| Figura 31 – Amplitude normalizada do TEMP com DABCO . . . . .   | 73 |
| Figura 32 – Amplitude normalizada do TEMP com outros sequestradores . . . . .   | 73 |
| Figura 33 – Espectro da RPE para o CMH. . . . .   | 75 |

# Lista de tabelas

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 – Parâmetros de configuração do equipamento de RPE realizados neste trabalho . . . . .  | 34 |
| Tabela 2 – Escala de tempo de processos do Diagrama de Jablonski (HERMAN et al., 2020) . . . . .   | 36 |
| Tabela 3 – Replicatas do controle de AIPcCl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) . . . . .  | 45 |
| Tabela 4 – Dados estatísticos - Controle de AIPcCl (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) . . . . .   | 45 |
| Tabela 5 – Replicatas com a SOD (300U) . . . . .   | 47 |
| Tabela 6 – Dados estatísticos - SOD (300U) . . . . .   | 47 |
| Tabela 7 – Replicatas com a Catalase (300U) . . . . .  | 48 |
| Tabela 8 – Dados estatísticos - Catalase (300U) . . . . .  | 48 |
| Tabela 9 – Replicatas com a DMTU (30mM) . . . . .  | 50 |
| Tabela 10 – Dados estatísticos - DMTU (30mM) . . . . .   | 50 |
| Tabela 11 – Replicatas com a Azida (20mM) . . . . .  | 52 |
| Tabela 12 – Dados estatísticos - Azida (20mM) . . . . .  | 52 |
| Tabela 13 – Valores P. Estes valores foram encontrados realizando o Teste T de Welch para cada amostra comparando-as ao controle. Para valores menores que 0,05, o teste mostra que os grupos de medidas são estatisticamente distintos. . . . . | 54 |
| Tabela 14 – Replicatas com SOD, Catalase e DMTU . . . . .  | 56 |
| Tabela 15 – Dados estatísticos - SOD, Catalase e DMTU . . . . .  | 56 |
| Tabela 16 – Representação das amostras no ANOVA . . . . .  | 60 |
| Tabela 17 – Estatística Descritiva . . . . .   | 60 |
| Tabela 18 – Resultado Geral ANOVA . . . . .  | 60 |
| Tabela 19 – Teste de Turkey. Sig = 1 indica diferença significativa. . . . .   | 60 |

# Lista de abreviaturas e siglas

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <i>AlPcCl</i> ou AlClFt | Ftalocianina de cloro-alumínio                                    |
| CI                      | Conversão interna   |
| CMH                     | 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina          |
| DABCO                   | 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane                                     |
| DMSO                    | Dimetilsulfoxido  |
| DMTU                    | N,N'-Dimethylthiourea   |
| ERO                     | Espécie reativa de oxigênio                                       |
| FS                      | Fotossensibilizantes  |
| IARC                    | Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (traduzido)      |
| INCA                    | Instituto Nacional do Câncer                                      |
| <i>ISC</i>              | <i>Intersystem Crossing</i>                                       |
| LED                     | <i>Light-emitting diode</i> , ou diodo emissor de luz (traduzido) |
| RPE                     | Ressonância paramagnética eletrônica                              |
| SOD                     | Superóxido Dismutase  |
| TEMP                    | 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine                                     |
| TEMPO                   | 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl                              |
| TFD                     | Terapia fotodinâmica  |

# Sumário

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>15</b> |
| <b>2</b>   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>   | <b>22</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Materiais</b>   | <b>22</b> |
| 2.1.1      | Preparo e armazenamento das soluções   | 23        |
| 2.1.1.1    | Preparação da AIPcCl   | 23        |
| 2.1.1.2    | CMH  | 23        |
| 2.1.2      | Local de aplicação da TFD  | 24        |
| 2.1.2.1    | Sequestradores   | 24        |
| 2.1.2.2    | Exposição à luz ambiente   | 25        |
| 2.1.2.3    | Variação de fluência energética  | 25        |
| <b>2.2</b> | <b>Métodos</b>   | <b>25</b> |
| 2.2.1      | TFD  | 25        |
| 2.2.2      | RPE  | 28        |
| 2.2.3      | Fluorescência  | 35        |
| 2.2.4      | UV-VIS   | 38        |
| <b>3</b>   | <b>RESULTADOS</b>  | <b>40</b> |
| <b>3.1</b> | <b>RPE</b>   | <b>40</b> |
| 3.1.1      | Relação entre produção de ERO e concentração de AIPcCl                                   | 40        |
| 3.1.2      | Determinação da Fluência de Energia Luminosa para uma concentração de 20 µg/mL de AIPcCl | 42        |
| 3.1.3      | Determinação da Influência da Luz Ambiente no Sistema                                    | 44        |
| 3.1.4      | Controle   | 45        |
| 3.1.5      | Íon Superóxido   | 45        |
| 3.1.5.1    | SOD  | 46        |
| 3.1.6      | Peróxido de Hidrogênio   | 47        |
| 3.1.6.1    | Catalase   | 47        |
| 3.1.7      | Hidroxila  | 49        |
| 3.1.7.1    | DMTU   | 49        |
| 3.1.8      | Oxigênio Singleto  | 51        |
| 3.1.8.1    | Azida Sódica   | 51        |
| 3.1.8.2    | DABCO  | 52        |
| 3.1.9      | Análise Estatística  | 53        |
| <b>3.2</b> | <b>Fluorescência</b>   | <b>57</b> |
| <b>3.3</b> | <b>UV-Vis</b>  | <b>59</b> |

|       |  |           |
|-------|--|-----------|
| 3.3.1 | Resultados ANOVA . . . . .                               | 60        |
| 4     | <b>DISCUSSÃO . . . . .</b>                               | <b>61</b> |
| 5     | <b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVA . . . . .</b>                 | <b>64</b> |
| 5.1   | Conclusão . . . . .                                      | 64        |
| 5.2   | Perspectivas . . . . .                                   | 64        |
|       | <b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>                             | <b>65</b> |
|       | <b>APÊNDICES . . . . .</b>                               | <b>69</b> |
|       | <b>APÊNDICE A – TEMP . . . . .</b>                       | <b>70</b> |
| A.1   | Amplitude no RPE com TEMP . . . . .                      | 70        |
| A.2   | Luz Ambiente . . . . .                                   | 71        |
| A.3   | Variação de Fluência Energética . . . . .                | 71        |
| A.4   | Azida . . . . .  | 72        |
| A.5   | DABCO . . . . .  | 73        |
| A.6   | Outros Sequestradores . . . . .                          | 73        |
|       | <b>APÊNDICE B – AMPLITUDE NO ESPECTRO DE RPE COM CMH</b> | <b>75</b> |

# 1 Introdução

O crescimento da expectativa de vida, em nível global, traz consigo um aumento de diversas doenças que estão relacionadas com a prolongada exposição a fatores de risco, uso de substâncias ou desgaste natural por idade avançada (WANG et al., 2016).

No Brasil, não é diferente. A expectativa de vida também vem crescendo nos últimos anos (IBGE, 2020), gerando assim a possibilidade de aumento de enfermidades não comunicáveis específicas. Com isso, se faz necessária a criação de novas técnicas de prevenção e tratamento de doenças.

Segundo Bank (2019), a expectativa de vida tem crescido tanto no Brasil, quanto no restante da América Latina. A Figura 1 demonstra esse crescimento. Nela, é possível observar um aumento de 3,9% na expectativa de vida do brasileiro, indo de 73 para 76 anos, de 2010 a 2020. Além disso, existe uma tendência natural de crescimento nesta série histórica, indicando um possível aumento nas próximas décadas.

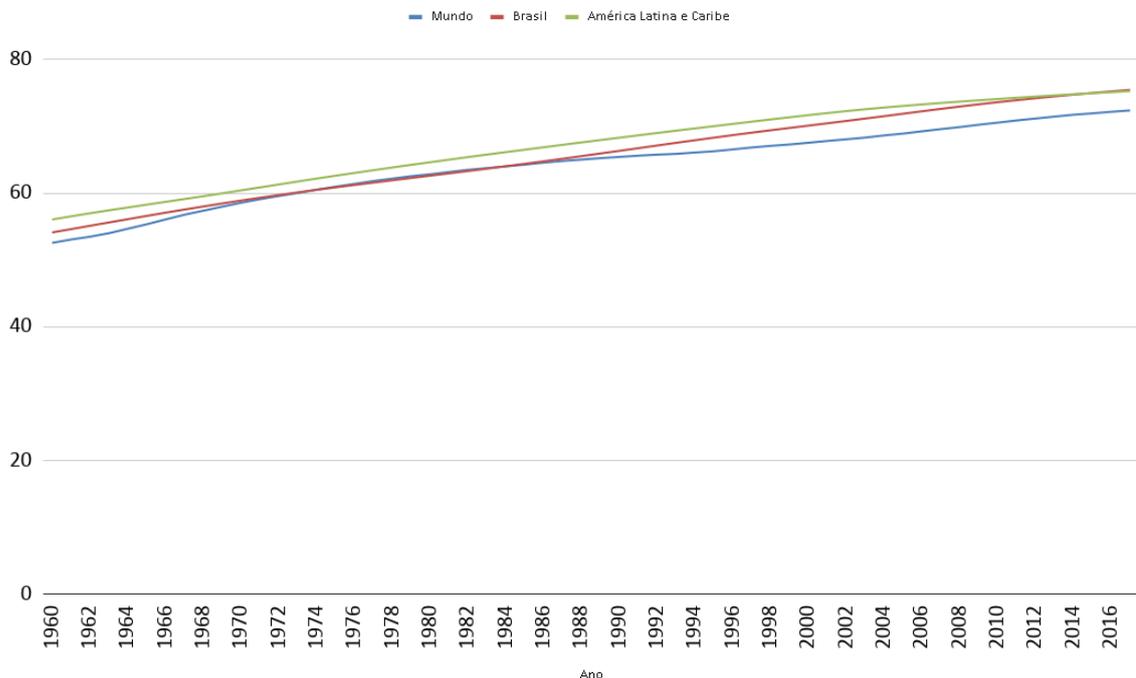


Figura 1 – Expectativas de Vida das pessoas no Brasil, na América Latina e no Mundo (BANK, 2019). Os dados possuem tendência de crescimento para todo o mundo, em destaque para o Brasil e a região onde ele está localizado

Dentre as enfermidades que mais têm afetado a população, destacam-se os cânceres. O câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem como característica comum a divisão desordenada das células, gerando complicações e podendo levar à morte (INCA, 2019).

Por ser uma doença que afeta a divisão celular, pode ocorrer em qualquer parte do corpo (WHO, 2019a). Segundo a Organização Mundial de Saúde WHO (2019a), a causa deste tipo de doença está associada a fatores genéticos, e em 90% dos casos associados a pelo menos uma de três categorias de agentes externos (INCA, 2020), sendo eles: Físicos, como radiação ionizante; Químicos, como exposição a amianto e fumaça de tabaco; e Biológicos, como vírus e bactérias. Este conjunto de doenças é, atualmente, a segunda maior causa de mortes no mundo, na proporção de uma em cada seis. No Brasil, segundo a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, sigla em inglês), são relatados 559 mil novos casos e 243 mil mortes, anualmente (WHO, 2019b).

Dentre todos os tipos de câncer, o mais frequente dentro do território nacional é o câncer de pele (SAÚDE, 2019), correspondendo a 30% de todos os casos de tumores malignos registrados, mesmo não sendo o mais letal (WHO, 2019b).

Existem diversas formas de tratamento deste tipo de câncer, sendo as mais comuns a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, dependendo da gravidade do tumor. Estas terapias convencionais, mesmo sendo eficazes no tratamento deste tipo de doença, possuem limitações. A cirurgia nem sempre pode ser feita devido à situação de saúde do paciente ou condições do tumor. Radioterapia e quimioterapia, embora tenham bons índices de sucesso no ataque ao tumor, apresentam danos aos pacientes ao afetar diversas outras partes livres de câncer e provocar outros grandes efeitos colaterais à saúde como um todo.

Além destas terapias tradicionais, existem outras alternativas não invasivas e com menores consequências ao paciente quais sejam:

- Criocirurgia: Também conhecida como crioterapia, é um tratamento de lesões pelo frio. Um rápido resfriamento da pele provoca a destruição do tecido, podendo gerar a apoptose celular <sup>1</sup>. Para este resfriamento podem ser utilizados diversos agentes químicos, porém o mais comumente utilizado é o nitrogênio líquido (SBD, 2017);
- Imunoterapia: É uma forma de tratamento biológico, onde busca-se potencializar o sistema imunológico de forma que ele próprio seja capaz de combater o câncer (ACS, 2020);
- Terapia Fotodinâmica: A Terapia Fotodinâmica (TFD) se fundamenta na utilização de fotossensibilizantes (FS), depositados no local desejado de tratamento, ainda inertes. Após a aplicação, ilumina-se esta região com uma luz monocromática,

<sup>1</sup> Apoptose celular é a morte celular programada

podendo ser utilizados lasers ou diodos emissores de luz (em inglês, *LEDs*), ativando assim a substância, e gerando a apoptose celular. Para atingir este objetivo, a técnica necessita além da luz (em comprimento de onda específico) e do FS, da presença de oxigênio existente nos tecidos e células.

A TFD, utilizada nesta pesquisa, difere de outras terapias convencionais ou sistêmicas por ter efeito direcional e localizada, isto é, atua somente nas regiões que são iluminadas e que acumulam os fotossensibilizantes. Também apresenta menos efeitos adversos sistêmicos, o que promove a melhoria da qualidade de vida dos pacientes durante a realização do tratamento. Seu funcionamento completo será melhor explicado no capítulo de Materiais e Métodos, seção 2.2.1.

Embora o uso de luz com agentes fotossensibilizantes tenha sido descrito na literatura médica há mais de 3000 anos na China, Egito e Índia ([ABDEL-KADER, 2014](#); [BOWN, 2013](#)), as bases para sua compreensão foram lançadas em 1900, quando Oscar Raab descreveu a morte de *Paramecium spp.* utilizando acridina e radiação infravermelha ([REDDY et al., 2012](#)). O primeiro trabalho da literatura sobre TFD foi publicado por von Tappeiner e Jesionek, em 1907, ([ONISZCZUK et al., 2016](#)) descrevendo o uso de 1% de eosina e luz branca no tratamento de pacientes com carcinoma basocelular.

Do ponto de vista clínico, o primeiro resultado significativo foi publicado em 1972, utilizando hematoporfirina como agente fotossensibilizante para destruição seletiva de células tumorais ([ALLISON et al., 2004](#); [MITTON](#); [ACKROYD, 2005](#)). Em 1975 foi publicado um estudo com base em um derivado de hematoporfirina (HpD) como fotossensibilizante e, em 1976, Kelly e Snell utilizaram HpD para tratar carcinoma da bexiga ([JURCZYSZYN et al., 2007](#)). A confirmação da eficácia do HpD foi comprovada por Thomas Dougherty, em um estudo no qual apenas dois dos 113 tumores testados foram não responsivos à TFD ([QUIRK et al., 2015](#)).

O agente FS penetra nas células do tecido tumoral e, ao receber radiação de comprimento de onda específico, passa por uma transição química sendo capaz de converter oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ) em uma espécie reativa de oxigênio (ERO), principalmente o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), que promove a morte das células tumorais ou patógenos por estresse oxidativo.

Além do oxigênio singleto, citado anteriormente, existem diferentes ERO que são produzidas a partir de um estímulo energético dos FS. Porém, elas também são geradas em diversos sistemas biológicos, tanto em função de eventos fisiológicos, quanto patológicos ([AIYEGORO](#); [OKOH, 2009](#)). Um exemplo disso é a produção natural que pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático, nos peroxissomos e nas membranas celulares ([SCHRADER](#); [FAHIMI, 2006](#)). Dependendo do sítio subcelular onde são formadas, essas espécies podem atuar em diferentes alvos, tais como proteínas, lipídeos,

carboidratos ou DNA e exercer ações variadas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; LOBO et al., 2010).

Nos sistemas biológicos, a produção de ERO está centrada no oxigênio molecular a partir do estado tripleto  $^3\text{O}_2$  (VALKO et al., 2007), por ser um componente básico presente em todos os organismos complexos e por estar envolvido na produção de energia, regulação do crescimento celular, síntese de substâncias biológicas, fagocitose e sinalização intracelular, sendo essencial à vida aeróbica (AIYEGORO; OKOH, 2009). Aproximadamente 85% do  $^3\text{O}_2$  produzido é consumido nas mitocôndrias, através da cadeia transportadora de elétrons. O restante é utilizado por enzimas oxidases e oxigênases e por reações de oxidação direta (BARBOSA et al., 2010).

Para medição das ERO, diversos métodos podem ser usados, desde que tenham grande sensibilidade de detecção. Isso é devido às propriedades inerentes das ERO: moléculas instáveis, quimicamente reativas, e com meia vida curta, da ordem de 40 ns. Pode-se medir diretamente, por meio de marcadores de *spin*-molécula orgânica que possui um elétron desapareado-, bem como por avaliação indireta, como pela luz absorvida por uma espécie química que reage com ERO específicas. Atualmente, o melhor método para determinação de produção de ERO é o da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (BERG et al., 2014), que depende do elétron não pareado do marcador de *spin* para fornecer sinal.

Para a utilização da TFD, diversos fotossensibilizantes tem sido utilizados e estudados, sendo os mais comuns as Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016). Estas estruturas são conhecidas como tetrapirróis, ou seja, estruturas que contém quatro anéis pirróis. As ftalocianinas são amplamente utilizadas pela sua coloração, como pigmentos (ou corantes) sintéticos. Dentro deste grupo de químicos, temos ftalocianinas com e sem metais, sendo a ftalocianina de cloro-alumínio (AlClFt, ou em inglês, *AlPcCl*) uma das mais utilizadas e a escolhida para fins de pesquisa deste trabalho.

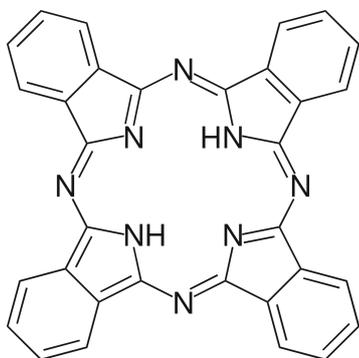


Figura 2 – Molécula de Ftalocianina

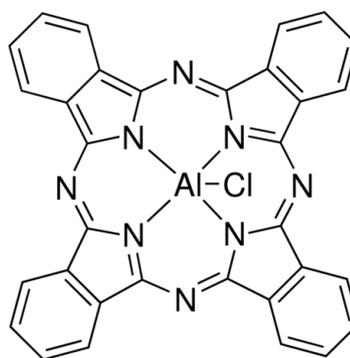


Figura 3 – Molécula da AlPcCl

As ftalocianinas têm suas principais propriedades atribuídas à sua transferência eficiente de elétrons para outras moléculas do meio em que se encontram (SAKAMOTO; OHNO-OKUMURA, 2009). Ainda segundo Sakamoto e Ohno-Okumura (2009), elas são

amplamente utilizadas em diversos campos, como eletrônica molecular, optoeletrônica, fônica e, mais recentemente, como FS para TFD. A Figura 2 apresenta a estrutura convencional da Ftalocianina. Dentro da molécula, no espaço central, é possível acomodar metais e outros elementos, como pode ser visto na Figura 3. Isso ajuda a molécula a designar funções de maneira otimizada, como por exemplo, absorver o comprimento de onda de 670 nm (que tem boa penetração no tecido humano) e a transformação de oxigênio tripleto para um estado excitado, o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ).

Em seu estado fundamental, a molécula de FS é um singleto, ou seja, possui todos os elétrons em sua estrutura emparelhados (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). Ao absorver um fóton com a energia correta, aqui representada pelo comprimento de onda (especificamente do vermelho, 670 nm), têm-se a excitação de um dos elétrons para um orbital de maior energia. Esse estado excitado do FS é instável e perde sua energia de duas formas: por fluorescência (emissão de luz) ou por produção de calor (conversão interna, ou CI). Isso está representado no diagrama de Jablonski, na Figura 4 a seguir.

Além deste processo, pode haver a transição de um FS excitado no estado singleto para um estado tripleto (ainda excitado) mais estável, com *spins* paralelos, por um processo chamado *Intersystem Crossing (ISC)*. Este estado excitado do FS tripleto pode decair para o estado fundamental, por meio da fosforescência, porém este processo é "proibido" quanticamente (isso ocorre porque, para decair, é necessário conservar energia e momento angular, o último sendo improvável pela molécula sozinha), tornando o estado tripleto estável por um período de microssegundos (ao invés de nanossegundos, caso do singleto) antes que ocorra a inversão do estado tripleto. Este tempo permite que haja a troca de energia entre o FS excitado e o meio em que ele se encontra, gerando duas possíveis reações: Tipo I e Tipo II.

As reações do Tipo I são aquelas em que a energia do FS no estado tripleto excitado é transferida para um substrato, como uma molécula ou membrana celular, por meio de um elétron, para a formação de radicais aniônicos (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). Estes radicais então reagem com o oxigênio, gerando ânions superóxidos, com um elétron desemparelhado. O superóxido é extremamente reativo e, ao sofrer redução eletrônica pela reação de dismutação, se transforma em peróxidos de hidrogênio. Por fim, os peróxidos podem sofrer uma redução eletrônica gerando hidroxilas.

Por outro lado, tem-se as reações do Tipo II, onde a energia é transferida diretamente para a molécula de oxigênio tripleto do meio, levando-o para sua forma excitada e altamente reativa, isto é, o oxigênio singleto. Esta é a principal ERO para o tratamento via TFD (YANO et al., 2011). A proporção de ERO gerada em cada tipo de reação depende de vários parâmetros, bem como do FS utilizado. A AlPcCl, em geral, tem como processo dominante as reações do Tipo II (PLAETZER et al., 2009) e, por produzir o oxigênio

singlete em maior quantidade, foi a utilizada neste trabalho de pesquisa.

Para inibir os sinais gerados pelo marcador de *spin* ao se ligar com a ERO, são utilizados sequestradores específicos, que são moléculas (ou enzimas) que interagem única e exclusivamente com uma ERO específica.

Além disto, há um potencial impacto na área da saúde, apresentando dados relevantes à área de pesquisa com TFD, para melhorar parâmetros de otimização da produção do oxigênio singlete (principal espécie reativa no tratamento de câncer). Atualmente, a TFD já está sendo utilizada no tratamento de doenças na pele, inclusive no Distrito Federal. Os resultados aqui obtidos servirão de base para melhor entendimento de FS criados bem como melhores práticas para tratamento/caracterização de ERO.

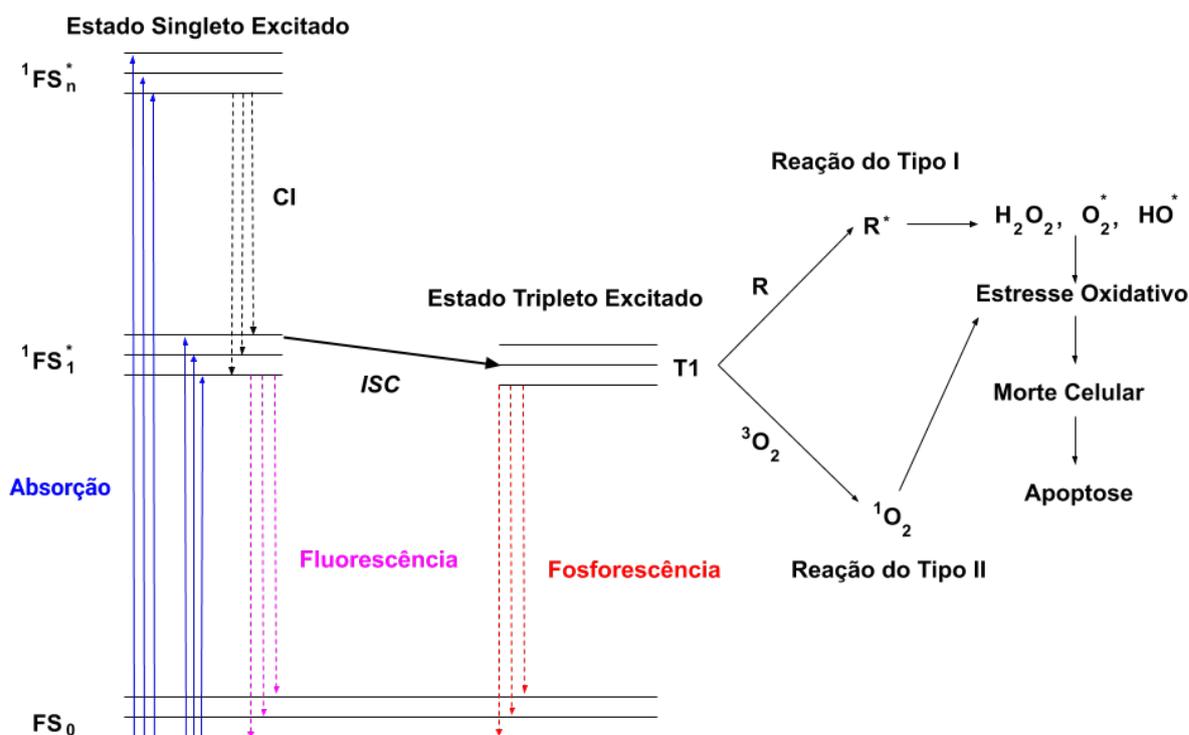


Figura 4 – Mecanismo de produção de ERO.

Na Figura 4, é possível observar que o FS sai do estado fundamental para um estado singlete excitado. Eventualmente pode ocorrer um processo chamado ISC onde este FS excitado vai para o estado tripleto. Daí, podem ocorrer duas reações: a Tipo I e a Tipo II. Destas, apenas a reação do Tipo I gera o oxigênio singlete, principal ERO para tratamentos por TFD.

O Núcleo de Física Aplicada (NFA) da Universidade de Brasília possui o equipamento para medição de ERO. Porém, as pesquisas realizadas pelo NFA têm sido direcionadas a avaliar a produção e quantificar as ERO produzidas, sem discriminar as espécies de ERO formadas. O aumento de ERO total produzido tende a ser acompanhado pelo aumento individual das ERO, no entanto, a indiscriminação das espécies de ERO limita o desenvolvimento de novos materiais e o melhor aproveitamento dos FS nos sistemas de TFD.

Por fim, o objetivo deste trabalho é determinar as diferentes ERO produzidas pela AlPcCl utilizando as hidroxilaminas cíclicas, especificamente o 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH). Este resultado já é possível com outros marcadores de *spin*, baseados em nitronas. Estes marcadores, porém, possuem tempo de meia vida dos adutos muito curto, gerando resultados conflitantes e dificilmente replicáveis. As hidroxilaminas, por outro lado, são extremamente controláveis e estáveis, sendo assim um marcador melhor para se utilizar em experimentos onde é exigido alto nível de precisão.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

Como apresentado na introdução, o fotossensibilizante escolhido foi a AlPcCl. Além disto, foram utilizados diversos outros componentes químicos para evitar o sinal gerado, na RPE, por ERO específicas, bem como marcadores de *spin* específicos. A maioria dos reagentes foi produzida pela Sigma-Aldrich, porém uma relação completa está discriminada abaixo. Nesta relação, utiliza-se o nome comercial em inglês, para facilitar a localização e evitar confusões de tradução.

- FS
  - **Chloro(29H,31H-phthalocyanine)aluminum** (AlPcCl), produzido pela Sigma-Aldrich;
- Sequestradores
  - **1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane** (DABCO), produzido pela Sigma-Aldrich;
  - **N,N'-Dimethylthiourea** (DMTU), produzido pela Sigma-Aldrich;
  - **Catalase**, produzido pela Sigma-Aldrich;
  - **Superóxido Dismutase** (SOD), produzido pela Sigma-Aldrich;
  - **Azida Sódica**, produzido pela Sigma-Aldrich;
  - **1,3-diphenylisobenzofuran** (DBF), produzido pela Sigma-Aldrich.
- Solventes
  - **Dimethyl Sulfoxide** (DMSO), produzido por Vetec;
  - **Tampão Krebs Hepes**, produzido por Noxygen.
- Marcadores de *spin*
  - **2,2,6,6-tetramethylpiperidine** (TEMP), produzido pela Sigma-Aldrich;
  - **1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina** (CMH), produzido pela Noxygen.
- Materiais permanentes
  - **Balança**

- **Espectrômetro Paramagnético de Ressonância Eletrônica**, produzido pela Bruker, modelo EMXplus;
- **Fluorímetro**, produzido pela Horiba, modelo Fluorlog-3;
- **Leitor de Microplaca (UV-Vis)**, produzido pela CMG Labtech GmbH, modelo CLARIOstar.

## 2.1.1 Preparo e armazenamento das soluções

### 2.1.1.1 Preparação da AlPcCl

Inicialmente, foi feita uma dissolução de ftalocianina em DMSO, como demonstrado nas Amostras 1 e 2. Devido a polaridade das substâncias, não é possível dissolver AlPcCl diretamente em H<sub>2</sub>O (ela precipita), sendo necessária a utilização de um passo intermediário com DMSO. Como a concentração de AlPcCl não estava definida inicialmente, foi necessário fazer uma curva de [AlPcCl]. Para isso, diversas concentrações foram testadas, como se pode ver a seguir. Ao final, foi definida uma concentração que foi utilizada durante todos os outros experimentos, aqui chamada de **Amostra Final**.

**Amostra 1** Foi pesado 0,0083 g de AlPcCl, que foi diluído em 0,83 mL de DMSO. Isso gerou uma solução com a concentração de 10 mg/mL de AlPcCl.

**Amostra 2** Diluiu-se a Amostra 1 em 100x, com DMSO. Para isso, utilizou-se 10  $\mu$ L da Amostra 1 e 990  $\mu$ L de DMSO. Isso gerou uma solução com a concentração de 100  $\mu$ g/mL de AlPcCl.

**Amostra 2.1** Diluiu-se a Amostra 1 em 10x com DMSO. Para isso, utilizou-se 100  $\mu$ L da Amostra 1 e 900  $\mu$ L de DMSO. Isso gerou uma solução com a concentração de 1 mg/mL de AlPcCl.

**Amostra 3** Diluiu-se a Amostra 2 em 10x, com H<sub>2</sub>O bidestilada e deionizada. Para isso, utilizou-se 100  $\mu$ L da Amostra 2 e 900  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada e deionizada. Isso gerou uma solução com a concentração de 10  $\mu$ g/mL de AlPcCl.

**Amostra 3.1** Diluiu-se a Amostra 2.1 em 10x com H<sub>2</sub>O bidestilada e deionizada. Para isso, utilizou-se 100  $\mu$ L da Amostra 2.1 e 900  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada e deionizada. Isso gerou uma solução com a concentração de 100  $\mu$ g/mL de AlPcCl.

**Amostra Final** Diluiu-se a Amostra 3.1 em 5x com H<sub>2</sub>O bidestilada e deionizada. Para isso, utilizou-se 100  $\mu$ L da Amostra 3.1 e 400  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O bidestilada e deionizada. Isso gerou uma solução com a concentração de 20  $\mu$ g/mL de AlPcCl.

### 2.1.1.2 CMH

O CMH foi fornecido pela Professora Fabiane Veiga-Souza (da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília - FCE/UnB). A *spin probe* CMH (solução estoque

10 mM preparada em tampão Krebs Hepes contendo 25  $\mu\text{M}$  de deferoxamina (DF) e 5  $\mu\text{M}$  de trihidrato de dietilditiocarbamato de sódio (DETC) para minimizar a oxidação da CMH por metais de transição) foi adicionada a uma concentração final de 400  $\mu\text{M}$  em 400  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{AlPcCl}$  (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Em seguida, as amostras foram expostas a uma fonte luminosa, de comprimento de onda específico em 630 nm, com fluência energética de  $131\text{mW}/\text{cm}^2$  por 1 min. Depois disso, os 400  $\mu\text{L}$  de amostra foram transferidos para uma seringa sem tampa de 1 mL e congelados rapidamente em nitrogênio líquido até que as medições de RPE fossem realizadas.

## 2.1.2 Local de aplicação da TFD

Para aplicar a TFD, existem dois métodos viáveis em laboratório, sendo um deles uma placa de 96 poços ou microtubos de 1,5 mL. Nesta pesquisa, foram utilizados poços distribuídos em uma placa de acrílico, onde a área que receberia a luz do tratamento seria maior e em tubos mais profundos, com menor penetração da luz. Para determinar o melhor local, foram realizados testes com as mesmas amostras. Pela questão da penetração da luz em um líquido, optou-se por utilizar a placa de 96 poços que garantia uma maior uniformidade na aplicação da luz.

### 2.1.2.1 Sequestradores

Existem quatro ERO presentes no sistema estudado, sendo elas: o oxigênio singlete, o superóxido, o peróxido de hidrogênio e a hidroxila. Cada ERO possui um sequestrador específico, ou seja, a queda do sinal indica quanto da ERO era responsável pelo sinal de referência (amostra controle). Para determinar qual era a produção de cada ERO e fornecer melhores condições para a produção do oxigênio singlete, optou-se por um método de eliminação. Ou seja, avaliava-se o sistema sem a presença de nenhum sequestrador (amostra controle) e, então, avaliava-se o sistema com a presença dos sequestradores, observando-se a queda da intensidade do sinal do RPE. Para cada ERO, tem-se um sequestrador específico, todos descritos na literatura, quais sejam:

- **Íon Superóxido** Superóxido Dismutase (SOD), uma enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio;
- **Peróxido de Hidrogênio** Catalase, uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio;
- **Hidroxila** Dimethylthiourea (DMTU);
- **Oxigênio Singlete** Azida Sódica e DABCO.

### 2.1.2.2 Exposição à luz ambiente

Os testes realizados no laboratório não foram feitos em ambiente escuro. Com isso, existe uma quantidade de ERO produzida devido à presença da luz ambiente. Para determinar a produção de ERO pela luz ambiente, foram realizadas medidas de RPE de soluções com FS e CMH (e TEMP) sem a irradiação por LED.

### 2.1.2.3 Variação de fluência energética

Para as situações em que ocorre variação de potência, muda-se a posição do LED em relação à amostra. Quanto mais próximo dela, maior será a fluência energética.

## 2.2 Métodos

Como apresentado por [Berg et al. \(2014\)](#), a RPE é melhor técnica para detecção de ERO. Este foi o método escolhido, pelo qual diversos resultados foram obtidos. Indo além, utilizou-se duas técnicas para obter dados de suporte à proposta deste trabalho.

Uma delas foi a fluorescência, onde incide-se uma luz de comprimento de onda específica em uma câmara isolada e, posicionado a 90 graus da fonte, existia um detector luminoso. Este, detecta apenas a fluorescência produzida pela amostra. Daqui buscou-se avaliar a desativação da AIPcCl excitada pelo TEMP e pelo CMH.

A outra foi a espectroscopia de UV-VIS. Nesta espectroscopia mede-se a produção de ERO de forma indireta, onde coloca-se uma espécie química que reage apenas com ERO específicas e avalia-se a mudança na absorção da intensidade de luz advinda da fonte luminosa. Esta técnica foi utilizada para confirmar a hipótese, de modo a explicar os resultados da fluorescência em relação à produção de oxigênio singlete.

### 2.2.1 TFD

Por serem fontes luminosas muito eficientes, precisas e estáveis, os LEDs são extremamente apropriados para aplicação em TFD. Apesar de suas características favoráveis à aplicação em TFD, os LEDs apresentam variação na distribuição espacial, que é um fator prejudicial neste tipo tratamento. No entanto, ainda são mais eficientes do que os atuais *lasers* para tratamentos em áreas extensas. E um dos elementos fundamentais para a aplicação eficaz da TFD é a qualidade da dosimetria óptica dos equipamentos ([AAPM, 2005](#)). A sua qualidade é determinada pela irradiância constante de uma fonte de luz bem calibrada e também, pelo tempo de exposição, medido por um sistema acurado e preciso.

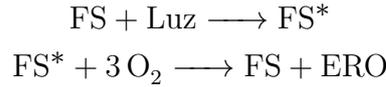
Desde 2012, o Laboratório de Instrumentação Científica, do NFA, vinculado ao Instituto de Física (IF) da Universidade de Brasília, tem projetado e construído equipamentos para uso em TFD, que emitem fótons de 660 nm ou 630 nm, com taxa de fluência

de até 500 mW/cm<sup>2</sup> a 10 cm de distância. Os resultados obtidos com esses equipamentos foram publicados em uma série de artigos em periódicos internacionais (MUEHLMANN et al., 2015; PY-DANIEL et al., 2016; MONGE-FUENTES et al., 2017; MORGADO et al., 2017).

O equipamento conta com um LED, modelo GP-100Wr6-G42M-Z3GL (Guangmai Technology Co., China), potência 100W e tensão de funcionamento 24V. A calibração é feita utilizando-se um medidor de energia e potência FIELD MAX II, item n<sup>o</sup> 1098580, número de série 0099L11R (Coherente, EUA).

A eficiência da aplicação médica da TFD está associada a três fatores principais: a quantidade de luz aplicada ( $L$ ), a quantidade de FS disponível ( $D$ ) no local de aplicação e o total de oxigênio tripleto no sistema ( $O_2$ ) (AAPM, 2005).

Ao receber a luz, o FS é ativado ( $D^*$ ), interagindo com o meio e criando ERO ( $R^*$ ), como apresentado anteriormente.



Por serem extremamente reativas, essas ERO interagem com o sistema (tecido), e uma parte delas ( $f$ ) reage com as células cancerígenas, atacando pontos críticos e causando um acúmulo de dano oxidativo ( $A$ ). Quando o dano excede o limite máximo da célula, ocorre a morte celular.

Com a taxa de fluência aplicada ( $\Phi$ ), é possível quantificar  $L$  em unidades de concentração de fótons (AAPM, 2005) por meio da Equação 2.1.

$$L = \frac{\Phi \lambda}{c} \frac{1000}{hc 6 \times 10^{23}} [\text{mol/L}] \quad (2.1)$$

Onde  $\Phi$  é medida em [ $W/cm^2$ ] ou [ $J/cm^2s$ ],  $\frac{\lambda}{hc}$  equivale ao número de fótons (ph) por Joule [ $ph/J$ ],  $\lambda$  é o comprimento de onda do fóton [cm],  $c$  é a velocidade da luz (aqui,  $3 \times 10^{10}$  [cm/s]),  $h$  é a constante de Planck ( $6,6 \times 10^{-34}$  [Js]), sendo  $1000cm^3$  por litro e  $6 \times 10^{23}$  fótons por mol.

Ainda segundo AAPM (2005), a constante de velocidade ( $k$ ) para ativação de drogas é dado por:

$$k = c\varepsilon [s^{-1}(\text{mol/L})^{-1}] \quad (2.2)$$

Onde  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção do FS [ $cm^{-1}/(\text{mol/L})$ ].

Com isto, tem-se que a taxa de produção de FS ativado é:

$$kLD[(mol/L)s^{-1}] \quad (2.3)$$

E o total de FS ativado produzido por unidade de volume ( $D^*$ ) é:

$$D^* = kLDT = \varepsilon\Phi DT \frac{\lambda}{hc} \frac{1000}{6 \times 10^{23}} [mol/L] \quad (2.4)$$

Com  $T$  sendo o tempo de exposição em [s].

O processo de transferência de energia para o oxigênio no estado tripleto é quântico, logo probabilístico. A probabilidade de produção final de ERO será determinada pela eficiência quântica ( $\phi$ ) do processo e pela concentração de oxigênio no sistema. O total de ERO produzida é então:

$$R^* = \phi D^* [mol/L] \quad (2.5)$$

Porém, apenas uma fração destas ERO atacam pontos críticos da célula que levam à sua morte, ou seja, o acúmulo ( $A$ ) de dano oxidativo é determinado por:

$$A = f\Phi\varepsilon\phi DT \frac{\lambda}{hc} \frac{1000}{6 \times 10^{23}} [mol/L] \quad (2.6)$$

E, se o  $A$  excede o limite máximo da célula ( $A > A_{lim}$ ), ocorre a morte celular (destruição da célula cancerígena).

Para a TFD *in vivo*, é necessária a determinação de outros parâmetros.

A primeira, dosimetria da TFD, mais utilizada (AAPM, 2005), é a dose fotodinâmica de Patterson, Wilson e Graff (1990). Esta dose é dada por:

$$D^* = \varepsilon D \phi T \frac{\lambda}{hc\rho} [ph/g] \quad (2.7)$$

Onde  $\rho$  é a densidade do tecido [ $g/cm^3$ ]. Vê-se que a dose não considera fatores importantes, como eficiência quântica de produção de radicais livres, o efeito do oxigênio tripleto nesta reação e a fração de ERO, que oxida pontos críticos da célula. Com medidas experimentais, é possível definir a dose mínima para induzir a necrose celular, ou seja, a morte celular ocorre quando:

$$D^* > D_{min}^* \quad (2.8)$$

O segundo parâmetro, imperativo para o sucesso da TFD, é a profundidade da penetração da luz no tecido. Segundo AAPM (2005), a penetração de luz em um tecido pode ser escrita, para uma dimensão, como:

$$\phi = Ek_s \exp(-z/\delta) \quad (2.9)$$

Onde  $E$  é a irradiação na superfície no tecido [ $W/cm^2$ ],  $k_s$  é um fator que avalia a luz refletida pelo tecido, podendo aumentar a luz recebida no tecido específico [sem dimensão],  $z$  é a profundidade do tecido [cm] e  $\delta$  é penetração ótica, ou seja, a distância em que há uma queda de 37% da concentração de luz inicial.

Para um tratamento típico de TFD em um local específico, tem-se, utilizando as Equações 2.8 e 2.9:

$$A_{lim} = f\Phi\varepsilon DT \frac{\lambda}{hc} \frac{1000}{6 \times 10^{23}} Ek_s \exp(-z_{necro}/\delta) [mol/L] \quad (2.10)$$

Reorganizando a equação, tem-se:

$$z_{necro} = \delta \ln \left( \frac{f\Phi\varepsilon DT Ek_s \lambda}{A_{lim}} \frac{1000}{hc 6 \times 10^{23}} \right) [cm] \quad (2.11)$$

A Equação 2.11 mostra a relação de diversos parâmetros com a profundidade de tratamento na TFD. Apenas a penetração ótica tem relação linear com  $z_{necro}$ , os outros parâmetros precisam de um aumento significativo para alterar a profundidade do tratamento.

Estas informações são importantes para a área de TFD. Neste trabalho, por ser uma caracterização *in vitro*, sem células, e por utilizar-se um poço que gera uma fina lâmina de solução (para irradiação isotrópica), não é necessário calcular resultado da Equação 2.11.

## 2.2.2 RPE

As espectroscopias são técnicas de medição, como por exemplo de ERO geradas por TFD, onde avalia-se a interação entre a energia (fonte) e a matéria (amostra). Explanando, moléculas e átomos possuem estados discretos, com energias específicas. Ao aplicar energia a essas moléculas, e avaliar as interações, pode-se obter informação sobre sua amostra.

Em espectros de absorção, como obtidos pela RPE, utiliza-se a Lei de Planck:

$$\Delta E = h\nu \quad (2.12)$$

Onde  $h$  é a constante de Planck e  $\nu$  é a frequência da radiação. A absorção da energia faz com que elétrons que estavam em um estado de energia mais baixo, vão para estados mais energéticos. A Figura 5 demonstra esta absorção. Ao variar a energia de excitação, é possível observar em quais energias ocorre maior absorção, discriminando estados diferentes da molécula e gerando um espectro, como visto na Figura 6. Tipicamente, em RPE, utiliza-se micro-ondas, variando em frequências da ordem de  $GHz$  absorvidas pelos elétrons da amostra.

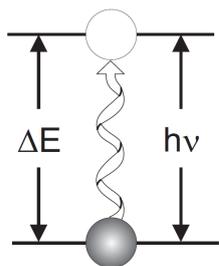


Figura 5 – Detalhe da Absorção (WEBER, 2011).

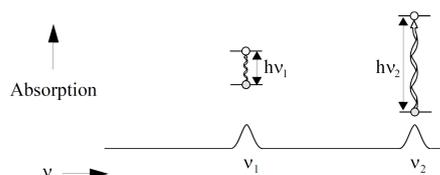


Figura 6 – Exemplo de Espectro (WEBER, 2011).

Na RPE estuda-se a interação de elétrons não pareados da amostra (por consequência, seus estados de energia) com o campo magnético (produzido por um eletroímã), também conhecido como efeito Zeeman. Neste campo, os elétrons se alinham com o campo magnético induzido, pois possuem momento magnético. Este alinhamento garante os estados de menor energia dos elétrons quando paralelos ao campo e de maior energia quando estiver antiparalelo ao campo. Como o elétron é uma partícula de *spin*  $1/2$ , existem apenas dois estados possíveis de alinhamento para com o campo externo, paralelo ( $M_S = -1/2$ ) e antiparalelo ( $M_S = 1/2$ ). A Figura 7 representa os estados supracitados.

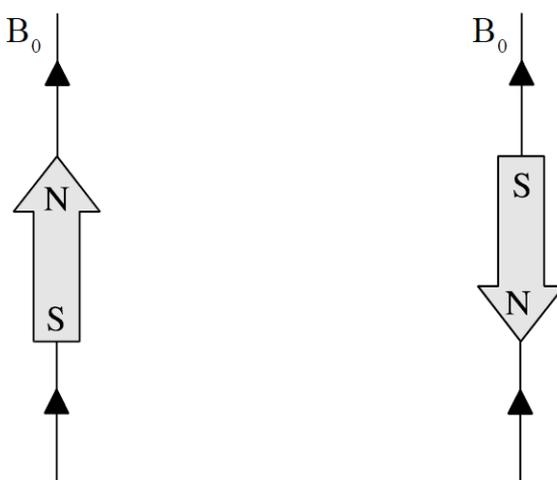


Figura 7 – Momentos possíveis para os elétrons em um campo magnético estático (WEBER, 2011).

Do estudo da mecânica quântica, tem-se a seguinte equação para energia.

$$E = g\mu_B B_0 M_S = \pm \frac{1}{2} g\mu_B B_0 \quad (2.13)$$

E, por consequência,

$$\Delta E = h\nu = g\mu_B B_0 \quad (2.14)$$

Onde  $\mu_B$  é o magneton de Bohr [mesma do campo],  $B_0$  sendo o campo magnético [G] e  $g$  é o fator  $g$ , uma constante de proporcionalidade que, para ERO, é igual a 2. Este fator pode ser calculado da seguinte forma:

$$g = 1 + \frac{J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)}{2J(J+1)} \quad (2.15)$$

$$g_i = g_e + 2\lambda \sum_{n=1,2,\dots} \left( \frac{\langle 0|\hat{L}_i|n\rangle \langle n|\hat{L}_i|0\rangle}{E_0 - E_n} \right) \quad (2.16)$$

$$g_i = 2,0023 + 2\lambda \sum_{n=1,2,\dots} \left( \frac{\langle 0|\hat{L}_i|n\rangle \langle n|\hat{L}_i|0\rangle}{E_0 - E_n} \right) \quad (2.17)$$

$$g_i = 2,0023 \pm \frac{k\lambda}{E_0 - E_n} \quad (2.18)$$

Das Equações 2.13 e 2.14 fica claro que: na ausência de um campo magnético, os dois estados do *spin* possuem a mesma energia e as energias dos estados dos *spin* divergem linearmente com o aumento do campo magnético ( $\frac{g\mu_B}{h} = 2,8\text{MHz/G}$ ). Daí, tem-se duas consequências na RPE.

- Sem o campo magnético não existe diferença de energia para ser medida;
- A diferença de energia depende linearmente do campo magnético.

Na RPE mantém-se a frequência da radiação eletromagnética constante e varre-se o campo magnético. Um pico de absorção ocorrerá quando o campo magnético sincronizar os estados dos *spin* de forma que a diferença em suas energias seja equivalente à energia da radiação incidente. Quando este fenômeno ocorre, tem-se um campo de ressonância. Infelizmente, o campo de ressonância não é único para identificação de determinadas partículas/moléculas, podendo ser formado de diversas formas. Para contornar isto, utiliza-se o fator  $g$ , que independe da frequência das micro-ondas.

$$g = \frac{h\nu}{\mu_B B_0} \quad (2.19)$$

Da Equação 2.19, pode-se encontrar o valor de  $B_0$  onde ocorre o campo de ressonância ( $B_{res}$ ). Como dito,  $g = 2$  (radicais livres) e, para Banda X,  $\nu = 9,75GHz$ , logo,

$$B_{res} = 3480 G \quad (2.20)$$

Pela dependência do fator  $g$  em relação ao campo externo e à frequência de onda aplicada, representados na Equação 2.19, a utilização de qualquer parâmetro, que não o  $g$ , diretamente para caracterização da amostra, como por exemplo o  $\nu$ , resulta em dados sem informações relevantes sobre o campo de ressonância. Por outro lado, mesmo acoplado o equipamento com uma frequência diferente, o fator  $g$  do campo de ressonância daquela amostra não deve variar. A variação do fator  $g$  está associada à variação do ambiente físico que circunda o centro paramagnético.

O elétron não pareado que gera o espectro da RPE é extremamente sensível ao seu redor. O núcleo dos átomos dentro das moléculas pode possuir um momento magnético (a técnica de Ressonância Magnética Nuclear interage com este momento) e, por consequência, produz um campo magnético local no elétron. Esta interação entre o elétron e o núcleo é conhecida como interação hiperfina. É desta interação que se obtém informações sobre a amostra, como deslocalização das funções de onda eletrônicas. A Figura 8 apresenta esta interação. O campo gerado pelo núcleo pode adicionar ou subtrair o campo magnético externo. Quando subtrai, é necessária uma intensidade maior do campo magnético externo, logo o campo de ressonância é aumentado por  $B_I$ . O oposto é verdadeiro quando o  $B_I$  está paralelo ao campo externo.

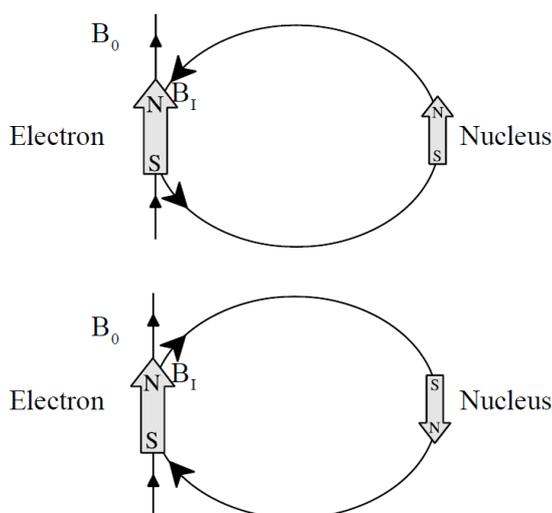


Figura 8 – Interação Hiperfina (WEBER, 2011).

Para núcleos com *spin*  $1/2$ , como o núcleo do hidrogênio, que é composto por

um próton (prótio), observa-se que o sinal de absorção da RPE se divide em dois sinais, afastados uma distância de  $B_I$  do sinal original. A Figura 9 apresenta esta divisão.

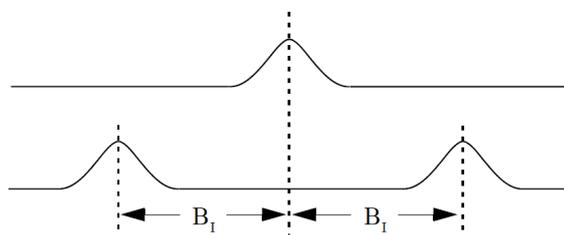


Figura 9 – A divisão do sinal está localizada a  $B_I$  do sinal original (WEBER, 2011).

Para qualquer valor diferente de *spin* 1/2, deve-se usar a equação de número de linhas, ou multiplicidade.

$$n = 2I + 1 \quad (2.21)$$

Onde  $I$  é o número de *spin* do núcleo. Na Figura 10 é possível observar alguns exemplos do aumento do número de linhas.

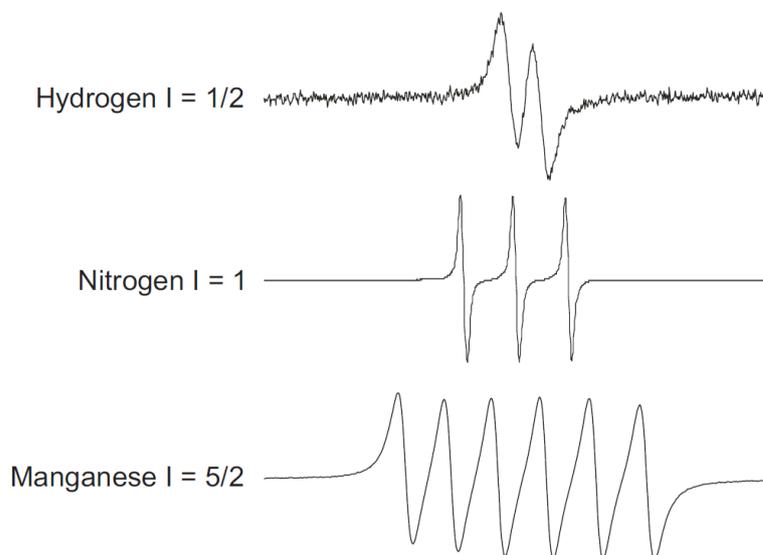


Figura 10 – Número de linhas resultantes de interações hiperfinas para valores de *spin* quântico nuclear maior que 1/2 (WEBER, 2011)

Existe uma situação em que dois núcleos de *spin* 1/2 possuem o mesmo acoplamento hiperfino, o que causa uma nova divisão das linhas. Essas linhas porém, podem ter uma interação construtiva, aumentando a intensidade em algumas linhas, como visto na Figura 11.

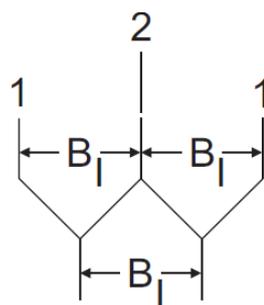


Figura 11 – Interação construtiva, resultando em uma linha com o dobro da intensidade, comparada às outras (WEBER, 2011).

A intensidade da interação construtiva é dada por um binômio. Com o aumento de núcleos dentro do sistema, há um aumento exponencial do sinal de RPE. Isto resulta em um sinal conjunto de várias espécies, conhecido como espectro de Gauss.

$$\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!} \quad (2.22)$$

É importante perceber que o espectro gerado pela RPE sofre fenômenos de modulação, o que resulta na primeira derivada do sinal de absorção. Para obter a intensidade integrada, é necessário integrar duas vezes o sinal da RPE. O valor do último ponto desta dupla integrada é igual a área de absorção da RPE e diretamente proporcional ao número de centros paramagnéticos.

Radicais livres, por sua natureza, são excelentes candidatos para detecção por meio de RPE. Porém, seus tempos de meia-vida são extremamente curtos (na ordem de nanosegundos) e possuem um tempo de decaimento dos *spin* eletrônicos excitados de um estado para outro muito curto, tornando assim a largura da transição extremamente extensa, o que impede o registro nos equipamentos convencionais. Para solucionar este problema, utilizam-se marcadores de *spin*. Estes, se ligam aos radicais livres formando adutos de *spin*, que apresentam meia vida longa e, conseqüentemente, sinal. Logo, a medição de marcadores de *spin* por RPE representa uma medida direta da quantidade de ERO presente na amostra.

As medidas de RPE foram realizadas em um espectrômetro Bruker EMXplus de onda contínua, utilizando banda X (9 GHz), em cavidade de alta sensibilidade (ER 4119HS). Ainda, foram realizadas com um Campo Central de 3360,80 G, com varredura de 399,70 G em 15,01 s. Para todas as amostras foram realizadas duas varreduras. A Tabela 1 mostra todas as variáveis utilizadas nas medidas de RPE.

| Variável                                   | Valor      |
|--|------------|
| Campo de Ressonância (G)                   | 3360.8     |
| Largura de Varredura (G)                   | 399.705882 |
| Tempo de Varredura (s)                     | 15.01      |
| # de Varreduras                            | 2          |
| Ganho (dB)                                 | 30         |
| Amplitude de Modulação (G)                 | 5          |
| Frequência de Modulação (kHz)              | 100        |
| Fase de Modulação                          | 0          |
| Frequência das Micro-ondas (GHz)           | 9.43659    |
| Atenuação de Potência das Micro-ondas (dB) | 20         |
| Potência das Micro-ondas (mW)              | 2000       |

Tabela 1 – Parâmetros de configuração do equipamento de RPE realizados neste trabalho

Para medir as ERO na RPE, após a iluminação no poço, colocou-se a amostra em seringa de 1 mL, garantindo a reprodutibilidade do volume para medição na RPE de 400  $\mu\text{L}$ . Essa seringa foi então mergulhada em nitrogênio líquido, para estabilizar todas as reações do sistema, inclusive contaminação com o oxigênio e, especialmente, medir a amostra congelada. É necessário congelar a amostra porque a água em estado líquido possui uma constante dielétrica trinta vezes maior do que em seu estado sólido, causando assim grande interação com as micro-ondas. Com isto, permite-se a medida utilizando o *Finger Dewer*, equipamento que é colocado dentro do espectroscópio.

Para apresentar os dados obtidos da RPE, não foi utilizado o espectro obtido de maneira direta. Por isso, os gráficos deste trabalho apresentam a concentração de  $\text{CM}\bullet$  ( $[\text{CM}\bullet]$ , em  $\mu\text{M}$ ), obtida por meio de uma curva de calibração realizada anteriormente no equipamento.

Para obter o valor de  $[\text{CM}\bullet]$ , são necessárias duas parametrizações das amplitudes medidas:

A primeira, comparando a amplitude medida, o seu coeficiente  $Q$  e um coeficiente  $Q$  de referência (utilizado um  $[\text{CM}\bullet]$  comprado diretamente da empresa fornecedora), sendo este igual a 8000 para estas medidas. A fórmula para normalização da amplitude é dada pela seguinte equação:

$$\text{Amplitude}_{normalizada} = \frac{Q_{referência}}{Q_{medido}} * \text{Amplitude}_{medida} \quad (2.23)$$

A segunda, para encontrar a concentração de  $\text{CM}\bullet$ , utiliza-se a seguinte fórmula:

$$[\text{CM}\bullet] = \frac{\text{Amplitude}_{normalizada} - 0,33}{0,34} \quad (2.24)$$

## 2.2.3 Fluorescência

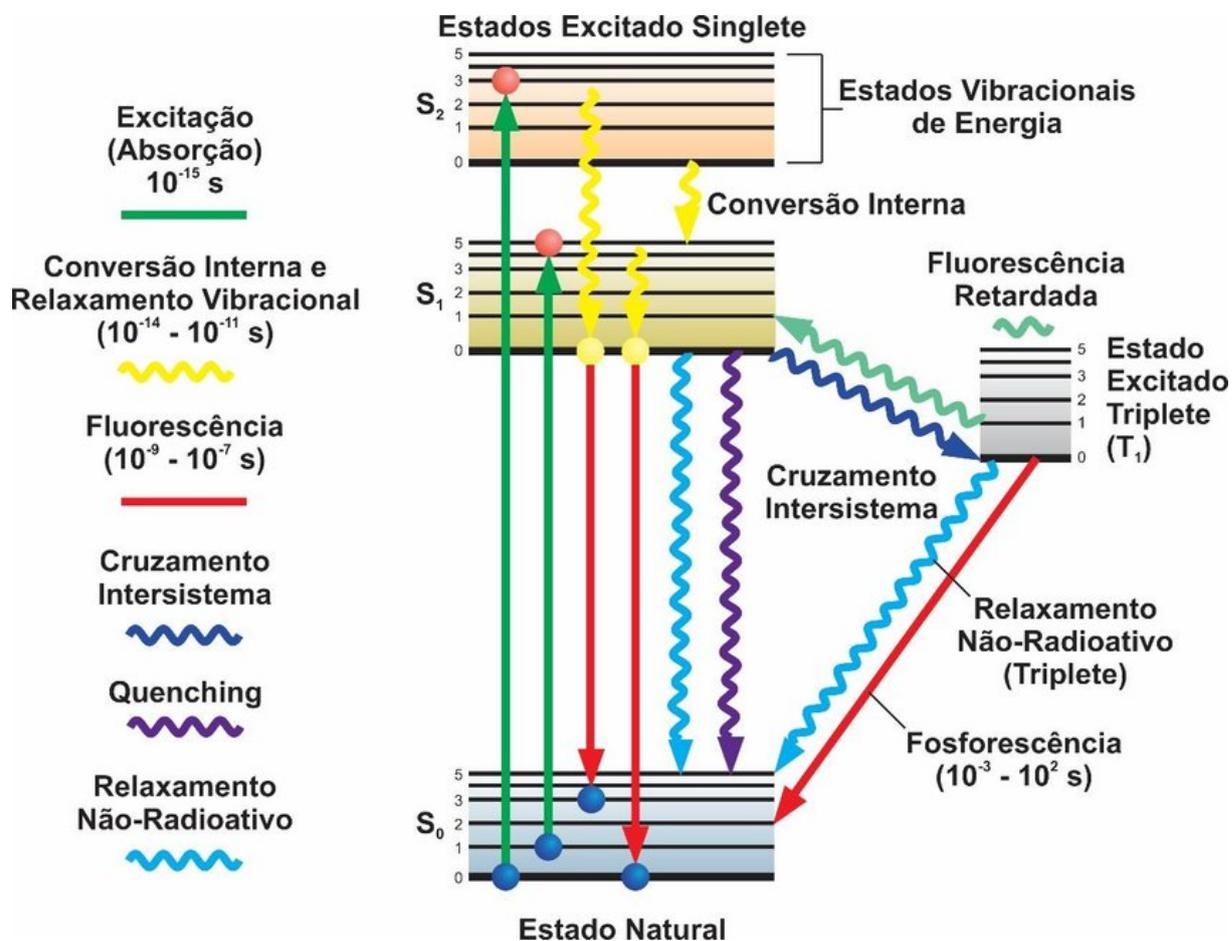


Figura 12 – Diagrama de Jablonski (ISLER et al., 2018)

A técnica de espectroscopia de fluorescência, também conhecida como fluorimetria, analisa a emissão de fótons de estados eletrônicos excitados de uma amostra. A ALPcCl, para produção de ERO via TFD, passa por diversos estados excitados (emitindo fótons), como apresentado na Figura 12. Este sistema, por ser probabilístico, deve apresentar todos os processos descritos, mesmo que em menor quantidade, caso estejam ocorrendo. Logo, é esperado que haja uma detecção no fluorímetro.

A primeira etapa do processo, que pode ser acompanhado pela representação da Figura 12, é a excitação eletrônica da molécula com a absorção de fótons. Uma vez no estado excitado, a emissão de fótons ocorre com a relaxação eletrônica deste estado para estados de energia mais baixa, normalmente estado fundamental.

A relaxação eletrônica pode ocorrer por fluorescência, fosforescência ou decaimento não radioativo. A fluorescência ocorre quando o elétron, no estado excitado, possui a mesma configuração de *spin* que no estado fundamental. Este é um decaimento bastante

rápido, com velocidades distintas entre compostos e ambientes químicos, mas da ordem de nanossegundos. Isto pode ser visto na Tabela 2.

| Transição                             | Processo                    | Tempo (segundos)          |
|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| $S(0) \longrightarrow S(1)$ ou $S(n)$ | Absorção (excitação)        | $10^{-15}$                |
| $S(n) \longrightarrow S(1)$           | Conversão Interna           | $10^{-14}$ até $10^{-10}$ |
| $S(1) \longrightarrow S(1)$           | Relaxação vibracional       | $10^{-12}$ até $10^{-10}$ |
| $S(1) \longrightarrow S(0)$           | Fluorescência               | $10^{-9}$ até $10^{-7}$   |
| $S(1) \longrightarrow T(1)$           | <i>Intersystem Crossing</i> | $10^{-10}$ até $10^{-8}$  |
| $S(1) \longrightarrow S(0)$           | Decaimento Não Radiativo    | $10^{-7}$ até $10^{-5}$   |
| $T(1) \longrightarrow S(0)$           | Fosforescência              | $10^{-3}$ até $10^2$      |
| $T(1) \longrightarrow S(0)$           | Decaimento Não Radiativo    | $10^{-3}$ até $10^2$      |

Tabela 2 – Escala de tempo de processos do Diagrama de Jablonski (HERMAN et al., 2020)

A fosforescência se caracteriza pelo decaimento de um elétron que sofreu mudança de *spin* no processo de excitação. O decaimento por este processo é mais lento, normalmente com tempos da ordem de microssegundos até minutos sendo possível, em alguns casos, sua identificação a olho nu. O decaimento não radiativo pode ocorrer por causa de transferência interna de energia (exemplo, calor) ou desativação de estado excitado com transferência de energia/carga da molécula no estado excitado para outras estruturas moleculares.

Um detector posicionado perpendicularmente à fonte emissora (Figura 13) detecta os fótons provenientes da amostra em diferentes comprimentos de onda, gerando assim o espectro.

Foram coletados espectros, utilizando o equipamento Fluorolog-3 produzido pela HORIBA. O primeiro conjunto de espectros foram: água, AlPcCl ( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) livre em água, e AlPcCl ( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluída em água com CMH ( $400\mu\text{M}$ ). O segundo conjunto foram: etanol, AlPcCl ( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) livre em etanol, e AlPcCl ( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) diluída em etanol com TEMP ( $100\mu\text{M}$ ). É importante ressaltar que, para o TEMP neste experimento, colocou-se a diluição completa em álcool, pois não havia a necessidade de congelar a amostra (condição necessária para a realização das medidas na RPE).

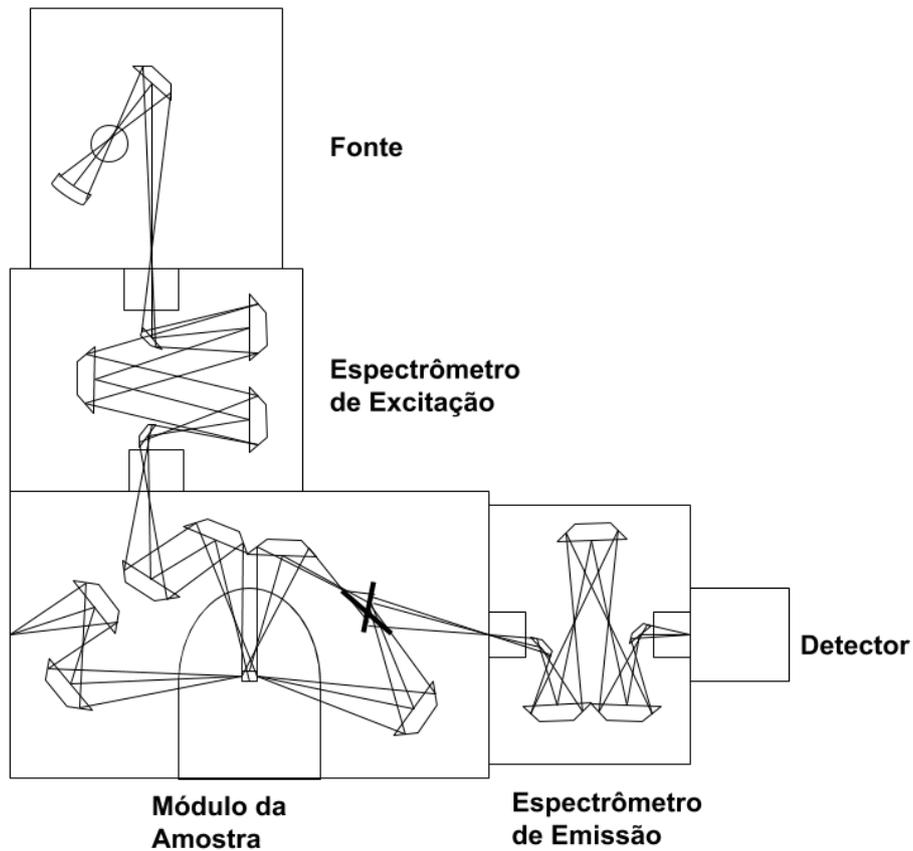


Figura 13 – Desenho técnico do Fluorímetro Fluorlog 3

Após uma sequência de variações entre os parâmetros de abertura das fendas, obteve-se um grupo otimizado de parâmetros para medida. Para os dois conjuntos (CMH ( $400\mu\text{M}$ ) e TEMP ( $100\mu\text{M}$ )) as condições foram:

- Excitação em  $650\text{ nm}$
- *Bandpass* de entrada em  $5\text{ mm}$
- *Bandpass* de saída em  $5\text{ mm}$
- Passo de  $0,1\text{ nm}$
- Tempo de integração de  $0,8\text{ s}$
- Coleta entre  $670$  e  $750\text{ nm}$

## 2.2.4 UV-VIS

A absorção na região do UV-Vis (Ultravioleta-Visível) avalia a energia absorvida ao passar pela amostra. Normalmente as lâmpadas emitem radiação entre 250 nm e 1100 nm. Isto é feito posicionando-se uma amostra entre a trajetória do fóton emitido pela fonte até o detector. O feixe proveniente da fonte é dividido, sendo que parte deste sinal é lido diretamente no detector, gerando uma referência, e a outra parte passa pela amostra, sendo processada posteriormente e comparando-se o sinal das duas.

Neste experimento, utilizou-se a técnica de UV-Vis para avaliar a presença de oxigênio singleto no sistema de AlPcCl, durante a incidência luminosa. Este resultado era esperado, devido as medidas obtidas pela fluorescência, mas uma confirmação experimental era necessária.

A transmitância (T) é definida pela fração da intensidade da radiação incidente, transmitida pela solução, que é identificada no detector. Ela está relacionada com a absorbância (A) de forma logarítmica, como mostra a equação abaixo.

$$A = -\log T \quad (2.25)$$

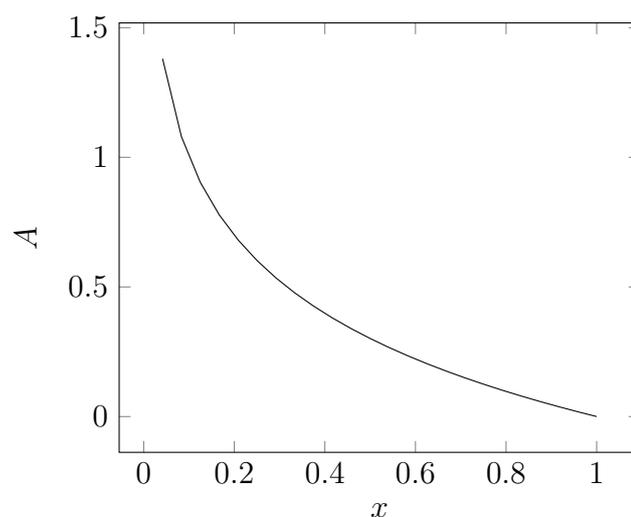
Para a detecção do oxigênio singleto, é necessário utilizar um reagente químico que sinalize a criação do oxigênio singleto. O 1,3-diphenylisobenzofuran (DBF) é uma sonda amplamente conhecida pela interação com o oxigênio singleto. Ele possui seu pico de absorção em 420nm, valor definido para emissão do equipamento de UV-Vis. Ao interagir com o oxigênio singleto, essa sonda (DBF) é degradada, aumentando a intensidade da luz que chega no detector. Para o cálculo da absorbância, o equipamento utiliza a seguinte fórmula (Lei de Lambert-Beer):

$$A = -\log \frac{I}{I_o} \quad (2.26)$$

Onde  $I$  é a intensidade que chega ao detector e  $I_o$  é a intensidade que sai da fonte. Para fins de cálculo, temos que a  $I$  sempre será uma porcentagem da  $I_o$ . Ou seja,  $I = x\% * I_o$ . A fórmula anterior pode ser reescrita então como:

$$A = -\log(x) \quad (2.27)$$

Com  $x$  variando de 0 (absorção total da luz de comprimento de onda específico) até 1 (não ocorre absorção alguma). Os valores de absorbância, que indicam o quanto de radiação que um material absorve num dado comprimento de onda, podem ser descritos por uma função  $-\log(x)$ , com  $x$  de 0 até 1. O gráfico abaixo mostra o comportamento desta função.

Figura 14 – Curva da função  $-\log(x)$ 

Nesta etapa, o DBF será utilizado para avaliar a produção de ERO a partir de sua degradação.

Com a produção de oxigênio singleto, tem-se a eliminação específica do DBF, aumentando a intensidade da luz de 420nm que chega ao detector (diminuindo  $A$ ).

## 3 Resultados

Neste capítulo, serão apresentados os dados relacionados às técnicas de RPE, Fluorimetria e UV-Vis, para detecção de ERO produzidas com TFD, utilizando a AIPcCl como FS e o CMH como marcador de *spin*. Alguns dados dos ensaios da AIPcCl usando o marcador TEMP são apresentados no apêndice A, pois carregariam em demasiado o texto e não agregariam informações importantes para os objetivos deste trabalho.

A técnica RPE foi a principal utilizada para determinação das ERO. Após alguns resultados contraintuitivos, foi necessária a utilização de duas técnicas complementares para confirmação dos resultados. Uma técnica foi a de fluorescência, para avaliar a interação dos marcadores escolhidos com a AIPcCl e, pelos resultados positivos apresentados, foi realizada uma confirmação utilizando a técnica de UV-Vis.

### 3.1 RPE

O primeiro passo foi a determinação da concentração ótima de AIPcCl a ser utilizada nos demais ensaios. Para isto, foi estabelecida uma curva de calibração, onde buscou-se uma região onde o comportamento da produção de  $[CM\bullet]$  fosse diretamente proporcional a  $[AIPcCl]$ . Em seguida, analisou-se quais eram os efeitos da fluência de energia luminosa no sistema. Buscava-se uma região de comportamento linear. Pela condição de claridade proveniente da luz do laboratório, foi necessário medir os efeitos da luz ambiente na solução de AIPcCl. Com estes dados foi possível estabelecer as condições otimizadas para a presente pesquisa, sendo:

- **Concentração de AIPcCl** foi de  $20\mu g/mL$ ;
- **Fluência de Energia Luminosa** foi de  $131mW/cm^2$ ;

Por fim, foram adicionados os respectivos sequestradores para cada ERO e avaliou-se a mudança no sistema, por meio de análises estatísticas.

#### 3.1.1 Relação entre produção de ERO e concentração de AIPcCl

A curva de saturação da produção de ERO pela ftalocianina é importante para a escolha da concentração. Caso a escolha de concentração seja fora da parte linear, dificulta a previsão de quanto ERO deveria ser produzido no sistema. A concentração ótima de AIPcCl foi determinada a partir da quantidade de  $[CM\bullet]$  produzida em meio reacional.

A Figura 15 apresenta os dados da produção de  $[CM\bullet]$  em função da concentração de AICIPc.

É possível observar que existem duas regiões no gráfico da Figura 15 que são dependentes da concentração da AIPcCl: Uma parte linear, com comportamento bem definido e um *plateau*, com comportamento mais incerto (onde um aumento da concentração não gera um aumento proporcional na produção de ERO). Buscou-se montar um experimento o mais controlado possível e, para isto, foi escolhido um ponto na reta para teste com os sequestradores. A produção de ERO de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AIPcCl encontra-se no centro da região de linearidade (que pode observada pela análise de  $R^2$ ), garantindo que ensaios realizados nesta concentração apresentem valores suficientemente grandes para se ter boa resolução das análises e, ainda assim, distante da região de não linearidade, dando confiabilidade aos dados.

Pelo Diagrama de Jablonski (Figura 4), FS produzem quatro ERO: oxigênio singleto, superóxido, peróxido de hidrogênio, e hidroxila. Dentro da técnica de RPE, mede-se a produção total de ERO pela soma do sinal obtido por todas ERO do sistema.

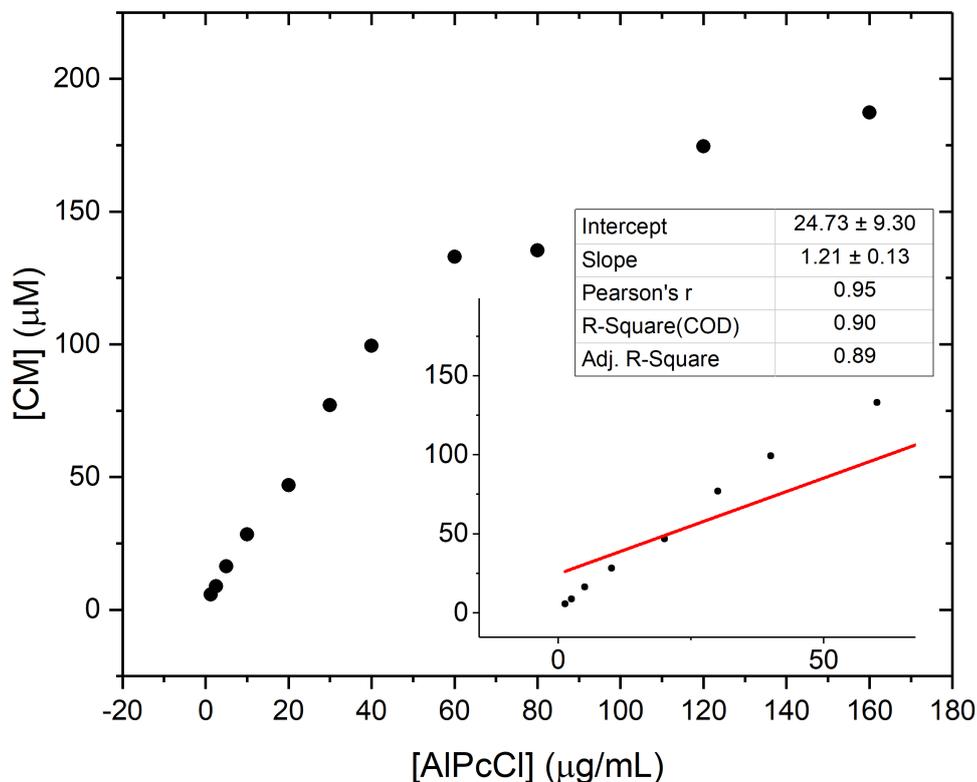


Figura 15 – Nesta curva de  $[CM\bullet]$  em função da  $[AIPcCl]$ , foi escolhida a concentração de  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  de  $AIPcCl$ . No detalhe à direita, vemos o regime linear da produção de ERO.

### 3.1.2 Determinação da Fluência de Energia Luminosa para uma concentração de $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ de $AIPcCl$

A Figura 16 apresenta a curva de produção de  $[CM\bullet]$  em função da fluência de energia luminosa do equipamento de TFD. Observa-se que, para uma fluência menor que  $100 \text{ mW}/\text{cm}^2$ , existe uma variação muito grande da concentração de  $[CM\bullet]$  produzida. Para valores maiores que este, a curva fica estável, garantindo uma produção uniforme de  $[CM\bullet]$ . Nesta etapa foi escolhido o valor de  $131 \text{ mW}/\text{cm}^2$  para todas as medidas, uma vez que valores menores possuem grande variação na produção, como pode ser observado na Figura 16 - o que é de difícil controle - e, para valores maiores, não há diferença na produção.

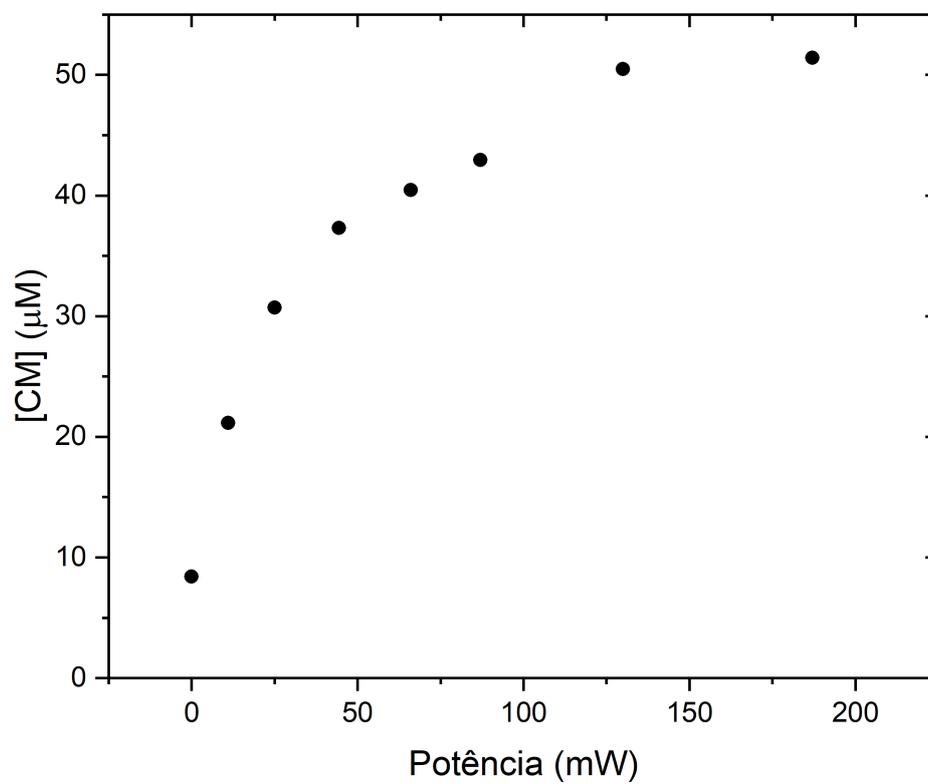


Figura 16 – [CM•] com a variação da fluência de energia luminosa. A fluência escolhida nesta pesquisa foi de  $131 \text{ mW}/\text{cm}^2$ , garantindo assim a excitação de toda a amostra.

### 3.1.3 Determinação da Influência da Luz Ambiente no Sistema

A Figura 17 apresenta os resultados da exposição do CMH ( $400\mu\text{M}$ ) à luz ambiente do laboratório. É possível observar que a luz ambiente resultou em produção de ERO, porém esta ainda foi menor do que a obtida com o equipamento devido à baixa fluência luminosa da luz ambiente.

Ainda é possível observar que não foi atingido um *plateau* de saturação. Foi feita então uma regressão linear para apresentar a produção de  $[\text{CM}\bullet]$  pelo tempo:

$$[\text{CM}\bullet](\mu\text{M}) = 3,17675 * \text{tempo}(\text{min}) + 15,638$$

É possível observar que, a cada minuto exposta à luz ambiente e, ao ar atmosférico, a taxa de produção do  $[\text{CM}\bullet]$  pela ALPcCl ( $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nas condições apresentadas é de  $3,18 (\mu\text{M})/\text{minuto}$ .

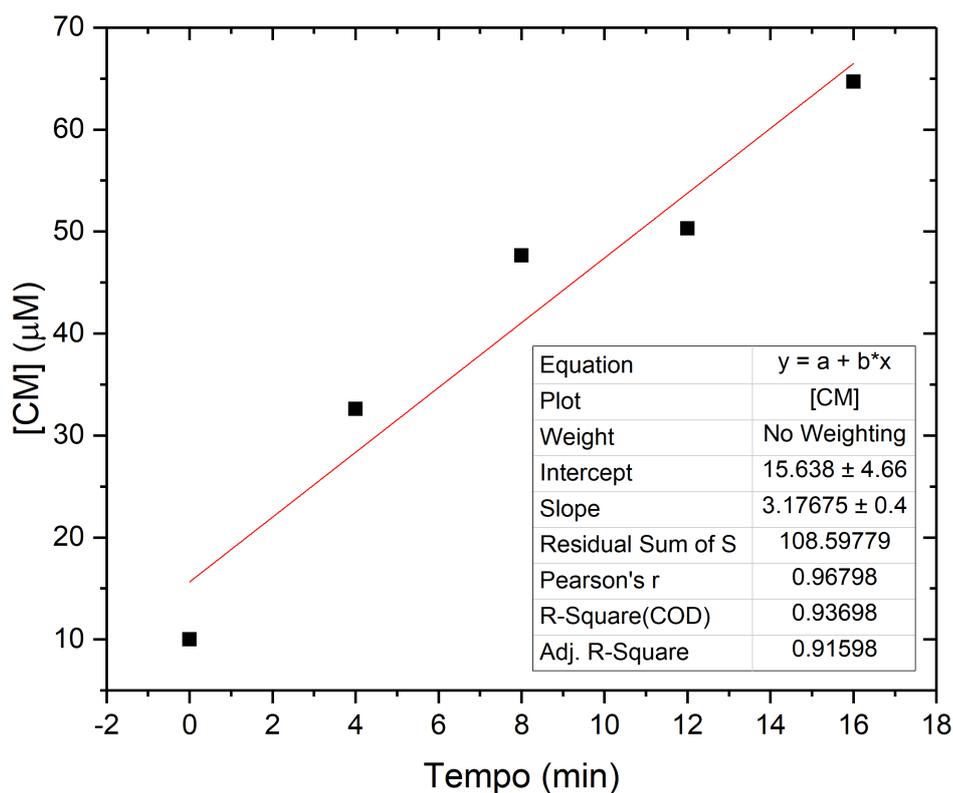


Figura 17 – Produção de  $[\text{CM}\bullet]$  sob a incidência de luz ambiente.

Pela Figura 17, percebe-se que, com um espaço de tempo longo, grande parte do CMH é marcado. Não é possível eliminar a utilização do LED, mesmo com este resultado,

uma vez que o LED garante uma constância de fótons no comprimento de onda desejado, bem como a produção de muitas ERO em um curto intervalo de tempo.

### 3.1.4 Controle

Durante a pesquisa, em todos os dias que ocorreram medidas, foi feito o controle da solução de AlPcCl ( $20\mu\text{g/mL}$ ) com CMH ( $400\mu\text{M}$ ), irradiados por um minuto, sem a presença de sequestrador. Com isto, estabelecia-se a produção máxima de ERO do dia e comparava-se esta com o resultado com o sequestrador. Em seguida, determinava-se o efeito do sequestrador na produção de ERO. Estes resultados estão apresentados nas seções 3.1.5 até 3.1.9.

Abaixo são apresentados os dados anotados em ata, bem como valores estatísticos simples.

| Data       | Amplitude | Q    | Amplitude Normalizada | [CM]  |
|------------|-----------|------|-----------------------|-------|
| 23/10/2019 | 12,2      | 6000 | 16,27                 | 46,87 |
| 23/10/2019 | 12,2      | 6000 | 16,27                 | 46,87 |
| 23/10/2019 | 12,9      | 6000 | 17,20                 | 49,62 |
| 4/11/2019  | 15,7      | 7500 | 16,75                 | 48,28 |
| 5/11/2019  | 27,52     | 7500 | 29,35                 | 85,37 |
| 5/11/2019  | 25,06     | 7400 | 27,09                 | 78,71 |
| 5/11/2019  | 21,24     | 7500 | 22,66                 | 65,66 |
| 5/11/2019  | 20,4      | 7400 | 22,05                 | 63,89 |
| 7/11/2019  | 15,2      | 7400 | 16,43                 | 47,36 |
| 7/11/2019  | 15,7      | 7400 | 16,97                 | 48,95 |
| 12/11/2019 | 16,8      | 8000 | 16,80                 | 48,44 |
| 13/11/2019 | 17,5      | 7000 | 20,00                 | 57,85 |
| 6/12/2019  | 15,4      | 7500 | 16,43                 | 47,34 |
| 6/12/2019  | 20        | 7500 | 21,33                 | 61,77 |
| 11/02/2020 | 21,55     | 7500 | 22,99                 | 66,64 |
| 11/02/2020 | 23,5      | 7700 | 24,42                 | 70,84 |

Tabela 3 – Replicatas do controle de AlPcCl ( $20\mu\text{g/mL}$ )

|           |        |
|-----------|--------|
| $\bar{x}$ | 58,41  |
| dp(x)     | 12,48  |
| var(x)    | 155,66 |

Tabela 4 – Dados estatísticos - Controle de AlPcCl ( $20\mu\text{g/mL}$ )

### 3.1.5 Íon Superóxido

Foi adicionada à solução padrão (AlPcCl, água e CMH ( $400\mu\text{M}$ )), a superóxido dismutase, para eliminar a contribuição do íon superóxido ( $\text{O}_2^-$ ).

## 3.1.5.1 SOD

A Figura 18 apresenta o gráfico da produção de  $[CM\bullet]$ , pela AIPcCl ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), na presença de diferentes concentrações de SOD. A linha vermelha representa o valor de  $[CM\bullet]$  da amostra controle (sem nenhum sequestrador), medido no dia do experimento da superóxido dismutase (SOD), em um sistema com AIPcCl e CMH. Além disto, os pontos apresentam valores de  $[CM\bullet]$  para diferentes concentrações de SOD, responsável pela eliminação da ERO (superóxido) no sistema. Como apresentado por Scheinok et al. (2018), o valor de referência é de 300 U para a concentração escolhida. Porém, foram feitas medidas com diferentes concentrações de SOD, com o objetivo de verificar o comportamento do sistema. Como é possível observar abaixo, a partir de 300U temos uma diminuição percentual que indica a tendência de saturação do sistema. Como existe uma queda expressiva na  $[CM\bullet]$ , tem-se que houve, de fato, uma inibição do superóxido na marcação do CMH. Logo, a SOD está funcionando da forma esperada.

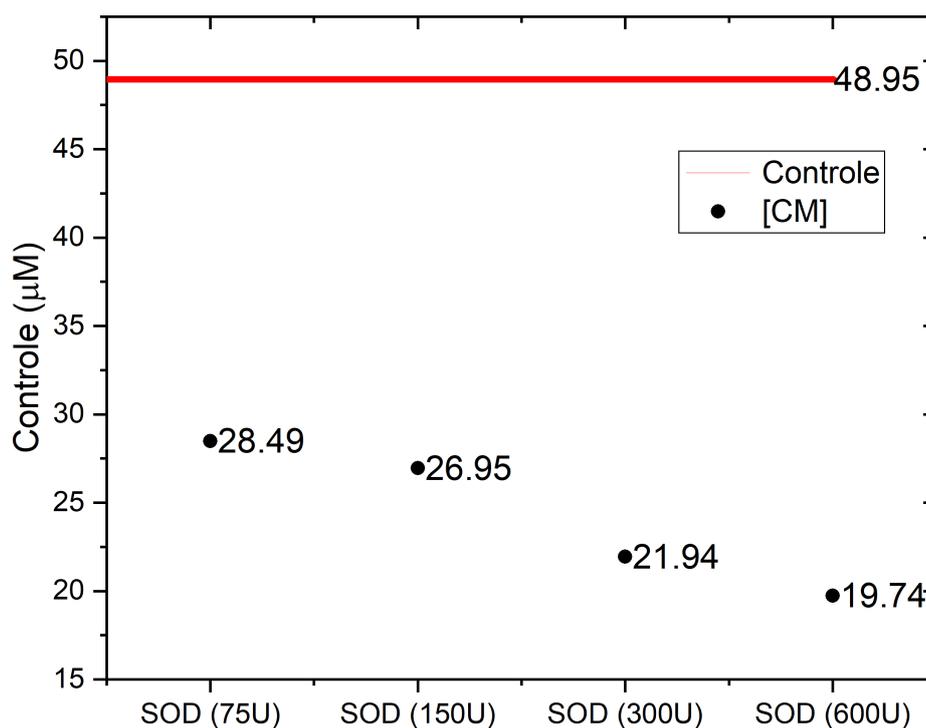


Figura 18 –  $[CM\bullet]$  com SOD. A linha vermelha apresenta o controle (AIPcCl e CMH) feito no dia do experimento para determinação da concentração de SOD.

Abaixo são apresentados os dados anotados em ata, bem como valores estatísticos simples.

| Data       | Amplitude | Q    | Amplitude Normalizada | [CM]  |
|------------|-----------|------|-----------------------|-------|
| 7/11/2019  | 7,79      | 7400 | 8,42                  | 23,80 |
| 7/11/2019  | 7,79      | 8000 | 7,79                  | 21,94 |
| 7/11/2019  | 7,24      | 8000 | 7,24                  | 20,32 |
| 11/02/2020 | 10,9      | 7500 | 11,63                 | 33,23 |
| 11/02/2020 | 9,82      | 7500 | 10,47                 | 29,84 |

Tabela 5 – Replicatas com a SOD (300U)

|           |       |
|-----------|-------|
| $\bar{x}$ | 25,83 |
| $dp(x)$   | 5,48  |
| $var(x)$  | 30,08 |

Tabela 6 – Dados estatísticos - SOD (300U)

### 3.1.6 Peróxido de Hidrogênio

Foi adicionada a catalase à solução padrão (AIPcCl (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), água e CMH (400 $\mu\text{M}$ )), para eliminar a contribuição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

#### 3.1.6.1 Catalase

Assim como no experimento com SOD, foram realizadas diferentes medidas de concentração de Catalase, responsável pela eliminação de peróxido de hidrogênio na amostra. Na Figura 19 apresenta-se o gráfico da produção de [CM•] pela AIPcCl (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na presença de diferentes concentrações de Catalase. A linha vermelha apresenta o valor de [CM•] da amostra controle (apenas AIPcCl (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e CMH (400 $\mu\text{M}$ )), e os pontos abaixo apresentam os valores de [CM•] para diferentes concentrações de Catalase, responsável pela eliminação da ERO (peróxido de hidrogênio) no sistema. O valor de referência era de 300 U (SCHEINOK et al., 2018), e pela variação mostrada na figura, adotou-se este valor para as medidas. Como houve uma queda acentuada, deduz-se que a catalase está de fato interferindo com o peróxido, diminuindo assim sua contribuição com o sinal de RPE. Então, a catalase está funcionando adequadamente.

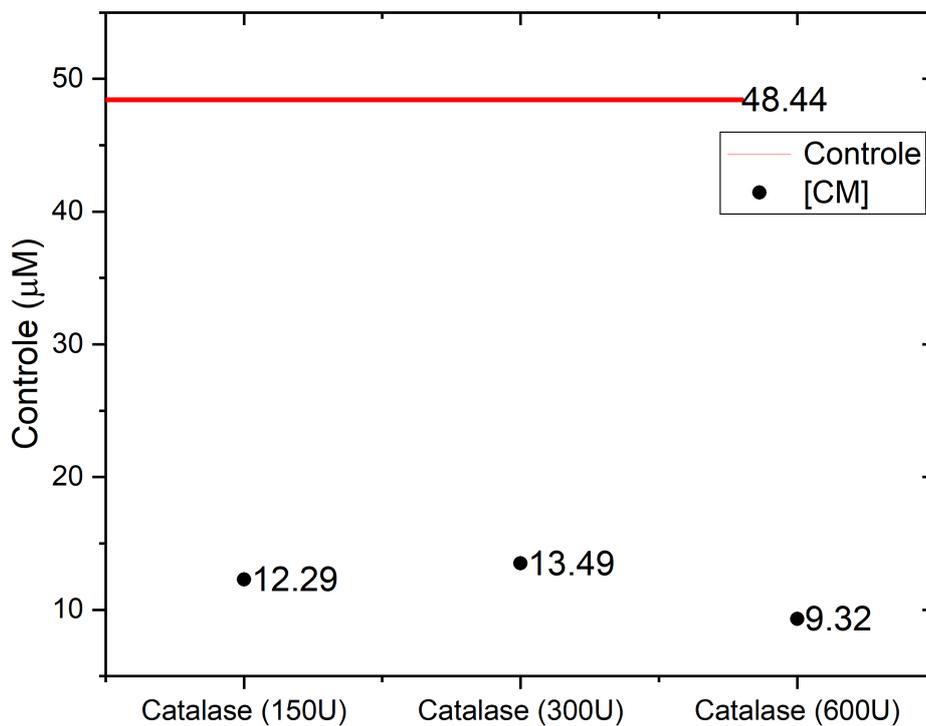


Figura 19 – [CM●] com catalase. A linha vermelha apresenta o controle (AIPcCl (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e CMH (400 $\mu\text{M}$ )) feito no dia do experimento para determinação da concentração de catalase.

Abaixo são apresentados os dados anotados em ata, bem como valores estatísticos simples.

| Data       | Amplitude | Q    | Amplitude Normalizada | [CM]  |
|------------|-----------|------|-----------------------|-------|
| 12/11/2019 | 4,61      | 7500 | 4,92                  | 13,49 |
| 11/02/2020 | 3,4       | 7500 | 3,63                  | 9,70  |
| 11/02/2020 | 3,48      | 7500 | 3,71                  | 9,95  |

Tabela 7 – Replicatas com a Catalase (300U)

|           |       |
|-----------|-------|
| $\bar{x}$ | 11,05 |
| $dp(x)$   | 2,12  |
| $var(x)$  | 4,51  |

Tabela 8 – Dados estatísticos - Catalase (300U)

### 3.1.7 Hidroxila

Foi adicionado à solução padrão (AlPcCl (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), água e CMH (400 $\mu\text{M}$ )) o DMTU, para eliminar a contribuição da hidroxila ( $\text{OH}^-$ ).

#### 3.1.7.1 DMTU

O DMTU é utilizado para eliminar a hidroxila do sistema. Pelo processo cascata de produção das ERO (Superóxido decai produzindo Peróxido de Hidrogênio, que decai produzindo a Hidroxila), espera-se que a utilização do DMTU não altere de maneira significativa a  $[\text{CM}\bullet]$  medida.

Na Figura 20 apresenta-se o gráfico da produção de  $[\text{CM}\bullet]$  pela AlPcCl (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na presença de diferentes concentrações de DMTU. É possível observar que, utilizando-se 0,3 mM de DMTU, não ocorre mudança da concentração em relação ao valor de  $[\text{CM}\bullet]$  da amostra controle (linha vermelha, amostra com ftalocianina e CMH apenas) e que, para uma concentração de 30 mM de DMTU tem-se uma leve diminuição da  $[\text{CM}\bullet]$ . Isso, na pré-análise estatística, sugere que ouve uma redução na produção de ERO do sistema. Porém, por ser muito baixa, deve-se fazer uma análise estatística comprovando a diferença em relação ao controle.

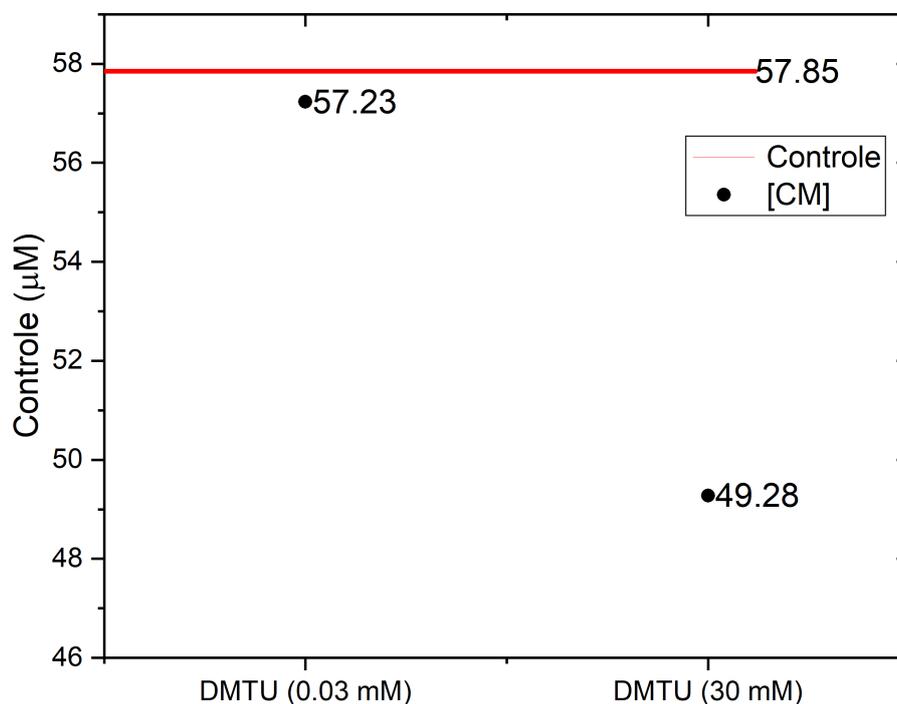


Figura 20 – [CM] com DMTU. A linha vermelha apresenta o controle (AIPcCl (20 µg/mL) e CMH (400µM)) feito no dia do experimento para determinação da concentração de DMTU.

Abaixo são apresentados os dados anotados em ata, bem como valores estatísticos simples.

| Data       | Amplitude | Q    | Amplitude Normalizada | [CM]  |
|------------|-----------|------|-----------------------|-------|
| 11/02/2020 | 19,37     | 7600 | 20,39                 | 59,00 |
| 13/11/2019 | 17,7      | 8100 | 17,48                 | 50,45 |
| 13/11/2019 | 14,6      | 7000 | 16,69                 | 48,11 |

Tabela 9 – Replicatas com a DMTU (30mM)

|           |       |
|-----------|-------|
| $\bar{x}$ | 11,05 |
| dp(x)     | 2,12  |
| var(x)    | 4,51  |

Tabela 10 – Dados estatísticos - DMTU (30mM)

### 3.1.8 Oxigênio Singlete

Com o objetivo de eliminar a contribuição do oxigênio singlete ( $O_2^-$ ), foram adicionados à solução padrão (AIPcCl ( $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), água e CMH ( $400 \mu\text{M}$ )), inicialmente, azida sódica e, posteriormente, DABCO. Mesmo utilizando-se dois sequestradores para o oxigênio singlete, não houve alteração dos sinais na RPE.

#### 3.1.8.1 Azida Sódica

Foram realizados ensaios com azidas sódicas de dois laboratórios distintos e em ambas os resultados foram análogos (Figura 21). Não ocorreu mudança na  $[\text{CM}\bullet]$  no sistema (comparando com o controle do dia). Este fato gerou hipóteses novas a serem testadas dentro deste trabalho.

Com a possibilidade da azida sódica estar inutilizável (validade, condições não ideais de armazenamento, entre outras), foi utilizado outro sequestrador conhecido do oxigênio singlete, o DABCO, novo, adquirido pela Sigma-Aldrich.

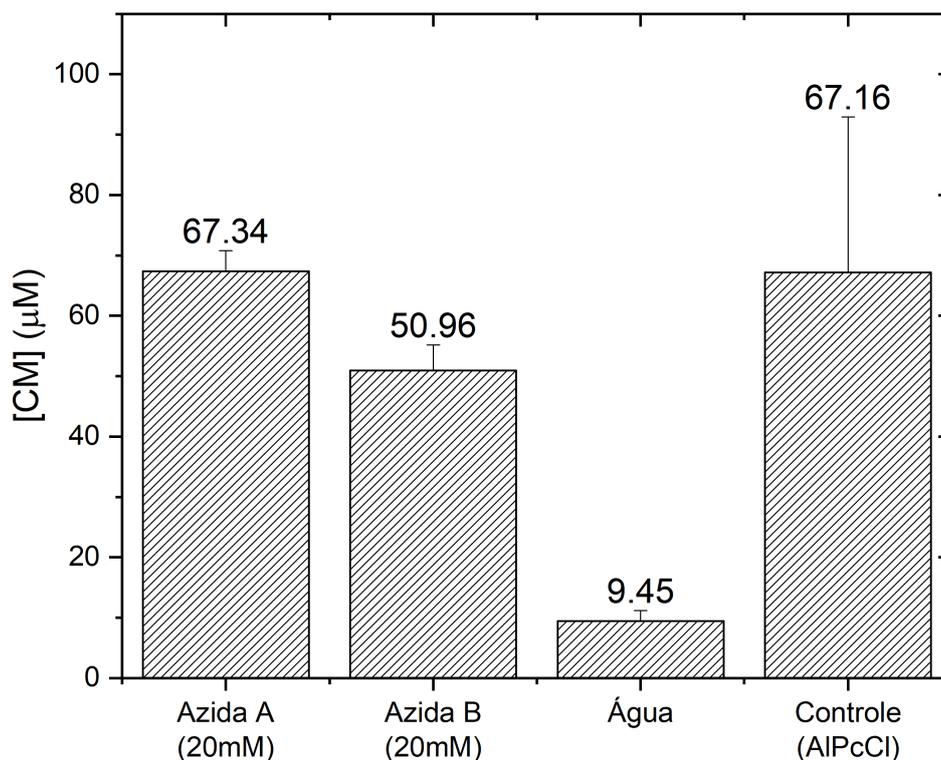


Figura 21 –  $[\text{CM}\bullet]$  com azida sódica (amostra A). A variação aqui não foi significativa o suficiente para garantir a eficácia da azida sódica.

Outra possibilidade era o sistema não estar produzindo o oxigênio singlete. Para avaliar esta possibilidade, foi utilizado um marcador específico para o oxigênio singlete, o TEMP.

Por fim, existia ainda a hipótese de que o marcador de *spin* estivesse inibindo (interagindo) o FS. Aqui, foi realizado um experimento específico para avaliar a interação dos marcadores de *spin* com a ALPcCl no estado excitado, a espectroscopia de fluorescência.

Abaixo são apresentados os dados anotados em ata, bem como valores estatísticos simples.

| Data      | Amplitude | Q    | Amplitude Normalizada | [CM]  |
|-----------|-----------|------|-----------------------|-------|
| 5/11/2019 | 22,55     | 7500 | 24,05                 | 69,77 |
| 5/11/2019 | 20,72     | 7400 | 22,40                 | 64,91 |
| 7/11/2019 | 17,5      | 7500 | 18,67                 | 53,93 |

Tabela 11 – Replicatas com a Azida (20mM)

|           |       |
|-----------|-------|
| $\bar{x}$ | 62,87 |
| dp(x)     | 8,12  |
| var(x)    | 65,87 |

Tabela 12 – Dados estatísticos - Azida (20mM)

### 3.1.8.2 DABCO

O DABCO foi utilizado em substituição à azida, porém atuando da mesma forma no sistema. Entretanto, diferente da azida, o DABCO produziu um sinal inesperado maior do que o controle (linha vermelha, amostra com ftalocianina e CMH realizada no dia deste experimento), conforme apresentado na Figura 22. Este resultado indica uma possível interação do DABCO com o marcador de *spin* CMH e, com isto, não possibilita a utilização deste sequestrador para eliminação do oxigênio singlete, pois mesmo que esteja cumprindo tal função, também está reagindo com o marcador e gerando um sinal falso positivo.

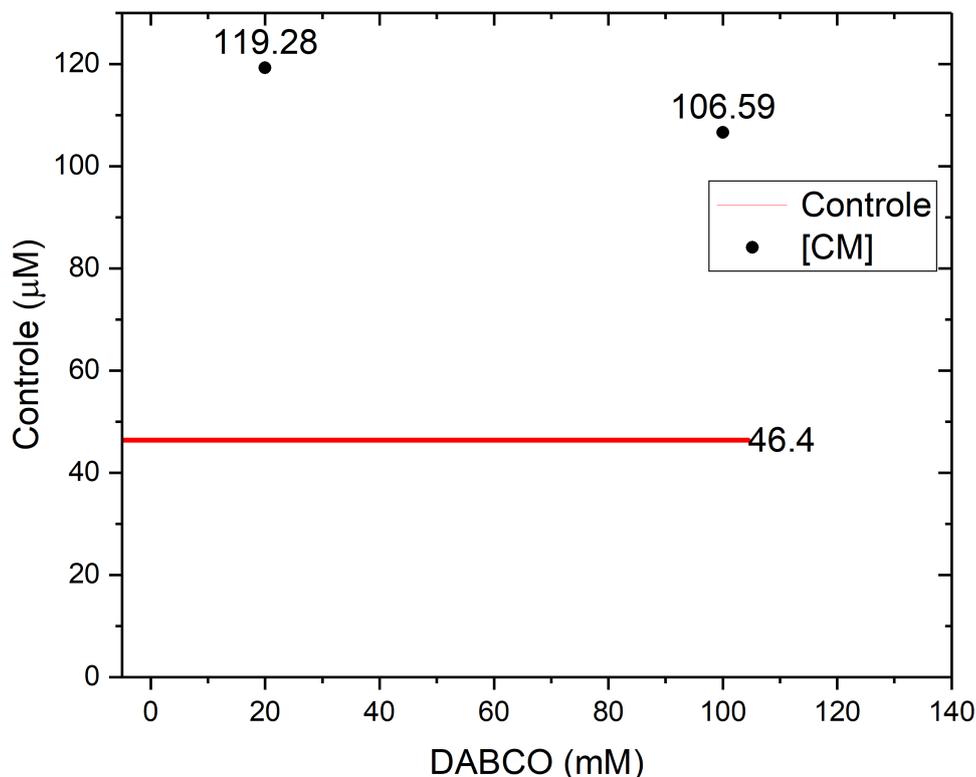


Figura 22 –  $[CM\bullet]$  com DABCO. A linha vermelha apresenta o controle (AlPcCl ( $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e CMH ( $400\ \mu\text{M}$ )) feito no dia do experimento para determinação da concentração de DABCO. Como os resultados foram muito mais altos que o controle, o DABCO foi descartado para determinação das ERO, já que torna o sistema imprevisível.

### 3.1.9 Análise Estatística

A Figura 23 apresenta os resultados finais. É possível observar que a presença de SOD e Catalase no sistema tem um efeito significativo na concentração de CM, mas o efeito do DMTU não fica claro.

Faz-se necessária a utilização de análise estatística dos dados, comparando cada grupo de sequestradores com o valor de  $[CM\bullet]$  da amostra controle. Isto é realizado por um Teste T de Student, comparando-se os grupos *versus* o controle. Por terem tamanhos e variâncias diferentes, utiliza-se uma adaptação do Teste T de Student, o Teste T de Welch. Foram encontrados os seguintes valores de p:

| Amostra                      | Valor P               |
|------------------------------|-----------------------|
| SOD                          | $1,85 \times 10^{-7}$ |
| Catalase                     | 0                     |
| DMTU                         | $1,19 \times 10^{-1}$ |
| SOD, Catalase e DMTU (Todos) | 0                     |
| Azida                        | $2,35 \times 10^{-1}$ |

Tabela 13 – Valores P. Estes valores foram encontrados realizando o Teste T de Welch para cada amostra comparando-as ao controle. Para valores menores que 0,05, o teste mostra que os grupos de medidas são estatisticamente distintos.

Para analisar estes resultados, foram realizadas comparações com um valor de referência (valor  $P=0,05$ ). Caso o valor P encontrado seja maior que o valor de referência, significa que não existe distinção entre os grupos. Isso resulta em dados estatisticamente irrelevantes. Para valores menores que o valor de referência, temos grupos distintos e, conseqüentemente, valores estatisticamente significativos. Logo, pela Tabela 13, fica claro que a utilização de SOD e de Catalase geram um efeito estatisticamente relevante no sistema (os dois juntos também, por óbvio) e que tanto a Azida Sódica quanto o DMTU não apresentam diferenças significativas em relação ao controle. A amostra marcada como Todos, é a medida com SOD, Catalase e DMTU. Não foi adicionada a Azida pelos motivos já elencados.

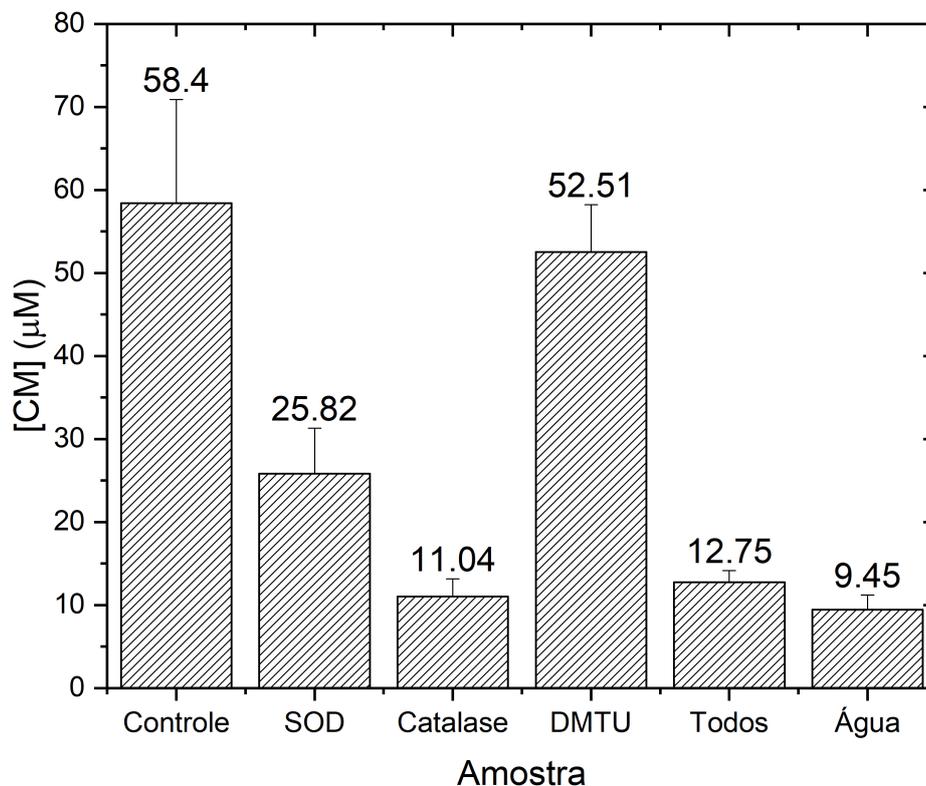


Figura 23 – [CM•] com SOD, catalase, DMTU e os três sequestradores juntos (todos). Os valores encontrados para a catalase. Todos e água podem ser distinguidos entre si, de maneira estatística, usando o teste ANOVA.

A Figura 23 apresenta os resultados finais do RPE. Nela vemos que o sinal de água, todos os sequestradores do gráfico e a catalase são extremamente próximos. O processo de reações do tipo I são cascadeados, ou seja, o superóxido gera peróxido que, eventualmente, gera a hidroxila. A SOD ataca diretamente o superóxido, diminuindo conseqüentemente a produção de outras espécies. A catalase foi o resultado destoante da teoria. Era esperado que seu valor diminuísse sem, entretanto, chegar tão próximo do mínimo (apenas água), o que dificultou a interpretação dos dados.

Abaixo são apresentados os dados anotados em ata para a solução com os três sequestradores (SOD, Catalase e DMTU), bem como valores estatísticos simples.

| Data       | Amplitude | Q    | Amplitude Normalizada | [CM]  |
|------------|-----------|------|-----------------------|-------|
| 11/02/2020 | 4,1       | 7500 | 4,37                  | 11,89 |
| 11/02/2020 | 3,93      | 7500 | 4,19                  | 11,36 |
| 6/12/2019  | 4,9       | 7500 | 5,23                  | 14,40 |
| 6/12/2019  | 4,57      | 7500 | 4,87                  | 13,37 |

Tabela 14 – Replicatas com SOD, Catalase e DMTU

|           |       |
|-----------|-------|
| $\bar{x}$ | 12,75 |
| $dp(x)$   | 1,39  |
| $var(x)$  | 1,93  |

Tabela 15 – Dados estatísticos - SOD, Catalase e DMTU

## 3.2 Fluorescência

Os resultados da fluorimetria estão apresentados nas figuras a seguir. Na Figura 24, é possível observar que a presença do CMH interfere diretamente com a emissão da AIPcCl. O CMH inibe completamente a emissão da AIPcCl, ou seja, ocorreu um decaimento não radioativo (Figura 12), e possivelmente ocorre uma inibição nas reações de tipo II, impedindo a produção de oxigênio singlete.

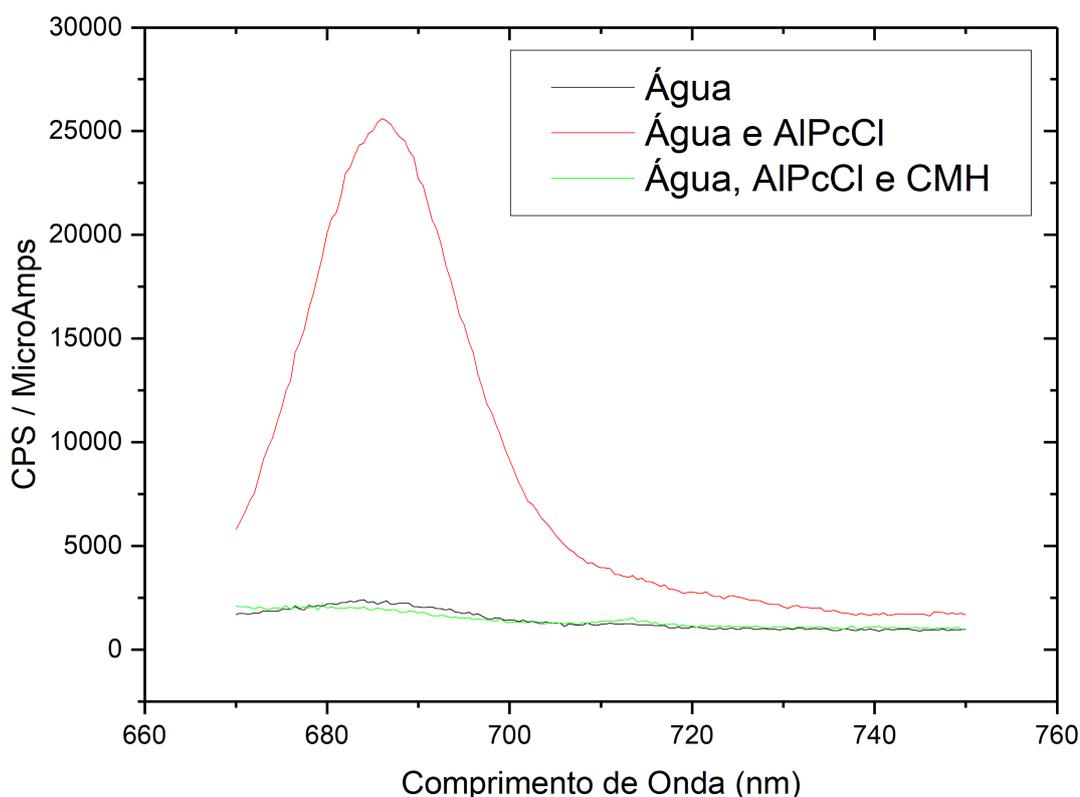


Figura 24 – Emissão da AIPcCl (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) **a)** Livre; **b)** com CMH (400 $\mu\text{M}$ ); e **c)** Solvente.

Na Figura 25 é possível ver o efeito contrário. Com a presença do marcador TEMP, a curva de emissão da AIPcCl (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tem um leve deslocamento do pico de intensidade, mas continua fluorescendo, indicando que o TEMP não está impedindo o decaimento radioativo da AIPcCl. Com isso, a energia absorvida pela AIPcCl continua disponível para a produção de ERO.

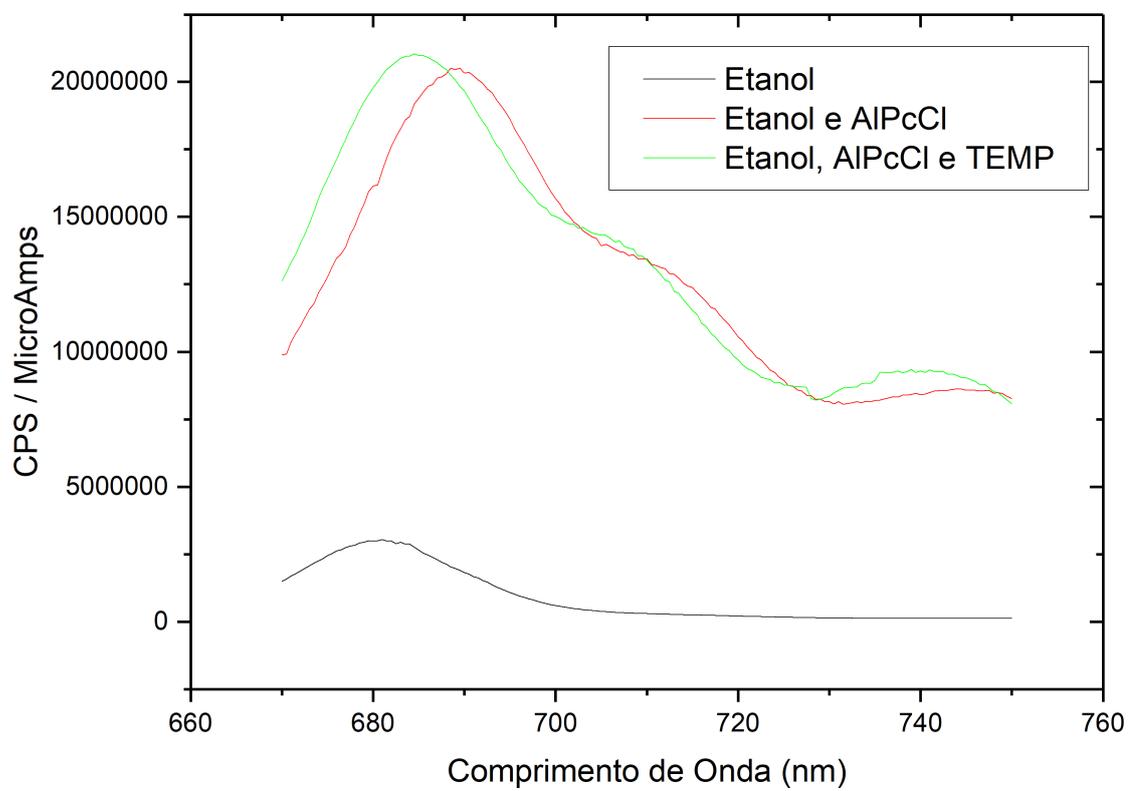


Figura 25 – Emissão da ALPcCl (20 µg/mL) a) Livre; b) com TEMP (100µM); e c) Solvente.

### 3.3 UV-Vis

Pelos resultados apresentados na fluorescência, foi necessário confirmar ou rejeitar a hipótese de supressão da excitação da AlPcCl pelo CMH. Na Figura 26 fica evidente que a presença do CMH junto da AlPcCl está suprimindo a produção de oxigênio singleto, uma vez que a absorbância não apresentou a mesma queda sem o CMH, indicando uma maior quantidade de DBF na amostra. A primeira e a terceira barras, onde tem-se AlPcCl não irradiada, estão estatisticamente iguais (como visto na Tabela 19). Ao iluminar essas amostras com AlPcCl, vê-se a produção de oxigênio singleto, pois a absorbância da amostra diminui, ou seja, o DBF está sendo eliminado. Ao se colocar o CMH, a diferença fica menor, indicando que o CMH interfere na produção de oxigênio singleto.

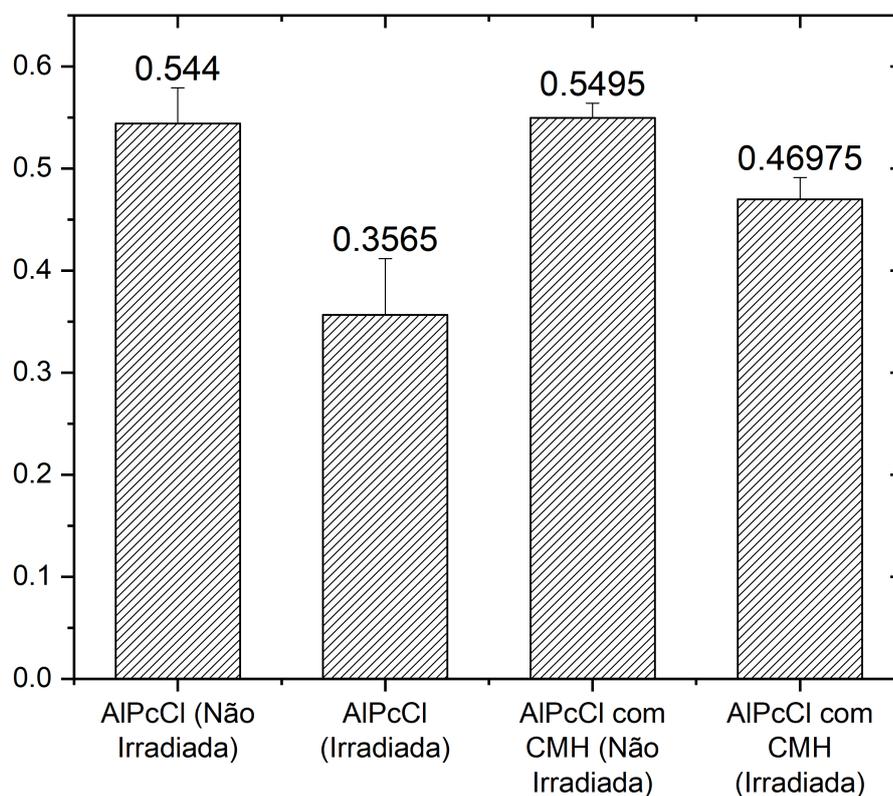


Figura 26 – UV-Vis da AlPcCl com DBF. Pela sensibilidade da técnica é possível observar que o CMH diminui a produção de oxigênio singleto.

### 3.3.1 Resultados ANOVA

Todos os resultados abaixo foram obtidos utilizando-se a Análise de Variância, mediante o uso do *software OriginPro2017*.

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| AlPcCl (Não Irradiada)         | A |
| AlPcCl (Irradiada)             | B |
| AlPcCl com CMH (Não Irradiada) | C |
| AlPcCl com CMH (Irradiada)     | D |

Tabela 16 – Representação das amostras no ANOVA

|   | N Analysis | N Missing | Mean    | Standard Deviation | SE of Mean |
|---|------------|-----------|---------|--------------------|------------|
| A | 4          | 0         | 0.544   | 0.0348             | 0.0174     |
| B | 4          | 0         | 0.3565  | 0.0552             | 0.0276     |
| C | 4          | 0         | 0.5495  | 0.01436            | 0.00718    |
| D | 4          | 0         | 0.46975 | 0.02148            | 0.01074    |

Tabela 17 – Estatística Descritiva

|       | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value  | Prob>F   |
|-------|----|----------------|-------------|----------|----------|
| Model | 3  | 0.09713        | 0.03238     | 26.29023 | 1.46E-05 |
| Error | 12 | 0.01478        | 0.00123     |          |          |
| Total | 15 | 0.11191        |             |          |          |

Tabela 18 – Resultado Geral ANOVA

|     | MeanDiff | SEM     | q Value  | Prob     | Alpha | Sig | LCL      | UCL       |
|-----|----------|---------|----------|----------|-------|-----|----------|-----------|
| B A | -0.1875  | 0.02481 | 10.6857  | 3.46E-05 | 0.05  | 1   | -0.26117 | -0.11383  |
| C A | 0.0055   | 0.02481 | 0.31345  | 0.99594  | 0.05  | 0   | -0.06817 | 0.07917   |
| C B | 0.193    | 0.02481 | 10.99915 | 2.59E-05 | 0.05  | 1   | 0.11933  | 0.26667   |
| D A | -0.07425 | 0.02481 | 4.23154  | 0.04803  | 0.05  | 1   | -0.14792 | -5.77E-04 |
| D B | 0.11325  | 0.02481 | 6.45416  | 0.00314  | 0.05  | 1   | 0.03958  | 0.18692   |
| D C | -0.07975 | 0.02481 | 4.54499  | 0.03267  | 0.05  | 1   | -0.15342 | -0.00608  |

Tabela 19 – Teste de Turkey. Sig = 1 indica diferença significativa.

## 4 Discussão

As curvas de calibração relativas à fluência de energia luminosa e determinação da concentração de AlPcCl coincidiram com o que seria esperado teoricamente: existe uma saturação na produção de ERO tanto para grandes fluências luminosas, quanto para grandes concentrações de AlPcCl. Porém, para ambos os parâmetros, existe uma condição (linear) onde é possível haver um maior controle da produção de ERO.

Ocorreu, porém, um resultado inesperado, que foi a produção de ERO para a luz ambiente. Esperava-se que, com a exposição da AlPcCl, houvesse produção, mas que não seria tão acentuada. Mesmo com a produção sendo alta ao longo do tempo, é importante salientar que, após sua marcação, o CM● dura, em média, 4h. Logo, é impossível utilizar apenas a luz ambiente para TFD, pois não é possível determinar se esta produção é adequada para tratamento de cânceres.

Outro ponto importante é garantir a constância da fonte luminosa e rápida produção de ERO num período de tempo curto, gerando a apoptose. Para a fluência de energia luminosa, vê-se que não existe a necessidade de aumentá-la a valores maiores que  $131mW/cm^2$ , pois este é o valor da saturação. O mesmo pode ser observado na curva da concentração de AlPcCl, que apresenta dois momentos de maneira clara. O primeiro, com comportamento linear e o segundo, onde ocorre a saturação. Ambos os resultados eram esperados.

Para os sequestradores de ERO, as escolhas de suas concentrações no experimento foram estabelecidas com base em valores da literatura. Com o intuito de confirmar estes valores, foram realizados testes com concentrações maiores e menores. A SOD e a Catalase não apresentaram mudanças significativas para valores maiores de concentração, demonstrando que existia uma saturação a partir de 300 U (valor indicado na literatura) para ambas, como se pode comprovar pelas Figuras 18 e 19.

Foram feitos dois testes de concentração do DMTU, em ordens de grandeza distintas (variando 3 ordens de grandeza entre uma medida e outra). Para a concentração menor, de  $30\mu M$ , não houve alteração na quantidade de ERO (especificamente a hidroxila) produzida no sistema. Com  $30mM$ , a diferença foi notável e dentro do esperado para a produção de hidroxila.

Todos os testes para detectar o oxigênio singlete, usando as azidas sódicas e o DABCO, tiveram resultados negativos, ou seja, não apresentaram mudança no sinal de RPE. A utilização de azida sódica não apresentou alteração, quando comparada ao controle (AlPcCl com CMH). As medidas para o DABCO tiveram seus valores de ERO maiores do que a amostra controle, o que pode ser explicado por uma possível interação

do CMH com o DABCO ou pela contaminação do sequestrador. Como ambos os casos não podem ser controlados, optou-se pela não utilização do DABCO. Com isso, nenhum marcador específico do oxigênio singlete foi utilizado novamente. Isto levou à busca de outros experimentos para avaliar a produção do singlete.

Depois de avaliar os parâmetros ideais de concentração de AIPcCl e dos sequestradores, todos os experimentos foram repetidos para demonstração estatística dos resultados, bem como sua validação. Os valores destes testes estão apresentados na Tabela 13, os quais desqualificam os dados do DMTU e da azida (mesmo não sendo utilizada, existiam valores suficientes para executar os testes). Além disto, ficaram validados os dados referentes a SOD, a Catalase e ao conjunto de Todos (SOD, Catalase e DMTU). A Figura 23 apresenta os dados médios e seus erros.

Para analisar o resultado da SOD é importante observar a velocidade de reação da enzima,  $k_{SOD} \approx 10^9 M^{-1} s^{-1}$  (GRAY; CARMICHAEL, 1992), e do CMH,  $k_{CMH} \approx 10^4 M^{-1} s^{-1}$  (DIKALOV et al., 2011), com o superóxido. A taxa de reação do CMH é muito menor do que a da SOD, o que garante que o processo de destruição do superóxido ocorre antes da marcação do CMH. O sinal teve uma queda de 56%, mostrando a importância do superóxido, mas não sendo o resultado único necessário para quantificar sua produção. Já que o decaimento deste íon gera a formação de peróxido e hidroxila, é necessário calcular a produção destes para quantificar quanto de cada ERO é gerada no sistema.

A concentração de  $[CM\bullet]$  com a utilização de catalase foi o resultado mais interessante deste conjunto de medidas. A  $[CM\bullet]$  neste experimento é menor que o sistema com todos os sequestradores e bem próximo ao sinal mínimo do equipamento (medida com água e CMH, apenas). Porém, não se pode concluir muito além disto, uma vez que o sinal está muito próximo ao mínimo detectado no equipamento.

Além destas medidas, foram realizadas diversas outras com TEMP, um marcador específico de oxigênio singlete. Os resultados destas medidas foram destacados no Apêndice A, dado que não mostraram diferença significativa. Para diluir o TEMP, utilizou-se etanol e água, como citado no capítulo 2, diferente da literatura (que sugere a diluição apenas com etanol). Enfatizando, uma solução com etanol sem água não congelaria e seria impossível de injetar no *Finger Dewer*. Acredita-se que, pelo sinal do RPE onde não houve alteração de sua intensidade para nenhum sequestrador, o TEMP foi contaminado. Ou seja, foi marcado de maneira inesperada, com oxigênio presente no sistema sem aplicação de TFD.

Como não foram encontradas evidências de oxigênio singlete no sistema, foram buscadas outras formas de determinar sua produção. Como apresentado na Figura 4, a AIPcCl fluoresce quando excitada. Desta forma, a técnica escolhida para avaliar se estava havendo as reações do Tipo II foi a fluorimetria. Foram realizados dois testes distintos, um com TEMP (diluída apenas em etanol, visto que não havia necessidade de congelamento da solução) e um com CMH.

Na Figura 25 nota-se que não há alteração da fluorescência com TEMP e AlPcCl, apenas um leve deslocamento da curva. Isto indica que está acontecendo a produção do oxigênio singleto neste sistema e, por óbvio, que a metodologia adotada de preparação da TEMP para utilização na RPE, estava contaminando-a (hipótese essa levantada para explicar a não detecção de ERO com TEMP na RPE). Porém, a medida com CMH, Figura 24, mostra que o CMH de fato está interferindo com a AlPcCl e sua excitação. É possível observar isso pois, ao se adicionar o CMH na solução, a emissão da AlPcCl fica idêntica ao solvente puro, ou seja, não há emissão. Uma outra possível hipótese que justifica tal fenômeno é a agregação das partículas de AlPcCl (dado as escalas dos eixos y nas Figuras 24 e 25).

Neste sistema, com CMH, ocorre uma supressão do estado excitado da AlPcCl, muito provavelmente dificultando ou até mesmo inibindo a produção de oxigênio singleto. Este resultado, por si só, levaria diretamente à conclusão deste trabalho, mas optou-se por uma validação por outro método, para garantir que um resultado desta magnitude estaria correto.

O último método de determinação de produção de oxigênio singleto foi o UV-Vis, que mede a produção diretamente. Como observado na Figura 26, ao colocar o CMH no sistema, há uma queda brusca da fluorescência do DBF, por consequência, da produção de oxigênio singleto.

Ao buscar uma razão para a interferência do CMH com a AlPcCl, foi encontrado na literatura uma possível explicação para o conjunto de resultados explanados até aqui. Como apresentado por Daraio et al. (1998), Zhang, Xu e Chen (1994), existe a produção de superóxido (e derivados) para a ftalocianina de zinco (ZnPc) excitada no estado singleto. Pela semelhança da molécula de ZnPc com a AlPcCl, este efeito provavelmente deve ocorrer com a AlPcCl também. Este resultado coincide com os resultados da fluorimetria, mostrando que não ocorre o *Intersystem Crossing*, ou seja, não acontecem reações do tipo I e II na forma apresentada pela Figura 4. Ainda, isto elucida parte dos resultados de sequestradores específicos de oxigênio singleto.

## 5 Conclusão e Perspectiva

Mesmo sendo um método já conhecido, porém pouco utilizado, a TFD continua sendo extremamente promissora. A utilização correta do FS é o diferencial para o sucesso do tratamento, visto que, com determinados químicos no sistema, ocorre supressão na excitação do FS e, por consequência, na produção de ERO. Esta pesquisa trouxe informações relevantes neste sentido, especialmente, sobre a determinação de ERO produzidas pela AIPcCl.

### 5.1 Conclusão

Conclui-se então que a determinação das ERO produzidas podem ser parcialmente detectadas pela utilização do CMH. Superóxidos, e a molécula que é reduzida a partir dele, o peróxido de hidrogênio, são extremamente importantes para diversos tipos de TFD, e podem ser determinados com a utilização deste marcador. Não foi possível identificar a hidroxila, por esta apresentar um sinal extremamente próximo ao controle. Isto impossibilitou a diferenciação estatística desta ERO.

Por fim, é impossível determinar a produção de oxigênio singlete, principal ERO estudado neste trabalho. A presença do CMH inibe a produção do singlete. Com isto, conclui-se que a utilização do CMH para medir as ERO produzidas pela AIPcCl não é interessante e um outro marcador deve ser utilizado.

### 5.2 Perspectivas

Deste trabalho de pesquisa surgiram alguns questionamentos, que podem originar trabalhos bem interessantes e de grande relevância. Um deles é a existência da interação da catalase, impedindo o decaimento de superóxido para peróxido de hidrogênio (processo que marca o CMH). O outro é a remarcação do  $CM\bullet$ , ou seja, sua transformação em CMH. A terceira e última é se o CMH facilita a agregação da AIPcCl, afetando sua eficiência na produção de ERO. Por uma questão de tempo, não foi possível avaliar tão detalhadamente o sistema, mas essas hipóteses foram levantadas como possíveis causas para as concentrações encontradas.

## Referências

- AAPM. *Photodynamic therapy dosimetry, AAPM REPORT NO. 88*. [S.l.]: Medical Physics Publishing, 2005. Citado 4 vezes nas páginas 25, 26, 27 e 28.
- ABDEL-KADER, M. H. *Photodynamic therapy*. 1. ed. [S.l.]: Springer, 2014. 4 p. Citado na página 17.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd., v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 19.
- ACS. American Cancer Society, 2020. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/immunotherapy.html>>. Citado na página 16.
- AIYEGORO, O. A.; OKOH, A. I. Phytochemical screening and polyphenolic antioxidant activity of aqueous crude leaf extract of helichrysum pedunculatum. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 11, p. 4990–5001, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 18.
- ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical pdt. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 1, p. 27–42, 2004. Citado na página 17.
- BANK, W. *World Bank*. 2019. Disponível em: <<https://data.worldbank.org/>>. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 15.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, 2010. Citado na página 18.
- BERG, K. et al. A high precision method for quantitative measurements of reactive oxygen species in frozen biopsies. *PloS one*, Public Library of Science, v. 9, n. 3, 2014. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 25.
- BIANCHI, M. d. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*, v. 12, n. 2, p. 123–30, 1999. Citado na página 18.
- BOWN, S. G. Photodynamic therapy for photochemists. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 371, n. 1995, p. 20120371–20120371, 2013. Citado na página 17.
- DARAIIO, M. E. et al. Tryptophan quenching of zinc-phthalocyanine and porphycene fluorescence in micellar ctac. *Photochemistry and photobiology*, Wiley Online Library, v. 67, n. 4, p. 371–377, 1998. Citado na página 63.
- DIKALOV, S. I. et al. Epr detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines. *Free radical research*, Taylor & Francis, v. 45, n. 4, p. 417–430, 2011. Citado na página 62.

GRAY, B.; CARMICHAEL, A. Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. *Biochemical Journal*, Portland Press Ltd., v. 281, n. 3, p. 795–802, 1992. Citado na página 62.

HERMAN, B. et al. *Basic Concepts in Fluorescence*. 2020. Disponível em: <<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro/>>. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 36.

IBGE. 2020. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>>. Citado na página 15.

INCA. *Perguntas Frequentes: Câncer*. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/perguntas-frequentes/cancer>>. Citado na página 16.

INCA. 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-causa-cancer>>. Citado na página 16.

ISLER, E. et al. Trapeamento de InAPL observado por meio da técnica de fluorescência induzida por laser (lif). *Águas Subterrâneas*, v. 32, n. 3, p. 315–324, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 9 e 35.

JURCZYSZYN, K. et al. Potentiality of photodynamic therapy in dentistry ? literature review. *Dental and Medical Problems*, v. 44, n. 2, p. 255–258, 2007. Citado na página 17.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, v. 4, n. 8, p. 118, 2010. Citado na página 18.

MITTON, D.; ACKROYD, R. History of photodynamic therapy in great britain. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, n. 4, p. 239–246, 2005. Citado na página 17.

MONGE-FUENTES, V. et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*euterpe oleracea martius*) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 166, p. 301–310, 2017. Citado na página 26.

MORGADO, L. F. et al. Photodynamic therapy treatment of onychomycosis with aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions: A proof of concept clinical trial. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 173, p. 266–270, 2017. Citado na página 26.

MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma mcf-7 cells. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 13, n. 1, 2015. Citado na página 26.

ONISZCZUK, A. et al. The potential of photodynamic therapy (pdt)?experimental investigations and clinical use. *Biomedicine And Pharmacotherapy*, v. 83, p. 912–929, 2016. Citado na página 17.

PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C.; GRAFF, R. In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. *Photochemistry and photobiology*, Wiley Online Library, v. 51, n. 3, p. 343–349, 1990. Citado na página 27.

PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers in medical science*, Springer, v. 24, n. 2, p. 259–268, 2009. Citado na página 19.

PY-DANIEL, K. R. et al. Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 103, p. 23–31, 2016. Citado na página 26.

QUIRK, B. J. et al. Photodynamic therapy (pdt) for malignant brain tumors ? where do we stand? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 12, n. 3, p. 530–544, 2015. Citado na página 17.

REDDY, R. et al. Photodynamic therapy in oral diseases. v. 3, p. 1875–1883, 01 2012. Citado na página 17.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (pdt): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for pdt. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009. Citado na página 19.

SAKAMOTO, K.; OHNO-OKUMURA, E. Syntheses and functional properties of phthalocyanines. *Materials*, Molecular Diversity Preservation International, v. 2, n. 3, p. 1127–1179, 2009. Citado na página 18.

SAÚDE, M. d. *Câncer de pele: sintomas, como identificar e qual o tratamento*. 2019. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/cancer-de-pele>>. Citado na página 16.

SBD. 2017. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/procedimentos/criocirurgia/23/>>. Citado na página 16.

SCHEINOK, S. et al. Comparison of different methods for measuring the superoxide radical by epr spectroscopy in buffer, cell lysates and cells. *Free radical research*, Taylor & Francis, v. 52, n. 10, p. 1182–1196, 2018. Citado 2 vezes nas páginas 46 e 47.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1763, n. 12, p. 1755–1766, 2006. Citado na página 17.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007. Citado na página 18.

WANG, H. et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *The lancet*, Elsevier, v. 388, n. 10053, p. 1459–1544, 2016. Citado na página 15.

WEBER, R. *XENON USER'S GUIDE*. 1.3. ed. [S.l.]: Bruker BioSpin Corporation, 2011. Citado 5 vezes nas páginas 9, 29, 31, 32 e 33.

WHO. *Cancer*. 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Citado na página 16.

WHO. *THE GLOBAL HEALTH OBSERVATORY*. 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho>>. Citado na página 16.

YANO, S. et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, Elsevier, v. 12, n. 1, p. 46–67, 2011. Citado na página 19.

ZHANG, X.-F.; XU, H.-J.; CHEN, D.-W. Substituted phthalocyanine-sensitized photochemical generation of superoxide anion radical. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier, v. 22, n. 3, p. 235–239, 1994. Citado na página 63.

# Apêndices

# APÊNDICE A – TEMP

O TEMP é conhecido por ser um sequestrador seletivo de oxigênio singlete. Como foi falado no capítulo 2, as medidas com o TEMP se originaram da dúvida de se existia ou não produção de oxigênio singlete no sistema. Diferentemente das medidas com o CMH, nesta etapa do experimento as concentrações de AlPcCl e fluência de energia luminosa já estavam definidas.

É importante ressaltar que não foi realizada uma curva de calibração com o TEMPO (semelhante ao CMH), então os dados apresentados estão com a amplitude corrigida com o Q apenas. Como os resultados não foram satisfatórios, não foram feitas triplicatas.

## A.1 Amplitude no RPE com TEMP

A Figura 27 apresenta as amplitudes obtidas utilizando o marcador TEMP. Diferente do CMH, todas as curvas neste estudo possuem basicamente a mesma amplitude, confirmando a não interação do TEMP com superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila.

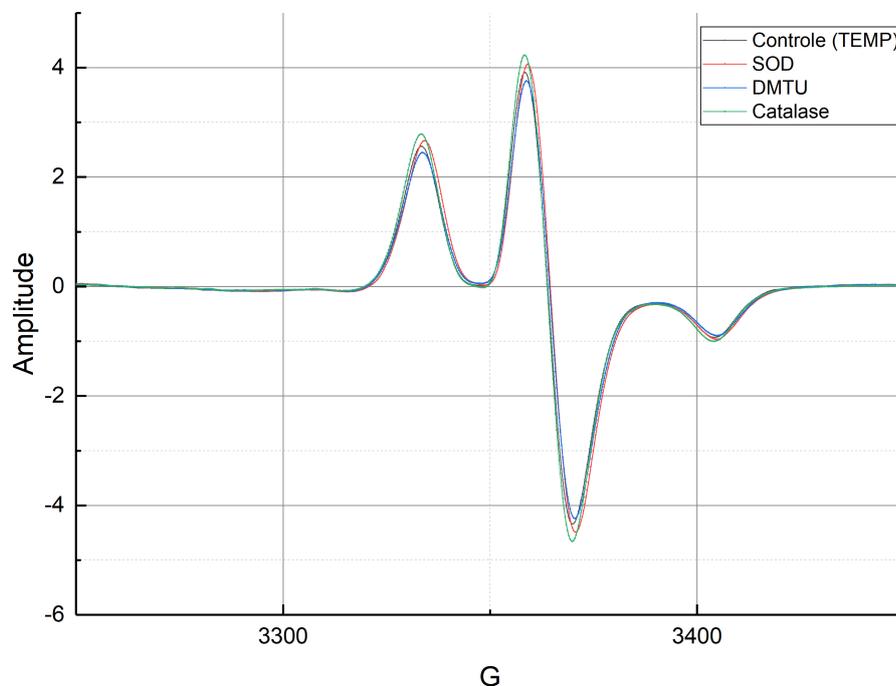
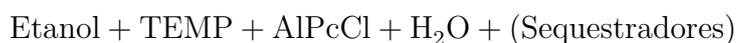


Figura 27 – Espectro do EPR para o TEMP

O TEMP não pode seguir o protocolo apresentado anteriormente (CMH), porque ele gera a precipitação da AlPcCl, caso não haja uma diluição em etanol previamente.

Utiliza-se 6,7  $\mu\text{L}$  de TEMP, em uma concentração de 100  $m\text{M}$ . Logo, para o TEMP, utiliza-se a seguinte equação:



Onde o controle é realizado sem a presença de sequestradores. Da mesma forma que a equação anterior, quando existe a presença de sequestradores, diminui-se a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}$  utilizada na diluição. Sempre é utilizada a mesma quantidade de Etanol na solução, 32  $\mu\text{L}$ .

## A.2 Luz Ambiente

A Figura 28 apresenta o resultado da exposição do TEMP à luz ambiente do laboratório. Fica explícito que o TEMP não interage com a luz do laboratório de maneira linear crescente.

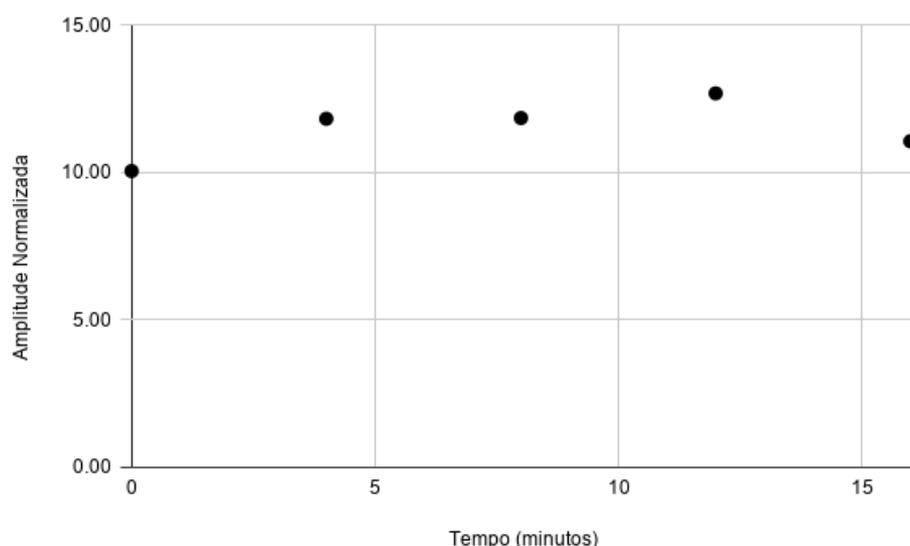


Figura 28 – Amplitude normalizada do TEMP vs exposição à luz ambiente

## A.3 Variação de Fluência Energética

Pelo resultado obtido neste estudo, foi levantada a hipótese de que o sistema não estivesse recebendo energia suficiente para a produção de oxigênio singlete. Para avaliar esta hipótese, a amostra foi colocada na potência máxima do equipamento (com a distância o mais próxima possível) com dois tempos diferentes (1 minuto e 4 minutos). Fica claro pela Figura 29 que o sistema estava recebendo energia suficiente, ou seja, o aumento da potência não aumenta a produção de oxigênio singlete.

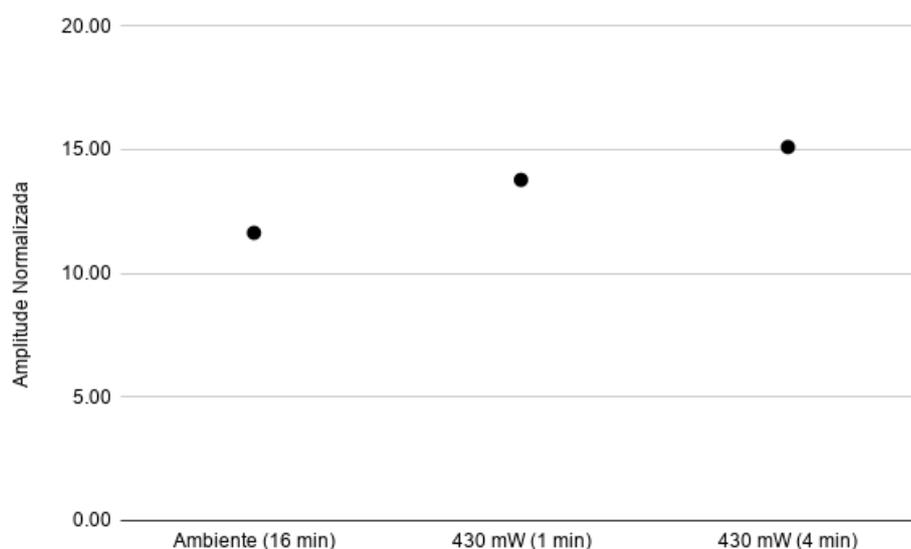


Figura 29 – Amplitude normalizada do TEMP vs potência máxima do *LED*

#### A.4 Azida

A medida com azida e TEMP também se mostrou insatisfatória. Não houve diferença na produção de oxigênio singleto com ou sem a presença da azida, como apresentado na Figura 30.

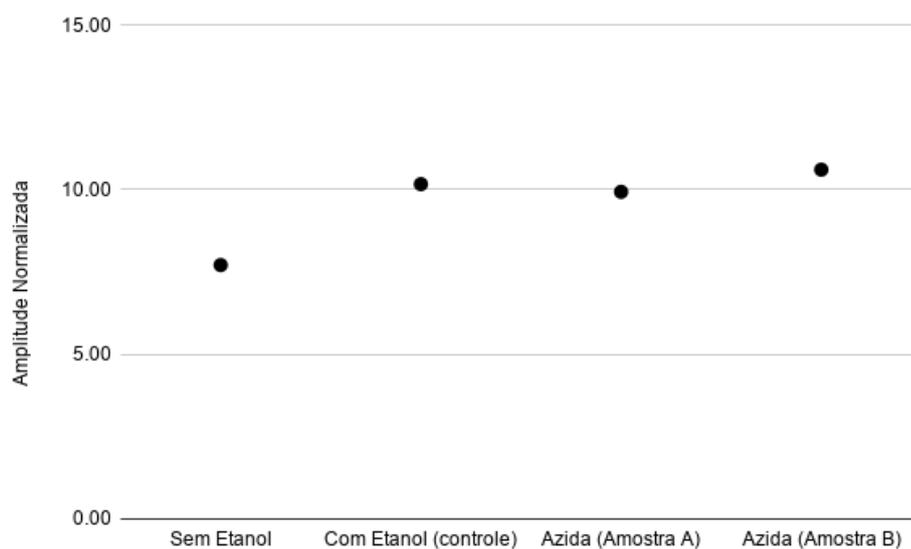


Figura 30 – Amplitude normalizada do TEMP com azida sódica

## A.5 DABCO

A Figura 31 apresenta a variação da amplitude com o DABCO. Novamente não é possível ver diferença na produção do oxigênio singlete.

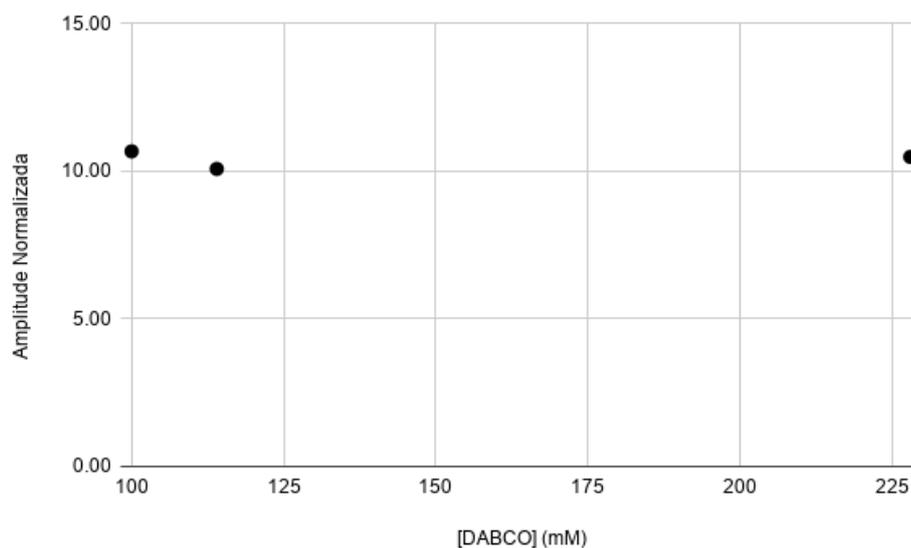


Figura 31 – Amplitude normalizada do TEMP com DABCO

## A.6 Outros Sequestradores

Mesmo não sendo comum a ligação do TEMP com outros ERO, que não o oxigênio singlete, foram realizados testes com os sequestradores das outras espécies reativas. Pelo demonstrado na Figura 32 fica nítido que o TEMP não se liga a outras ERO além do oxigênio singlete.

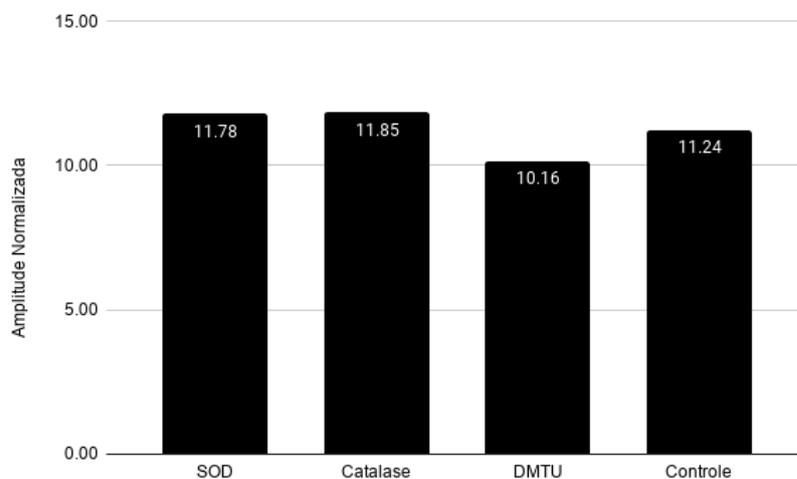


Figura 32 – Amplitude normalizada do TEMP com outros sequestradores

Como observado, não ocorreram diferenças estatisticamente relevantes. Por isto, estes resultados foram preteridos. Novas medidas com protocolos específicos de TEMP seriam interessantes para auxiliar em futuras medidas de quantificação.

## APÊNDICE B – Amplitude no espectro de RPE com CMH

A Figura 33 apresenta os espectros obtidos da RPE, sem tratamento estatístico, diretamente do equipamento. É possível observar que o padrão da curva se mantém o mesmo, porém tem sua amplitude reduzida com a adição dos sequestradores. Para calcular a amplitude, pega-se o valor entre a crista e o vale principal.

É importante observar que as curvas de Catalase e todos os sequestradores são bem próximas, quase idênticas em amplitude.

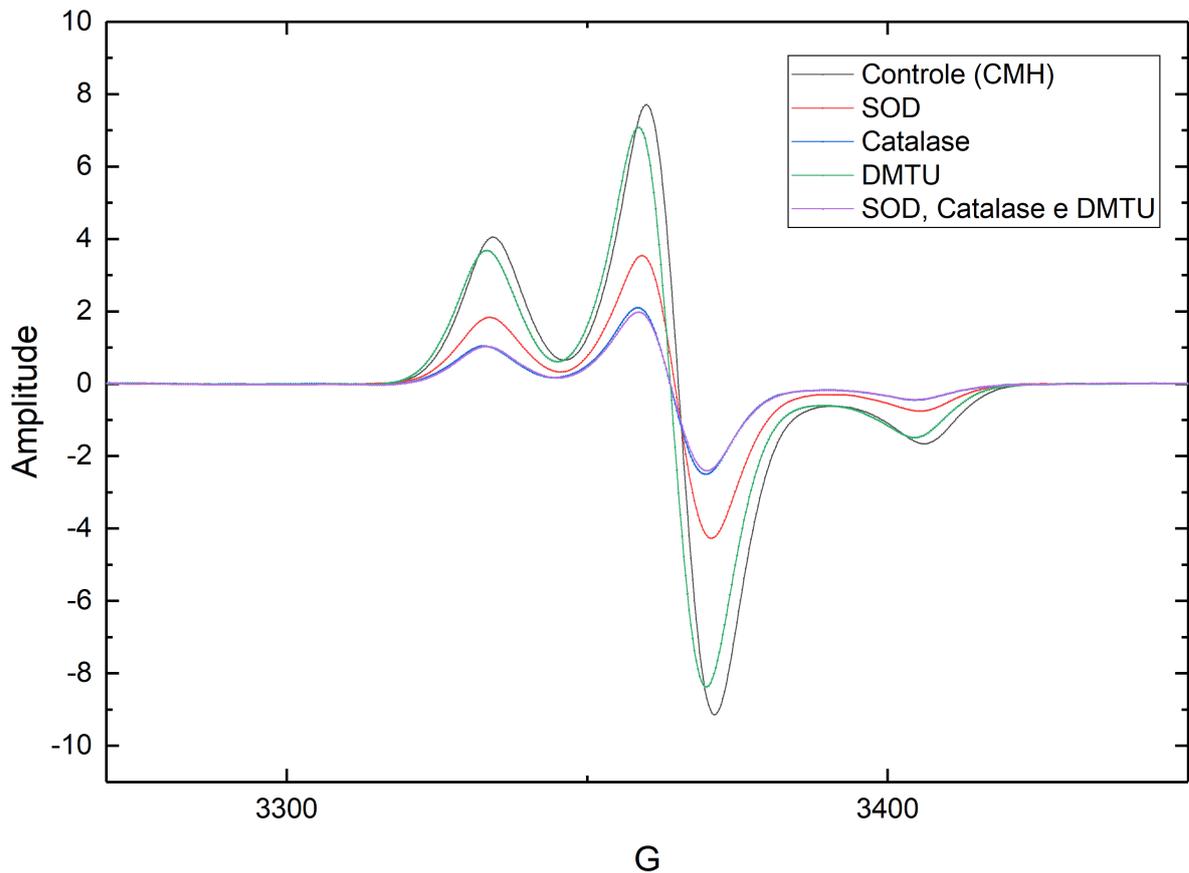


Figura 33 – Espectro da RPE para o CMH.