

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E MATERIAIS
AVANÇADOS

MÁRCIA ISABEL DE SOUZA PRADO

CONJUGADOS HÍBRIDOS DE L-DIFENILALANINA E
FOTOSENSIBILIZADORES

Santo André - SP

2016

Márcia Isabel de Souza Prado

CONJUGADOS HÍBRIDOS DE L-DIFENILALANINA E
FOTOSSENSIBILIZADORES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados da Universidade Federal do ABC como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Nanociências e Materiais Avançados. Linha de Pesquisa: Materiais Funcionais

Orientador: Prof. Dr. Wendel Andrade Alves

Co-orientador: Dr. Emerson Rodrigo da Silva

Santo André – SP

2016

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC

Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Prado, Márcia Isabel de Souza

Conjugados híbridos de L-difenilalanina e fotossensibilizadores / Márcia
Isabel de Souza Prado. — 2016.

102 fls. : il.

Orientador: Wendel Andrade Alves

Coorientador: Emerson Rodrigo da Silva

Tese (Doutorado) — Universidade Federal do ABC, Programa de Pós
Graduação em Nanociências e Materiais Avançados, Santo André, 2016.

1. nanotubos de peptídeos. 2. hipericina. 3. ftalocianina de zinco. 4.
terapia fotodinâmica. I. Alves, Wendel Andrade. II. Silva, Emerson Rodrigo
da. III. Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados,
2016. IV. Título.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

Santo André, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador: _____



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Fundação Universidade Federal do ABC

Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados

Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP

CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017

ppg.nanomat@ufabc.edu.br

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Márcia Isabel de Souza Prado, realizada em 30 de março de 2016:

Prof.(a) Dr.(a) **Wendel Andrade Alves** (UFABC) – Presidente

Prof.(a) Dr.(a) **Adalberto Fazzio** (UFABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Flavio Leandro de Souza** (UFABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Mauricio da Silva Baptista** (USP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Paula Silvia Haddad Ferreira** (UNIFESP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Ronei Miotto** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Tiago Rodrigues** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Ana Flávia Nogueira** (UNICAMP) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Amando Siuiti Ito** (USP) – Membro Suplente



Universidade Federal do ABC

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha filha Catarina.

Agradecimentos

À Deus pelo dom da vida.

Ao professor Wendel Andrade Alves, pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela amizade e orientação acadêmica.

Ao pós-doc Emerson Rodrigo da Silva pela amizade, pela co-orientação e pelas oportunidades de estudo que me proporcionou.

Ao professor Anderson Orzari Ribeiro e seu grupo de pesquisa pela colaboração com este trabalho, sintetizando os fotossensibilizadores utilizados.

À pós-doc Tatiana Pietro e ao professor Tiago Rodrigues pela colaboração nos ensaios celulares.

Aos professores Frank Herbert Quina e Maurício da Silva Baptista pela oportunidade de utilizar os equipamentos de seus respectivos laboratórios.

Ao Laboratório de Eletroquímica e Materiais Nanoestruturados (LEMN) a todos os professores e colegas de trabalho pela boa convivência durante o período de mestrado e doutorado e pela infraestrutura.

À Central Experimental Multiusuário (CEM) da UFABC pela infraestrutura e disponibilidade para utilizar os equipamentos.

Ao LNNano pela oportunidade de ser treinada para efetuar as imagens de MEV e pelas imagens de AFM.

Aos amigos do grupo (ordem alfabética): Bruna, Carla, Clovis, Emerson, Henrique, Irina, José, Juliana, Michelle, Roberta, Sergio, Sivoney, Thiago, Valéria.

À todos os amigos, por acreditarem em mim e sempre me dando apoio.

Aos irmãos da comunidade 5 pelas orações.

À minha família, pai, mãe, irmãos, cunhados e sobrinhos, que estão sempre torcendo por mim.

Ao meu marido Wellington Luis do Prado que mesmo não entendendo do que eu falo me ajuda com os ensaios para as apresentações.

À Capes, que financiou este trabalho.

Epígrafe

Oração do Anjo da Guarda

Santo anjo do senhor,
meu zeloso guardador
se a ti me confiou
a piedade divina,
sempre me rege, me guarde,
me governe, me ilumine
Amém.

Resumo

Estudou-se a conjugação de micro/nanotubos de L,L-difenilalanina (MNTs-FF) com dois tipos de fluoróforo: hipericina (Hyp) e ftalocianinas de zinco (ZnPc), visando aplicação na terapia fotodinâmica. Foram feitas investigações sobre conjugados contendo hipericina organizados em diferentes arranjos cristalinos, uma fase hexagonal ($P6_1$) e outra ortorrômbica ($P22_12_1$). Os resultados obtidos evidenciam uma maior eficiência na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando a hipericina está conjugada com MNTs-FF, sendo essa eficácia observada em ambas as fases, porém com melhor resultado para a fase hexagonal. Como mecanismo, foi proposto que a organização induzida pelas estruturas peptídicas e a disponibilidade de um ambiente hidrofóbico na interface de Hyp/peptídeo são fundamentais para incrementar a geração de ROS. Para os conjugados MNTs-FF com ftalocianinas de zinco, foram analisadas as propriedades morfológicas e estruturais. Com a variação dos grupos protetores dos derivados do glicerol presentes nas regiões periféricas das ZnPcs, a morfologia tubular usualmente observada em MNTs-FF muda drasticamente e passa a ser caracterizada por hastes micrométricas. Analisando sua superfície em estudos de alta resolução por AFM, foi perceptível a formação de camadas de fotossensibilizadores e um incremento substancial de rugosidade. Mesmo com a mudança na morfologia do material, a simetria cristalográfica $P6_1$, tradicionalmente encontrada em MNTs-FF não-conjugados, é mantida. Ensaio de toxicidade foram realizados em células tumorais mamárias (MCF-7), revelando que a morte celular é maior quando as ZnPcs estão conjugadas com MNTs-FF. Estudos de citometria identificaram que a principal via de morte celular é necrose, com eficiência de cerca 80% para os conjugados MNTs-FF/ZnPc. Esses achados mostram que essa conjugação aumenta a eficiência na geração de ROS dos fotossensibilizadores (Fs) utilizados nesse trabalho, indicando potencial aplicação desses materiais na terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: nanotubos de peptídeos, hipericina, ftalocianina de zinco, terapia fotodinâmica, citotoxicidade.

Abstract

It was studied the conjugation of *L,L*-diphenylalanine micro/nanotubes (MNTs-FF) with two types of fluorophore: hypericin (Hyp) and zinc phthalocyanines (ZnPc), order application in photodynamic therapy. It was made investigations on conjugates containing hypericin organized into different crystalline symmetries, a hexagonal phase ($P6_1$) and an orthorhombic phase ($P22_12_1$). The results obtained here are evidence for higher efficiency in the generation of reactive oxygen species (ROS) when hypericin appears conjugated to MNTs-FF. This improvement is observed for MNT-FFs organized into both phases; however, efficiency is still higher for self-assemblies exhibiting hexagonal symmetry. As a mechanism, it was proposed that organization induced by peptide structures and availability of a hydrophobic environment in the vicinities of Hyp/peptide interfaces are crucial for boosting the generation of ROS. In conjugates formed between MNTs-FF and ZnPcs, structural and morphological properties were analyzed in detail. It was found that, by varying glycerol moieties in the periphery of ZnPcs, the tubular morphology usually observed in MNTs-FF changes dramatically and is then characterized by micrometer-long sticks with faceted surfaces. High-resolution AFM imaging showed the formation of layers of photosensitizers and substantial increment on the surface roughness. In despite these drastic morphological and surface changes, the crystalline arrangement of peptides within the complexes remained into the hexagonal $P6_1$ phase usually found in bare MNTs-FF. Cytotoxicity assays performed on tumoral mammary cells (MCF-7) indicated that cell death upon light irradiation is higher when ZnPcs is conjugated to MNTs-FF. Cytometry assays identified that the main mechanism leading to cell death is necrosis, with effectiveness of about 80% for MNTs-FF/ZnPc. These findings show that this conjugation enhances efficiency in ROS generation by the photosynthesizers used in this work, indicating the potential of these materials for photodynamic therapy.

Keywords: peptide nanotubes, hypericin, zinc phthalocyanine, photodynamic therapy, cytotoxicity.

Índice de Figuras

Figura 1. (A) Fórmula estrutural da L,L-difenilalanina e (B) a estrutura molecular da FF a partir da determinação da estrutura do cristal único. Átomos da cadeia lateral são mostrados em laranja.	4
Figura 2. Dipeptídeo FF, formação do hexâmetro e o empilhamento do hexâmetro formando um nanotubo.	5
Figura 3. Representação do processo de ciclização da FF.	6
Figura 4. Estrutura cristalina dos nanotubos de FF fase hexagonal (A) e fase ortorrômbica (B).	7
Figura 5. Automontagem em múltipla escala da L,L-difenilalanina: (A) dímero FF, (B-D) automontagem em hexâmeros seguido da formação de folhas, (E-F) que podem organizar espontaneamente ainda em microtubos hexagonais por um crescimento autoestruturado semelhante ao processo de cristalização confinado.	8
Figura 6. (A) Fórmula estrutural do 1-pireno ácido carboxílico e (B) Função de distribuição espacial do grupo hidrofílico (em vermelho) e do grupo hidrofóbico (em azul) do 1-pireno ácido carboxílico na superfície dos tubos. ¹⁴	11
Figura 7. Diagrama de Jablonski representando os mecanismos fotoquímicos do FS.	13
Figura 8. (A) Fórmula estrutural da hipericina e (B) espectro de absorção da hipericina em etanol.	15
Figura 9. (A) Fórmula estrutural da ftalocianina e (B) espectro de absorção da ftalocianina de zinco em DMSO.	18
Figura 10. Esquema da rota de síntese das ftalocianinas utilizadas nesse trabalho. (adaptada)	20
Figura 11. Ilustração do preparo MNTs-FF contendo hipericina.	25
Figura 12. Degradação do DPBF (A) via reação com oxigênio singlete, com formação do endoperóxido (B) e consequente formação do produto incolor DBB (C).	29
Figura 13. (A) Microscopia Confocal de um único MNTs-FF contendo hipericina, (B) Microscopia de fluorescência do mesmo MNTs-FF com $\lambda_{ex} = 543\text{nm}$ e (C) Imagem de MEV dos MNTs-FF contendo hipericina (concentração de Hyp = $2.85 \mu\text{mol L}^{-1}$).	35

- Figura 14.** Imagens de MEV dos MNTs-FF com concentração de Hyp de (A) 0,7, (B) 2,1, (C) 4,2 e (D) 6,0. $\mu\text{mol L}^{-1}$ 36
- Figura 15.** Correlação entre o diâmetro médio dos tubos e a concentração de hipericina..... 37
- Figura 16.** Imagens de AFM de um microtubo de L,L-difenilalanina funcionalizado com hipericina. (A) Imagem de contraste de fase do conjugado MNTs-FF / Hyp, indicando áreas com composições diferentes. (B) Imagem de topografia mostrando a ausência de aglomerados de hipericina. (C) e (D) reconstrução 3-D. da imagem exibida em (B) e perfil ao longo da secção transversal indicada em (B)..... 38
- Figura 17.** DRX dos MNTs-FF/Hyp antes (superior) e após tratamento térmico a 150°C (preto). Preto indicam o padrão observado, enquanto que a linha vermelha indica a calculada. A linha azul demonstra a diferença entre os observados e calculados de dados. As barras de magenta na parte inferior indicam as reflexões de Bragg da fase ortorrômbica ($P22_12_1$)..... 39
- Figura 18.** Conjugados MNTs-FF/hipericina após tratamento térmico e transição cristalina para fase ortorrômbica. (A) Microscopia Confocal de um único MNTs-FF contendo hipericina, (B) Microscopia de fluorescência do mesmo MNTs-FF com $\lambda_{\text{ex}} = 543\text{nm}$ e (C) Imagem de MEV dos MNTs-FF contendo hipericina (concentração de Hyp = $2,85 \mu\text{mol L}^{-1}$). 40
- Figura 19.** Vista perpendicular (planos XY) mostrando o padrão de empilhamento das moléculas de hipericina adsorvidas na superfície do nanotubos. Em destaque, uma visão ampliada da superfície do nanotubos (em verde) e as interações entre as moléculas de hipericina e do nanotubos peptídico..... 42
- Figura 20.** Distribuição de densidade de massa (kg m^{-3}) calculada para os componentes do sistema e o valor da difusão lateral da água em MNTs-FF na fase hexagonal (A) e fase ortorrômbica (B). (adaptada) 43
- Figura 21.** (A) Espectro de absorção e (B) espectro de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}}=550\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=560\text{ nm}$) da Hyp livre (preto), MNTs-FF_{hex} / Hyp (vermelho) e MNTs-FF_{ort} / Hyp (azul). 44
- Figura 22.** Resumo esquemático do aumento de performance fotofísica nos conjugados com diferentes estruturas..... 46

Figura 23. Taxas de decaimento representativas da absorção temporal do DPBF em 417 nm. Círculos com X amostras Hyp pura, círculos abertos MNTs-FF _(ort) / Hyp e círculos fechados MNTs-FF _(hex) / Hyp (todas as amostras com concentração de 5,69 mmol L ⁻¹ de Hyp).....	47
Figura 24. Taxas de degradação do DPBF em função da concentração de Hyp comparando conjugados MNTs-FF/Hyp nas fases hexagonal e ortorrômbica com o desempenho observado apenas em presença de hipericina.	48
Figura 25. Decaimento do tempo de vida de fluorescência dos conjugados MNTs-FF Hex/Hyp, MNTs-FF ort/Hyp e Hyp pura. (λ_{ex} =340 nm e λ_{em} =590 nm)	50
Figura 26. Cinética do consumo de DPBF em misturas de DMSO e água. Círculos preenchidos MNTs-FF _(hex) / Hyp, círculos abertos MNTs-FF _(ort) / Hyp e círculos com x Hyp pura. Linhas vermelhas pontilhadas: ajuste linear a partir dos valores $\Delta \ln(Abs)/\Delta t$ listado na Tabela 3. Concentração de Hyp foi mantida a 6,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em todas as amostras.....	52
Figura 27. Ftalocianinas de zinco utilizadas na conjugação com MNTs-FF.	54
Figura 28. Imagens de MEV dos MNTs-FF funcionalizados com diferentes ftalocianinas de zinco: (A) ZnPc1, (B) ZnPc2, (C) ZnPc3, (D) ZnPc4. (Escala da direita 50 micro, esquerda 20 micro).	55
Figura 29. (A) MNTs-FF contendo ZnPc1, (B) imagem ampliada da superfície e (C) perfil topográfico da haste.	56
Figura 30. (A) MNTs-FF contendo ZnPc2, (B) imagem ampliada da superfície e (C) perfil topográfico da haste.	57
Figura 31. (A) MNTs-FF contendo ZnPc3, (B) imagem ampliada da superfície e (C) perfil topográfico da haste.	58
Figura 32. (A) MNTs-FF contendo ZnPc4, (B) imagem ampliada da superfície e (C) perfil topográfico da haste.	59
Figura 33. DRX dos conjugados MNTs-FF com quatro diferentes ftalocianinas de zinco e para MNTs-FF puro.....	60
Figura 34. Espectros vibracionais para os conjugados MNTs-FF / ftalocianinas e para MNTs-FF puro.	61
Figura 35. Espectros de absorção das ZnPcs em DMSO.	64
Figura 36. Espectros de absorção dos conjugados MNTs-FF com ZnPcs.	64

- Figura 37.** Taxas de decaimento representativas da absorção temporal do DPBF em 417 nm. Vermelho ftalocianina ZnPc3 e preto conjugado MNTs-FF / ZnPc3. (Concentração de ZnPc3 de $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). 65
- Figura 38.** Fonte de luz utilizada (LED com emissão em 660 nm). 67
- Figura 39.** Viabilidade celular da linhagem celular MCF-7 por vermelho neutro. Tempo de incubação com agente ZnPc3, 2 horas e tempo de irradiação com LED 660 nm, 10 min. Concentrações dos agentes FS (a) 2,4 μ mol, (b) 3,7 μ mol, (c) 5,5 μ mol e (d) 8,3 μ mol; MNTs-FF (a) 1mg mL⁻¹, (b) 2mg mL⁻¹, (c) 3mg mL⁻¹, (d) 4mg mL⁻¹. A % viabilidade celular (média de três experimentos) foi baseada na absorbância das células controle (sem compostos FS). 68
- Figura 40.** Captação de ZnPc pelas células MCF-7. Imagem de Fluorescência da linhagem MCF-7 após 2 horas de incubação com 0,7 μ mol L⁻¹ de ZnPc e 0,3 mg mL⁻¹ de Ftalocianina de zinco associada a MNTs-FF. Os quadrantes do lado esquerdo da figura correspondem as imagens das células incorporadas apenas com ZnPc sob aumento de 20x e 63x conforme indicação na figura, e os quadrantes do lado direito, correspondem as imagens das células tratadas com MNTs-FF/ZnPc. As imagens foram obtidas através do microscópio Leica DMI 6000B e filtro Y5 com excitação em 675nm. (Escala: imagens 20x = 50 micro, 63x = 20 micro) 70
- Figura 41.** Quantificação da captação de ftalocianina pelas células da linhagem MCF-7. A quantificação foi obtida pelo programa Leica Application Suite (LAS, v. 3, Leica Microsystems) utilizando áreas das imagens com aumento de 63x da figura 38. 71
- Figura 42.** (A) Citogramas representativos ilustrando viabilidade da linhagem MCF-7 x ZnPc, estimados por marcadores Anexina V-FITC e PI. As células MCF-7 ($0,6 \times 10^6$ células/experimento) foram incubadas com ZnPc ($0,5 \mu$ mol L⁻¹), MNTs-FF ($0,2$ mg mL⁻¹) e MNTs-FF/ZnPc por 2 horas e irradiadas a 660 nm. O ensaio de citometria foi realizado 24 horas após irradiação (i) e comparado com células submetidas ao mesmo tratamento porem sem irradiação. (B) % de população apoptótica. A marcação An⁻/PI⁺ corresponde células mortas por necrose através do marcador nuclear de células permeáveis, ou seja, células necróticas; An⁺/PI⁻ marca apenas externalização de PS (fosfatidil serina) correspondendo a apoptose inicial; An⁺/PI⁺ marca PS e núcleo, apoptose avançada, e An⁻/PI⁻ corresponde a células vivas. 72

Índice de Tabelas

Tabela 1. Concentrações de Hyp nas amostras estudadas.....	46
Tabela 2. Tempos de vida de fluorescência em clorofórmio para Hyp pura e para os conjugados MNTs-FF _(ort) / Hyp e MNTs-FF _(hex) / Hyp. $\lambda_{ex}=340\text{nm}$ (concentração de Hyp $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$)	50
Tabela 3. Taxas de decaimento do consumo de DPBF em misturas de DMSO e água (concentração de Hyp $6,9 \mu\text{mol L}^{-1}$)	53
Tabela 4. Valores da rugosidade para os conjugados de MNTs-FF com ftalocianinas de zinco.	60
Tabela 5. Número de onda e o modo vibracional esperado para os espectros acima.....	62
Tabela 6. Concentrações de ZnPc3 e MNTs-FF nas amostras.	66

Lista de Abreviaturas e Siglas

AcOH – ácido acético
AFM – Microscopia de Força Atômica
ATP – trifosfato de adenosina
BCRJ – banco de células do Rio de Janeiro
CaCl₂ – cloreto de cálcio
CdTe – telureto de cádmio
CEM – Central Experimental Multiusuário
CMF-BSS – solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio
DBB – 1,2-dibenzoilbenzeno
DMEM – meio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF – dimetilformamida
DMSO – dimetilsulfóxido
DPBF – 1,3-difenilisobenzofurano
FF – L,L-difenilalanina
FS – Fotossensibilizadores
FTIR – espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GOx – enzima glicose-oxidase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HCl – ácido clorídrico
Hepes – ácido N-2hidroxietilpiperazina-N'-2etanossulfônico
HFP – 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HOMO – Highest Occupied Molecular Orbital
Hyp – hipericina
KCl – cloreto de potássio
LED – Light emitting diode
LEMN – Laboratório de Eletroquímica e Materiais Nanoestruturados
LNNano – Laboratório Nacional de Nanotecnologia
LUMO – Lowest unoccupied Molecular Orbital
MCF-7 – Células tumorais mamárias
MCVL – microscópio confocal de varredura a laser
MeOH – metanol
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MgSO₄ – sulfato de magnésio

MNTs-FF – micro/nanotubos de L,L-difenilalanina

MNTs-FF/ZnPc – conjugado micro/nanotubos de L,L-difenilalanina com ftalocianina de zinco.

MNTs-FF_{hex} / Hyp – conjugado micro/nanotubos de L,L-difenilalanina na fase hexagonal com hipericina

MNTs-FF_{ort} / Hyp – conjugado micro/nanotubos de L,L-difenilalanina na fase ortorrômbica com hipericina

NaCl – cloreto de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

Na₂HPO₄ – fosfato dissódico

Ns – nanosegundos

Pc – Ftalocianina

PDT – terapia fotodinâmica

PS – fosfatidil serina

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROS – espécies reativas de oxigênio

Rq – rugosidade média quadrática

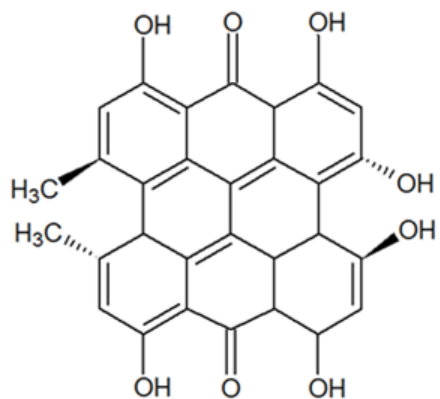
SFB – soro fetal bovino

SnCl₂.2H₂O – cloreto de estanho di-hidratado

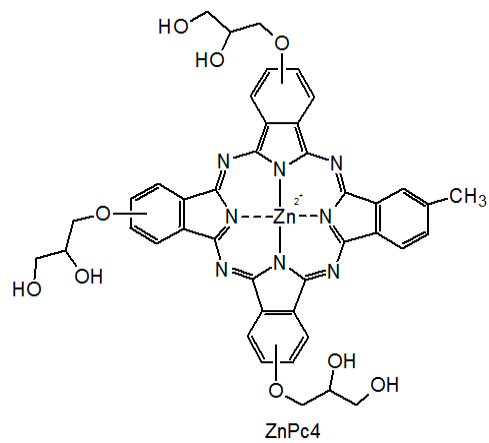
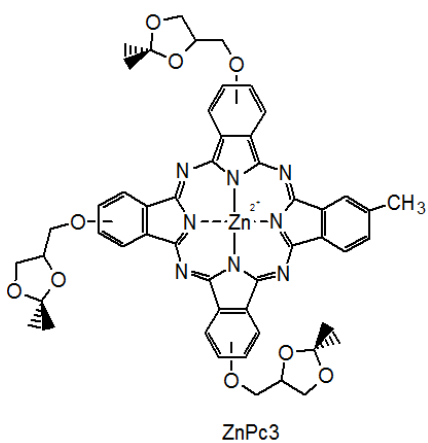
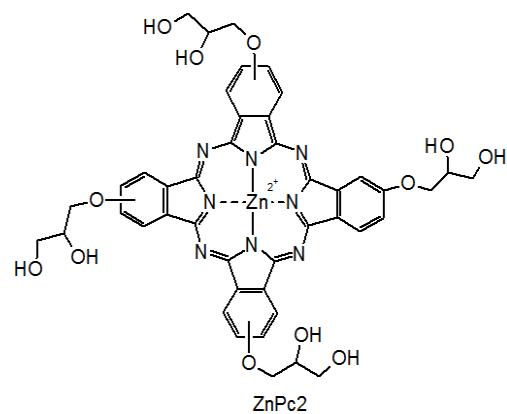
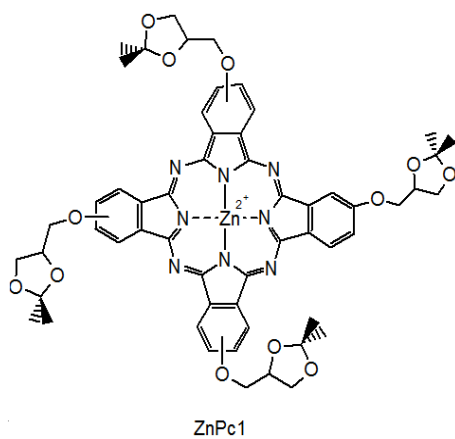
ZnPc – ftalocianina de zinco

Estruturas dos compostos

- Hipericina (Hyp)



- Ftalocianinas de Zinco (ZnPc)



Sumário

Resumo	i
Abstract.....	ii
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
Estruturas dos compostos.....	x
1. Introdução	1
1.1. Nanotubos de peptídeos	3
1.2. Funcionalização de nanoestruturas peptídicas	9
1.3. Fotossensibilizadores.....	12
1.3.1. Hipericina	15
1.3.2. Ftalocianina de zinco	17
2. Objetivos	22
2.1. Gerais.....	22
2.2. Específicos.....	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Reagentes e equipamentos	23
3.2. Preparo dos MNTs-FF conjugados com hipericina	25
3.3. Preparo dos MNTs-FF conjugados com ftalocianinas de zinco	26
3.4. Síntese da hipericina.....	26
3.5. Síntese das ftalocianinas de zinco	27
3.6. Preparação das amostras para análises	27
3.7. Simulação computacional	28
3.8. Método indireto da caracterização de oxigênio singlete.....	28
3.9. Cultura celular	29
3.10. Incubação com o fotossensibilizador	29
3.11. Viabilidade celular.....	30
3.12. Microscopia de fluorescência.....	31
3.13. Análise de marcação simultânea com anexina V-FITC/Iodeto de propídeo por citometria de fluxo.....	31
4. Resultados e Discussão	34
4.1. Micro/Nanotubos de L,L-difenilalanina contendo hipericina	34

4.1.1. Caracterização Morfológica e Estrutural	34
4.1.2. Caracterização fotofísica.....	43
4.2. Micro/nanotubos de L,L-difenilalanina contendo ftalocianinas de zinco.....	54
4.2.1. Caracterização morfológica e estrutural.....	54
4.2.2. Espectro de absorção dos fotossensibilizadores	63
4.2.3. Geração de ROS com método indireto	65
4.2.4. Ensaio de viabilidade celular.....	66
4.2.5. Avaliação da morte celular.....	69
5. Conclusões	73
6. Referências	76
Súmula Curricular	82

1. Introdução

Na natureza existem 20 aminoácidos essenciais para a vida e que desempenham muitas funções no metabolismo. Em particular, os aminoácidos servem como bloco de construção de peptídeos e proteínas, dando origem a estruturas tridimensionais complexas. Todos os aminoácidos, exceto a glicina, são quirais e existem na natureza apenas com o enantiômero *L* (levógiro). Assim, eles apresentam a mesma estrutura básica com um grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) e um grupo carboxílico ($-\text{COO}^-$), e se diferenciam de acordo com a cadeia lateral ligada ao carbono central.^{1,2}

Essas estruturas são formadas por meio de um processo de automontagem molecular.³ A organização dos blocos de construção em estruturas ordenadas está baseada no reconhecimento específico, que é facilitado por uma combinação de várias interações não covalentes diferentes, incluindo interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações de empilhamento π (π -stacking).^{4,5}

Sequências curtas de amino ácidos, os peptídeos, possuem excelente estabilidade físico-química quando comparado com proteínas de maior peso molecular.⁶ Além disso, os peptídeos possuem biocompatibilidade e diversidade química que são encontrados nas proteínas, no entanto, são muito mais robustos e podem ser sintetizados em grande escala com relativa facilidade.⁴ Peptídeos curtos como a L,L-difenilalanina (FF) e a L,L-difenilglicina⁴⁻⁷, por exemplo, apresentam polimorfismo e podem se associar espontaneamente para formar nanotubos, nanoesferas, nanofibrilas, nanofitas, e outras estruturas ordenadas em nano escala.⁵ Esses materiais apresentam capacidades funcionais que cobrem uma ampla gama de aplicações, incluindo biomedicina⁸, engenharia de

tecidos ⁹ e liberação de fármacos ¹⁰. Além da vantagem de síntese rápida, funcionalização relativamente simples e baixo custo, confirmam o potencial desses arranjos. No entanto, a compreensão dos efeitos da organização da escala molecular sobre o comportamento macroscópico destes materiais ainda permanece nos estágios iniciais. Questões como o controle do tamanho das arquiteturas durante a síntese e a estabilidade durante a manipulação em líquidos, quando da tentativa de integrá-las a dispositivos de detecção ou a sistemas de entrega de drogas, precisam ser solucionadas. ²

Com a finalidade de obter novas propriedades, aperfeiçoando as já existentes e aumentando a esfera de aplicações dos nanomateriais peptídicos, pesquisas estão sendo realizadas buscando estratégias que promovam a interação destes materiais com outros compostos. ¹¹ Nesse caso, átomos ou moléculas podem se ligar de forma covalente ou não-covalente com nanoestruturas peptídicas, promovendo modificações químicas e alterando as propriedades originais desses materiais. Muitos estudos estão sendo realizados nesta área, onde se pode citar a funcionalização de nanoestruturas peptídicas com: nanopartículas de metais de transição ¹², polímeros ¹³, fluoróforos ¹⁴, entre outros.

Nesse trabalho, foi utilizado uma sequência peptídica curta, o dipeptídeo L,L-difenilalanina, para obtenção de nanotubos, onde esse material foi funcionalizado com diferentes moléculas fluorescentes sensíveis a luz visível que possuem potencial aplicação em terapias fotodinâmicas para a destruição de células e tecidos patogênicos.

A FF foi utilizada por apresentar diversas propriedades. Trabalhos publicados mostram sua estabilidade térmica e química onde é mostrado que os

nanotubos de FF perdem sua morfologia a aproximadamente apenas a $\sim 300^{\circ}\text{C}$ e que são estáveis a diversos tipos de solventes como etanol, acetona, entre outros.¹⁵ Estudos recentes mostram também que propriedades relacionadas à estabilidade química e física variam de acordo com a morfologia obtida, sendo que nanofios apresentam estabilidade à variação de pH, podendo ser usados em soluções ácidas e básicas concentradas.¹⁶

Nas seções seguintes, há uma revisão sobre os materiais utilizados nesse trabalho.

1.1. Nanotubos de peptídeos

Nanotubos de peptídeos são conjuntos especialmente intrigantes, pois têm a possibilidade de numerosas modificações químicas e permite a utilização em sistemas biológicos. Ghadiri e colaboradores demonstraram, no início dos anos 1990, que nanotubos podem ser automontados por um processo baseado em estruturas folha- β a partir da auto-organização de peptídeos cíclicos que contêm um número par de aminoácidos levogiros (L) e dextrogiros (D).¹⁷ Outro tipo de estrutura peptídica tubular pode ser formado a partir de dipeptídeos. Gorbitz¹⁸ foi o pioneiro em demonstrar que sequencias peptídicas curtas podem se auto organizar em estruturas cristalinas. Usando técnicas cristalográficas, ele foi capaz de caracterizar diferentes conformações de cristais compostos por dipeptídeos, que se auto organizam em uma estrutura tubular.¹⁹ Gazit e Rechess descobriram que nanotubos de peptídeos estáveis são formados a partir do dipeptídeo aromático L,L-difenilalanina em solução aquosa.²⁰ A inspiração surgiu da observação da formação de nanotubos durante o estudo da habilidade

de sequencias curtas de peptídeos aromáticos na formação de fibrilas da proteína β amiloide que são organizadas espontaneamente. Estas fibrilas têm sido pesquisadas devido à associação com doenças neurodegenerativas, sendo a doença de Alzheimer, o Parkinson e o diabetes tipo II, os distúrbios mais comuns.

Nesse trabalho, foi utilizado o dipeptídeo FF (Figura 1) para a nanoestruturação em fase líquida. Esse material pode se auto organizar em nanoestruturas peptídicas estáveis com diferentes morfologias, em vários ambientes aquosos ou orgânicos.^{19,5} Devido a isto, ele tem se tornado um dos blocos mais importantes e intensamente estudados ultimamente. Essas investigações têm sugerido que as interações dos anéis aromáticos desempenham um papel importante no processo de automontagem e podem favorecer a organização molecular estável de peptídeos em fibrilas amiloides.²¹

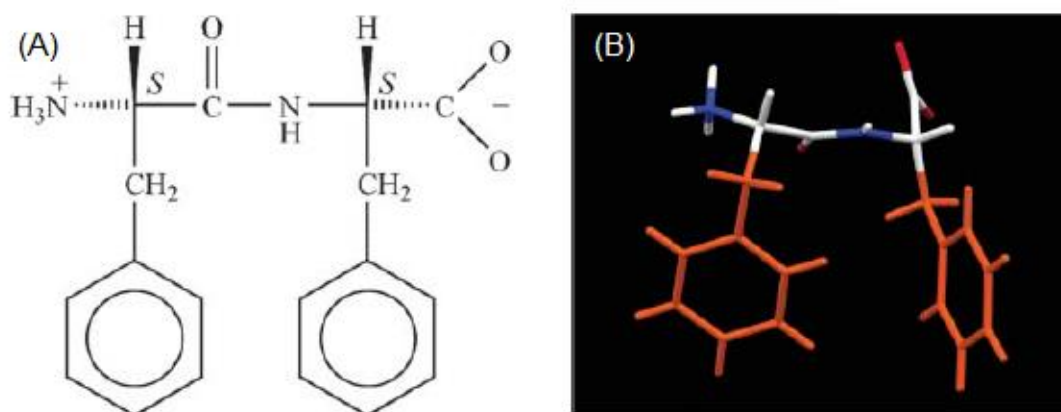


Figura 1. (A) Fórmula estrutural da L,L-difenilalanina e (B) a estrutura molecular da FF a partir da determinação da estrutura do cristal único. Átomos da cadeia lateral são mostrado em laranja.¹⁹

Nanotubos de FF são usualmente sintetizados via fase líquida por meio da dissolução do dipeptídeo em 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) a altas concentrações ($\geq 100 \text{ mg mL}^{-1}$), seguido pela diluição em água. Numa gama de concentrações finais da ordem de $\mu\text{mol L}^{-1}$, observa-se a montagem rápida das nanoestruturas, em tempos da ordem de dezena de minutos.²⁰

Esse material quando automontado em meio aquoso, apresenta arranjo cristalino com grupo de simetria hexagonal $P6_1$.¹⁹ Nessa organização, as unidades de FF formam empilhamentos cíclicos constituindo um canal paralelo ao eixo longitudinal da estrutura, onde os grupos carboxílicos e aminos permanecem voltados para parte interna do tubo.^{19, 22} Com isso, é possível armazenar moléculas de água e/ou outras moléculas hidrofílicas nesse canal. A presença de água na cavidade do tubo leva a alterações significativas nas propriedades morfológicas²³ e eletrônicas²⁴ desses sistemas. Já os anéis aromáticos ficam voltados para a parte externa do tubo proporcionando uma superfície hidrofóbica.¹⁹ Esse processo está ilustrado na Figura 2.

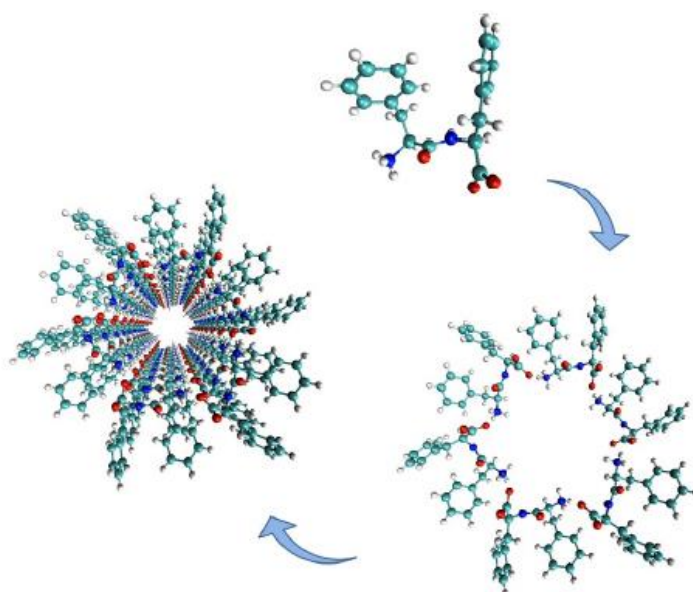


Figura 2. Dipeptídeo FF, formação do hexâmetro e o empilhamento do hexâmetro formando um nanotubo.

Quando esse material é submetido a tratamento térmico sob temperaturas acima de 150°C, este exibe uma transição de fase.²⁵ Com o aquecimento, ocorre uma mudança da estrutura peptídica referente a uma transição de massa molecular a partir de uma conformação linear (MM = 313 g mol⁻¹), para uma conformação cíclica (MM = 295 g mol⁻¹), seguido de uma reorganização da estrutura cristalina.^{25a} O processo de ciclização é acompanhado pela liberação de uma molécula de água, o que corresponde a mudança no peso molecular,^{25b} como mostra a Figura 3.

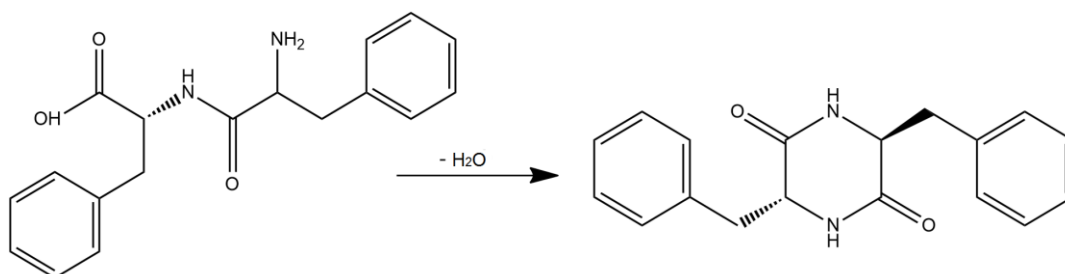


Figura 3. Representação do processo de ciclização da FF.

A transição molecular induzida termicamente altera a estrutura morfológica do tubo, a partir de um nanotubo oco, que corresponde à fase hexagonal, para nanofitas de peptídeo, onde essa nova fase assume simetria ortorrômbica. Essa transição é irreversível e induz alterações nas propriedades morfológicas e estruturais dos MNTs-FF, do nível microscópico ao macroscópico. A Figura 4 apresenta as estruturas cristalinas na fase hexagonal e ortorrômbica, onde é possível observar que, com a transição de fase, os nanofios passam a apresentar uma superfície mais hidrofílica.

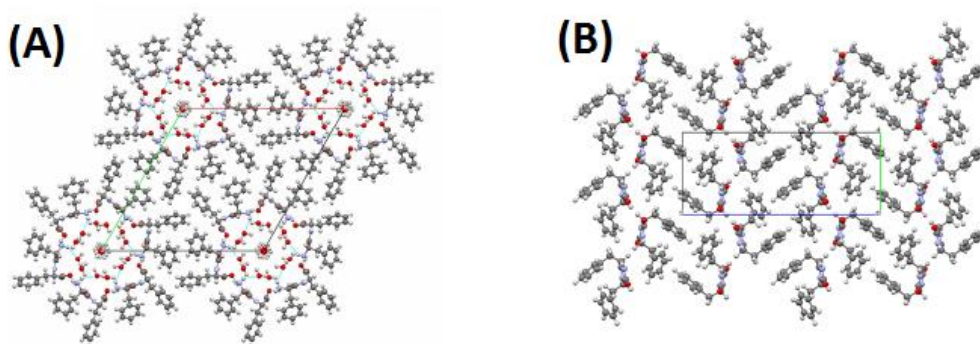


Figura 4. Estrutura cristalina dos nanotubos de FF fase hexagonal (A) e fase ortorrômbica (B). ²⁶

Nanotubos de FF são capazes de se auto montar em robustos microtubos hexagonais como resultado da organização confinada de estruturas tubulares durante a cristalização ou agregação. Os microtubos evoluem hierarquicamente e são constituídos de feixes de nanotubos organizados. Ou seja, moléculas individuais do dipeptídeo começam se auto organizando em nanotubos com um padrão de empacotamento hexagonal, seguido de auto-organização em microtubos hexagonais através de um crescimento estruturado de automontagem similar. Além disso, tais microtubos hexagonais são cristalinos e podem atuar, por exemplo, como um guia de onda em conjunto com corantes. ²⁷ A Figura 5 ilustra esquematicamente a formação multiescala dos microtubos de peptídeos de FF.

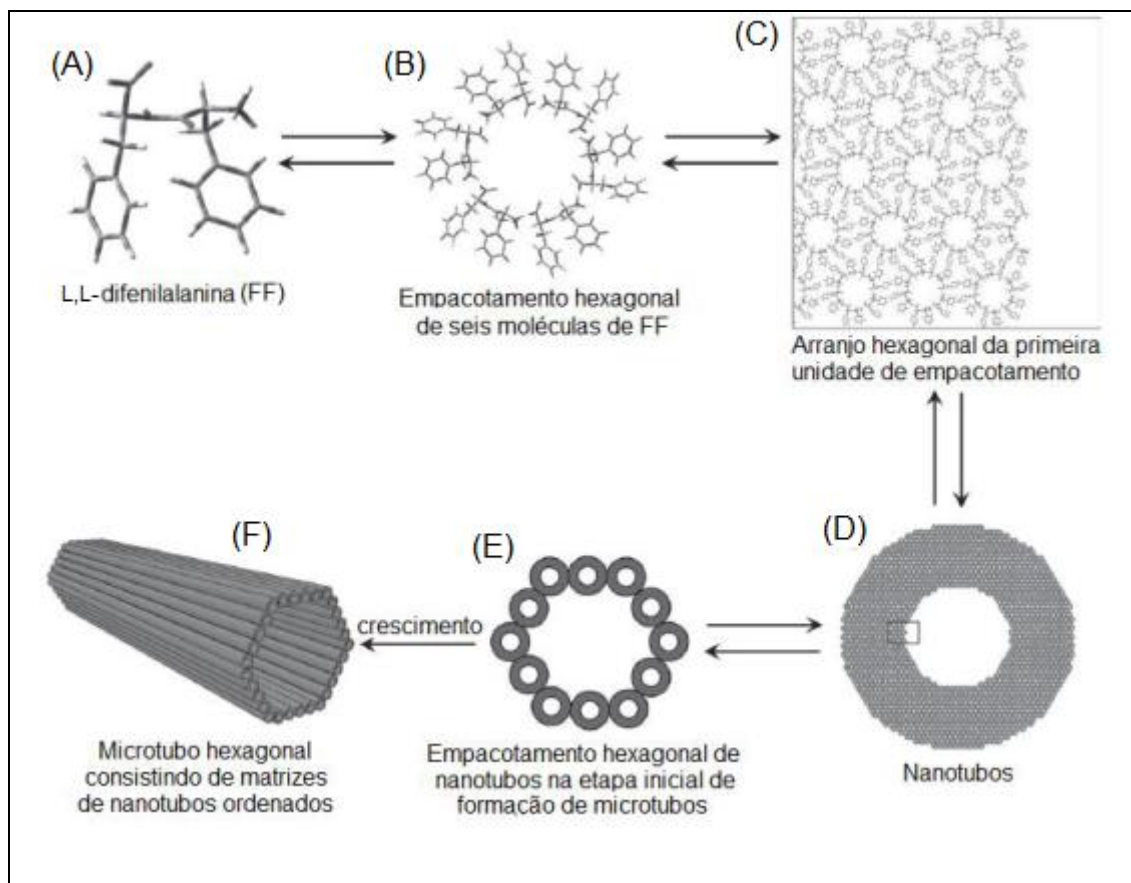


Figura 5. Automontagem em múltipla escala da L,L-difenilalanina: (A) dímero FF, (B-D) automontagem em hexâmeros seguido da formação de folhas, (E-F) que podem organizar espontaneamente ainda em microtubos hexagonais por um crescimento autoestruturado semelhante ao processo de cristalização confinado.²⁷

Esse processo de agregação é observado devido à interação entre os anéis aromáticos que ficam voltados para a parte externa do tubo, dificultando assim o controle do tamanho do material obtido, ocorrendo uma polidispersão de tamanho no produto final.

Com o intuito de conseguir novas propriedades, ou melhorar as já existentes nesses materiais, pesquisas estão sendo realizadas por meio da funcionalização covalente ou não-covalente desse material. A seguir alguns estudos sobre a funcionalização dos NTs-FF em diferentes seguimentos de pesquisa.

1.2. Funcionalização de nanoestruturas peptídicas

Foi estudada pelo grupo de pesquisa a formação de nanotubos de L,L-difenilalanina com complexo de cobre (II) em membrana Nafion na superfície de eletrodo de carbono vítreo.²⁸ Nanoestruturas de peptídeos em geral são isolantes e para obter propriedades de condução, algumas modificações químicas podem ser realizadas para formar compostos híbridos com objetivo específico de diminuir sua natureza isolante. Mediante a combinação com complexo de cobre (II), as propriedades eletroquímicas do material apresentaram alta atividade eletrocatalítica na oxidação da dopamina. A sensibilidade de detecção foi considerada reforçada pelo uso de nanotubos, onde os resultados sugeriram que este sistema proporciona uma vantagem atraente para um novo tipo de sensor eletroquímico.

Ainda com o objetivo específico de diminuir a natureza isolante dos nanomateriais peptídicos, Park e colaboradores²⁹ funcionalizaram esses materiais com polímero condutor (polianilina) por meio da técnica fase sólida-vapor para preparo das nanoestruturas. Nanofios de L,L-difenilalanina foram submetidos à modificação química através de uma solução polimerizante de persulfato de amônio contendo anilina em meio ácido para gerar uma “casca” polimérica sobre os nanofios que habilita o uso em arquiteturas de detecção.

Em outro trabalho, Lakshmanan e colaboradores³⁰ realizaram a funcionalização destes materiais pela adição de nanopartículas de ouro. Foi possível observar através de técnicas de microscopia de transmissão que as nanopartículas estão presentes em toda a extensão das nanoestruturas de forma homogênea na superfície dos tubos e o resultado obtido é fundamental na

construção de moldes e componentes orgânicos em nanoescala para a próxima geração de biossensores, assim como em eletroquímica funcional e dispositivos óptico-eletrônicos.

De forma a utilizar estas nanoestruturas como agentes de contraste, eles precisam ser funcionalizados com moléculas apropriadas proporcionando-lhes propriedades específicas. Ryu e colaboradores ³¹ desenvolveram nanotubos de peptídeos fotoluminescentes pela incorporação *in situ* de ácido salicílico e íons lantanídeos. Com base nesta ideia, outro exemplo interessante de funcionalização situa-se no campo de biossensores ópticos. Kim e colaboradores ³² desenvolveram um hidrogel de nanofibras fluorescentes da sequência Fmoc-FF funcionalizados com pontos quânticos de telureto de cádmio (CdTe) para detecção de glicose. A enzima glicose-oxidase (GOx) foi incorporada ao hidrogel para atuar como um biorreceptor da reação de fotoluminescência. Na reação da glicose, esta foi oxidada produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) extinguindo a fotoluminescência e atuando como receptor de elétrons. Com a exposição à luz UV, e com o aumento da concentração de GOx, a cor do hidrogel de peptídeo fotoluminescente mudou de vermelho para preto indicando a extinção da fotoluminescência desencadeada pela presença da GOx. A diminuição da fluorescência foi relacionada com a concentração de GOx na faixa de 1 a 10 mmol L⁻¹.

Também foi possível funcionalizar os NTs-FF com materiais fluorescentes, como no trabalho apresentado por Martins e coautores ¹⁴, onde a funcionalização foi realizada com 1-pireno ácido carboxílico a fim de verificar a importância do controle do pH no preparo das nanoestruturas e a concentração da molécula fluorescente na estrutura final. Mudanças nos valores de pH

geraram estruturas de morfologias diferentes, podendo assumir a forma de fitas (aumento do pH) ou fios (diminuição do pH) e comprimentos diferentes, onde fibrilas mais longas foram obtidas em valores de pH mais elevados. Além disso, a concentração do fluoróforo interfere na estrutura final, retardando o crescimento de nanotubos em pH baixo, devido as forças concorrentes de interação entre moléculas formadoras de nanotubos, favorecendo o crescimento a valores de pH mais elevados e contribuindo para forças sinérgicas de interação. Como a molécula 1-pireno ácido carboxílico apresenta uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica (Figura 6-A), ela interage com a parte externa do tubo por interação hidrofóbica e a parte hidrofílica da estrutura fica voltada para fora e interage com o meio aquoso, como mostra a figura de dinâmica molecular (Figura 6-B).

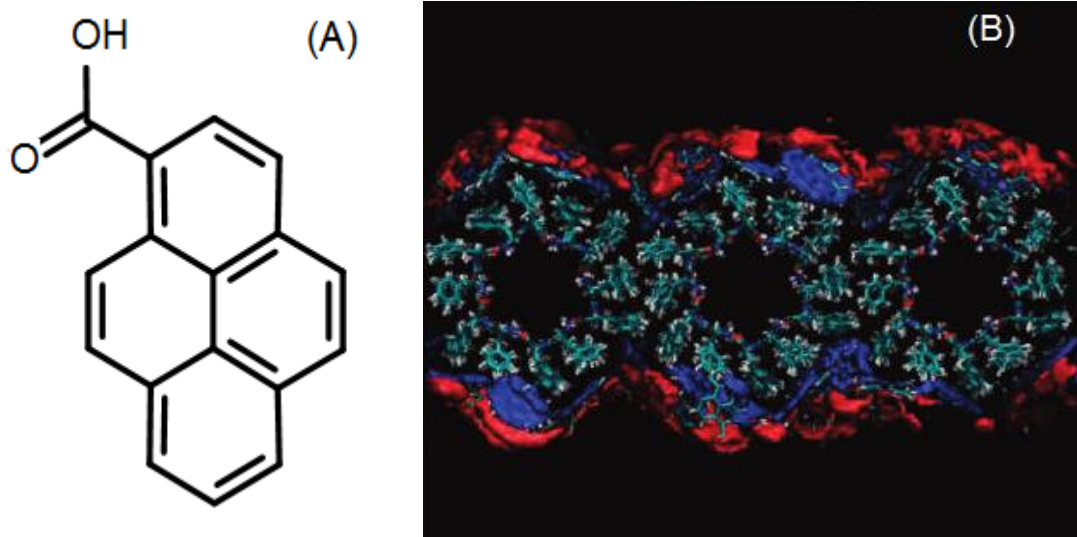


Figura 6. (A) Fórmula estrutural do 1-pireno ácido carboxílico e (B) Função de distribuição espacial do grupo hidrofílico (em vermelho) e do grupo hidrofóbico (em azul) do 1-pireno ácido carboxílico na superfície dos tubos. ¹⁴

Neste trabalho, tubos de FF em escala nano e micrométrica (MNTs-FF), foram sintetizados e funcionalizados com diferentes moléculas fluorescentes sensíveis à luz visível. Esses fotossensibilizadores possuem potencial aplicação em terapias para tratamento de destruição de células e tecidos patogênicos. Nosso objetivo foi investigar a interação entre os materiais e estudar possíveis mudanças em suas propriedades para otimização do material funcionalizado. Nas sessões seguintes é apresentada uma introdução sobre os materiais fotossensíveis utilizados e sua potencial aplicação.

1.3. Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores (FS) são compostos capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “Reactive Oxygen Species”) após excitação com luz visível, com comprimento de onda adequado de cada molécula, na presença do oxigênio molecular.³³ O mecanismo de geração de ROS pelo FS ocorre inicialmente com a promoção do FS de seu estado fundamental a um estado excitado singlete. A etapa importante envolve o cruzamento intersistema, onde o estado excitado singlete é convertido a um estado excitado triplete, transferindo assim elétrons ou energia para o oxigênio molecular levando a formação de ROS. A formação de ROS a partir dos FS pode ser explicada por dois mecanismos químicos: a transferência de elétrons ou a transferência de energia.³⁴

Na transferência de elétrons (mecanismo tipo I), o FS no estado triplete interage diretamente com diferentes macromoléculas biológicas, por meio de reações de transferência de elétrons ou transferência de hidrogênio, levando à

formação de radicais livres e/ou íons radicais, os quais poderão interagir com o oxigênio para gerar ROS, principalmente superóxido e derivados deste. Já na transferência de energia (mecanismo tipo II), o FS no estado triplete transfere energia para o oxigênio molecular produzindo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa que oxida vários substratos biológicos.

³⁴ Acredita-se que o oxigênio singlete seja o principal mediador dos danos fotodinâmicos nos sistemas biológicos, pois reage rapidamente com os mais variados materiais biológicos eletrofílicos, como lipídios insaturados, proteínas e ácidos nucleicos, sendo apontado como o principal responsável pela inativação da célula tumoral. ³³ Os processos envolvidos em ambos os mecanismos estão resumidos no diagrama de Jablonski, Figura 7.

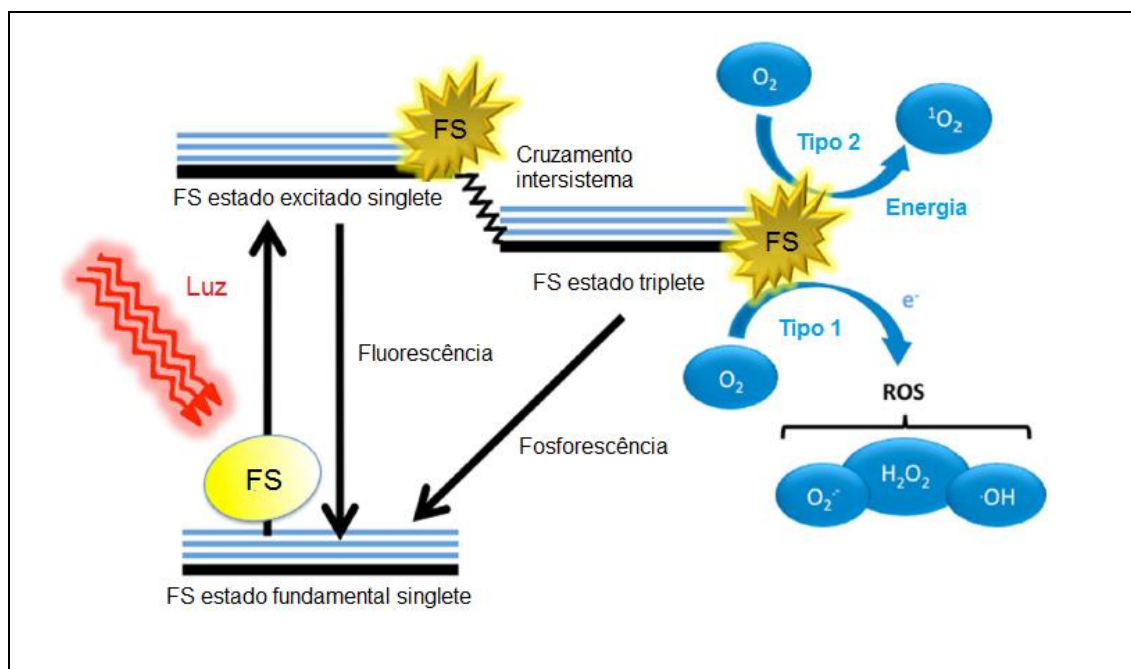


Figura 7. Diagrama de Jablonski representando os mecanismos fotoquímicos do FS.

Essa técnica que se baseia nas propriedades benéficas do uso da luz com FS é conhecida como Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês “Photodynamic Therapy”). A PDT é uma promissora técnica de tratamento do câncer que envolve a interação simultânea de um FS, luz visível e oxigênio molecular presente nas células, produzindo ROS. Como consequência disso, o tecido tumoral é levado à morte por necrose (decomposição rápida que afeta populações celulares amplas) ou apoptose (processo programado de morte celular), eliminando a lesão cancerosa, permitindo a completa restauração do tecido.³⁶

A PDT é um tratamento que pode ser repetido várias vezes, pois não provoca efeitos tóxicos, sendo esta uma das vantagens em relação ao tratamento convencional (quimioterapia). Sendo o único efeito indesejado é a necessidade de evitar exposição ao sol, já que a pele se torna sensível a luz. Este tipo de tratamento tem sido utilizado com sucesso em casos de tumores externos que permite o acesso fácil da luz, como no caso do câncer de pele, mama, entre outros.³⁷

Os tecidos contêm substâncias que absorvem radiação eletromagnética como, por exemplo, as proteínas que absorvem entre 200 – 350 nm, a melanina absorve entre 200 – 400 nm, a hemoglobina absorve na região entre 400 – 600 nm e a água absorve na região do infravermelho, acima de 800 nm. Por isso para ser aplicado na PDT o fotossensibilizador tem que absorver na região entre 600 – 800 nm (janela terapêutica), pois nessa faixa os tecidos são relativamente transparentes.³⁸

Nesse trabalho, foram utilizadas duas classes de fotossensibilizadores para a conjugação com os materiais peptídicos. A hipericina, um

fotossensibilizador natural, e quatro diferentes ftalocianinas de zinco sintéticas. A descrição detalhada cada FS é introduzida a seguir.

1.3.1. Hipericina

A hipericina (Hyp) (Figura 8-A) é um FS natural encontrado nas plantas do gênero *Hypericum perforatum*, uma planta herbácea com flores amarelas contendo pequenos pontos pretos ao longo das margens, popularmente conhecida como erva de São João. A hipericina tem um extenso sistema de anéis aromáticos e absorve luz na região do visível resultando uma cor vermelha intensa.³⁹ Seu espectro de absorção (Figura 8-B) apresenta dois picos principais em 545 e 590 nm (absorção máxima) que são atribuídos a absorção do estado excitado S_1 e S_2 , respectivamente.³⁹

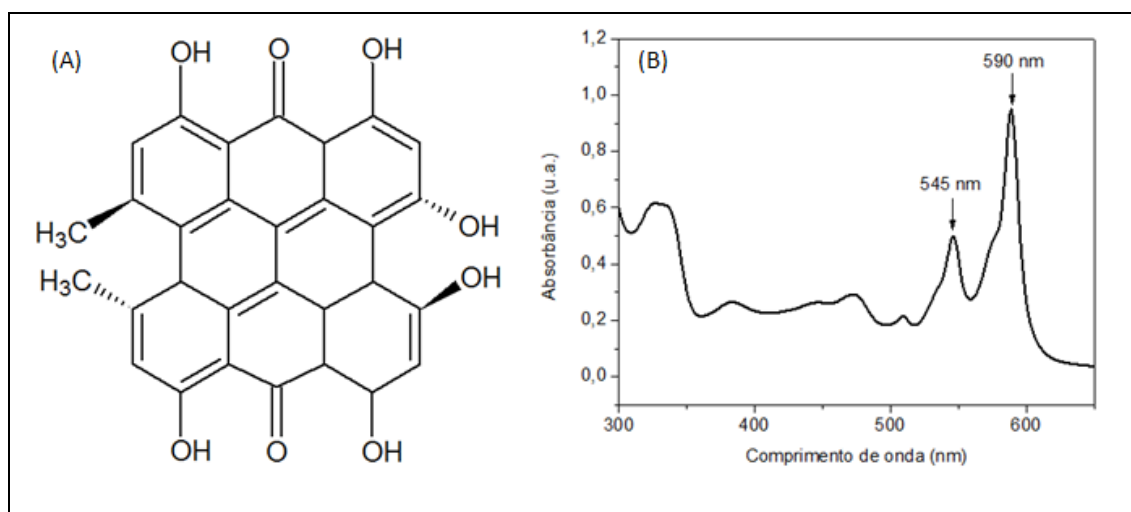


Figura 8. (A) Fórmula estrutural da hipericina e (B) espectro de absorção da hipericina em etanol.

Essa molécula pode ser sintetizada a partir do emodin e emodin antrone, onde a enzima emodin antrone oxigenase condensa estes dois compostos para a diantrone e após sucessivas oxidações forma-se a protohipericina que na presença de luz gera a molécula hipericina.⁴⁰

A hipericina é hidrofóbica e insolúvel em água, cloreto de metileno e a maioria dos solventes não polares. No entanto é solúvel em substâncias orgânicas polares incluindo cetona, etanol, metanol, acetato de etila e outros solventes produzindo soluções vermelhas com emissão máxima de fluorescência a cerca de 600 nm.⁴¹ O primeiro relatório detalhado do isolamento da hipericina a partir do extrato de *Hypericum perforatum*, foi publicado em 1939 por Brockmann.⁴² Depois desse período, as investigações desse composto são dificilmente encontradas na literatura e somente na década de 80 ressurgiu o interesse por essa molécula quando se descobriu seus efeitos antivirais.⁴³ A Hyp tem sido largamente utilizada como um antidepressivo,⁴⁴ mas o recente interesse por essa molécula se deve por sua atividade antitumoral e antimicrobiana, além de apresentar alto rendimento quântico do estado triplete ($0,71 \pm 0,04$) e de formação do oxigênio singlete ($0,73 \pm 0,03$) em solução de etanol.⁴⁵

A capacidade fototóxica da hipericina tem sido avaliada em estudos de caráter antimicrobiano⁴⁶ e na morte de células tumorais, induzindo tanto apoptose quanto necrose.⁴⁷⁻⁴⁸ Embora não tenha sido totalmente esclarecido o mecanismo de ação da hipericina, seu efeito biológico tem sido associado à produção de grande quantidade de oxigênio singlete (reação tipo II), sendo este radical extremamente tóxico.⁴⁹

Estudos também estão sendo realizados para se investigar a interação da hipericina com outros materiais. Sgarbossa e colaboradores⁵⁰ estudaram *in vitro* a interação da hipericina com peptídeos β -amilóides, onde em uma concentração de 10^{-5} mol L⁻¹ a hipericina impediu ou interrompeu o processo de agregação do peptídeo β -amilóide (1-40). Foi relatado que a hipericina interage com os precursores das fibrilas de folhas- β , tendo sido usada para monitorar (in vitro) o aparecimento dos primeiros estados de agregação de peptídeos β -amilóides durante o processo.

Sánchez-Cortés e colaboradores⁵¹ estudaram a interação da hipericina com moléculas de DNA utilizando a espectroscopia Raman e os resultados obtidos demonstram claramente que a hipericina interage com o DNA e que os grupos terminais hidroxila e carbonila estão diretamente envolvidos nessa interação.

A hipericina utilizada nesse trabalho foi sintetizada pelo grupo de pesquisa do professor Anderson Orzari Ribeiro da UFABC, no laboratório de compostos bioativos (LACOMB), utilizando procedimento já descrito na literatura.^{52, 53}

1.3.2. Ftalocianina de zinco

Ftalocianinas (Pc) são uma classe de compostos de origem sintética de elevada massa molecular e que podem conter no interior de seu macrociclo diferentes metais. Apresentam características atraentes como estabilidade química e térmica e eficiência na transferência de eletrônica.⁵⁴ Sua estrutura molecular (Figura 9-A) é semelhante à das porfirinas, apresentando um macrociclo tetrapirrólico com átomos de nitrogênio ligando as subunidades

pirrólicas no lugar das pontes de metileno presentes nas porfirinas. A periferia do macrociclo é estendida por anéis benzênicos que aumentam a absorção em comprimentos de onda na região do vermelho do espectro visível, onde sua absorção máxima ocorre em comprimentos de onda maiores do que o das porfirinas. Seu sistema π conjugado, com 18 elétrons, exibe um típico espectro eletrônico (Figura 9-B) com duas bandas de absorção significantes, uma na região do visível entre 614 - 707 nm (banda Q), onde é atribuída à transição $\pi - \pi^*$ (ou seja, a transição eletrônica ocorre do HOMO - Highest Occupied Molecular Orbital - para o LUMO - Lowest unoccupied Molecular Orbital) e outra banda na região UV, entre 275 - 389 nm (banda B), que são observadas devido às transições dos mais profundos níveis de π para o LUMO.⁵⁵

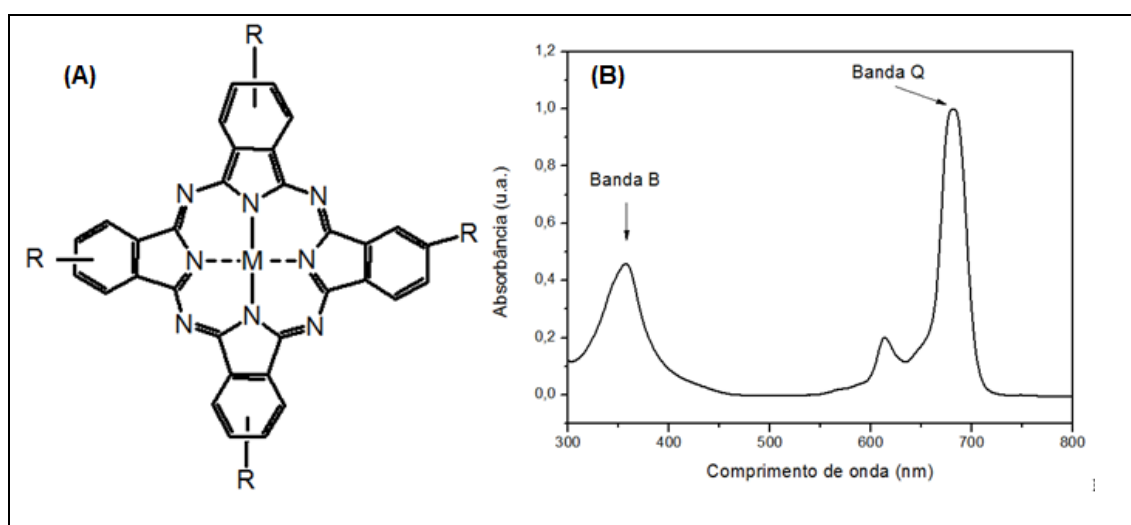


Figura 9. (A) Fórmula estrutural da ftalocianina e (B) espectro de absorção da ftalocianina de zinco em DMSO.

As ftalocianinas são hidrofóbicas e sua complexação com íons metálicos diamagnéticos, tais como Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} dão origem a complexos de ftalocianinas com alto rendimento quântico do estado excitado triplete ($\phi_T > 0,4$)

e com tempos de vida longos.⁵⁶ A síntese da ftalocianina ocorreu por acidente em 1907 por Braun e Tcherniac, quando examinavam algumas propriedades da o-cianobenzamida que, após aquecimento em temperatura elevada, apresentase como uma substância azul.⁵⁷ A primeira ftalocianina metálica foi sintetizada em 1927 por Diesbach e von der Weid, num experimento que consistia em aquecer uma mistura de o-cianobenzamida e cianida de cobre em piridina a 200°C, onde o produto obtido foi a ftalocianina de cobre.⁵⁸

As ftalocianinas são moléculas extremamente modificáveis, o que aumenta a gama de aplicações desse material. Mudanças podem ser efetuadas na região periférica da estrutura ou através da variação do íon metálico, e como consequência algumas propriedades como elétrica e óptica podem ser modificadas. As quatro subdivisões simétricas da molécula podem ser estendidas a partir da adição de diferentes grupos.⁵⁹ A organização dos anéis na escala mesoscópica é outro aspecto importante na determinação do comportamento das ftalocianinas, pois os anéis apresentam grande tendência a formar agregados, onde o tipo de agrupamento mais encontrado é empilhamento π . Esta construção permite a delocalização dos elétrons ao longo do eixo devido a superposição dos orbitais π .⁵⁹

Tendo em vista que essa classe de material não é solúvel em água, algumas formas solúveis de ftalocianinas têm sido preparadas adicionando ácido sulfônico ou ácido carboxílico nas posições periféricas dos macrociclos, evitando assim a sua agregação em meio aquoso.⁵⁶

As ftalocianinas foram utilizadas durante muito tempo como corante industrial para plásticos, tecidos e couros, devido sua intensa coloração azul. Além disso, Pcs são semicondutores do tipo p, e podem ser aplicadas em células

fotovoltaicas, transistores orgânicos, sensores de gás, entre outros dispositivos.

⁶⁰ No campo da Biologia, as ftalocianinas têm sido empregadas como agente fotossensibilizador, onde as ftalocianinas de zinco (Zn^{+2}) apresentam as propriedades fotofísicas mais favoráveis para aplicação em terapia fotodinâmica devido à elevada seletividade pelo alvo tumoral e sua eficiente geração de oxigênio singleto. ⁶¹

Nesse trabalho, foram utilizadas quatro diferentes ftalocianinas de zinco, já descritas na literatura. ⁶² As ftalocianinas obtidas apresentam grupos glicerol protegido, conhecido comercialmente como grupo solketal, nas regiões periféricas do anel conforme ilustrado na Figura 10. Esse grupo foi adicionado a fim de proporcionar, possivelmente, solubilidade da estrutura em água.

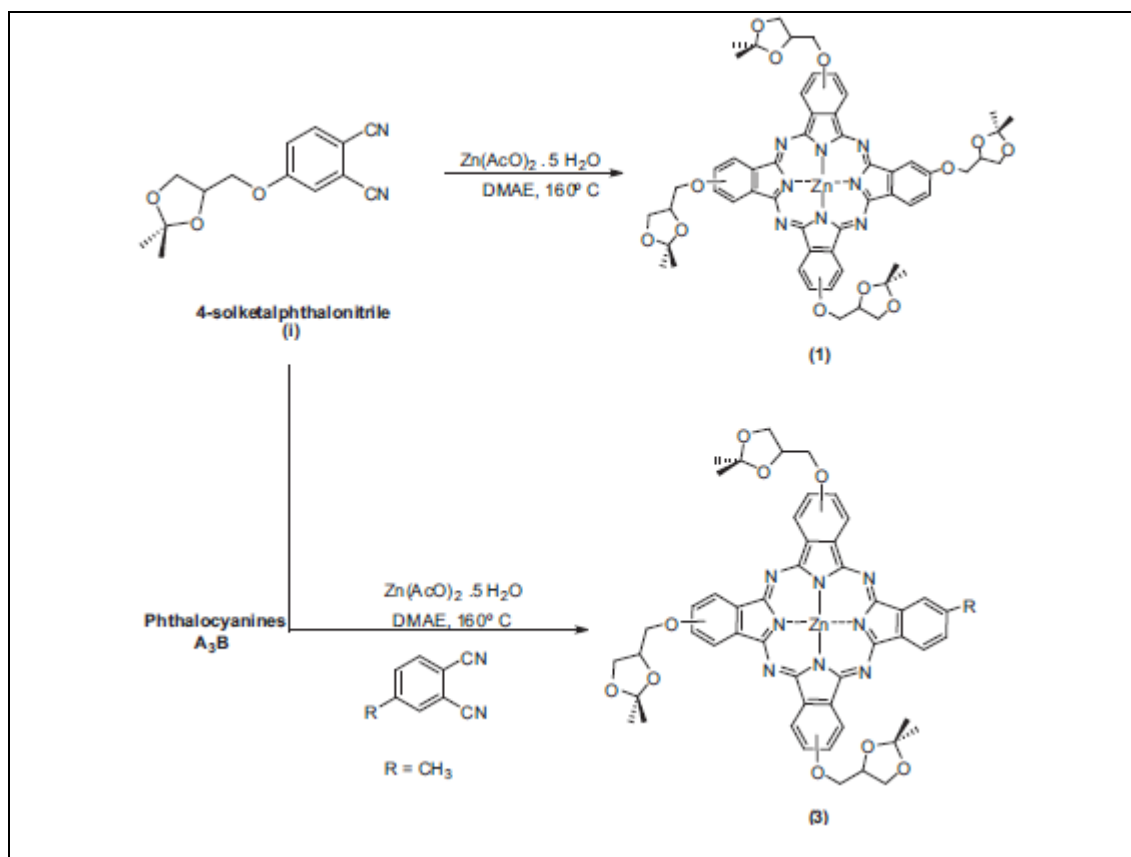


Figura 10. Esquema da rota de síntese das ftalocianinas utilizadas nesse trabalho. (adaptada) ⁶²

As ftalocianinas de zinco utilizadas nesse trabalho para a conjugação com os MNTs-FF foram também sintetizadas pelo grupo do professor Anderson Orzari Ribeiro no LACOMB.

2. Objetivos

2.1. Gerais

Este trabalho apresenta como objetivo geral a síntese e caracterização de micro/nanotubos de L,L-difenilalanina conjugados com diferentes moléculas fotossensibilizadoras de interesse em terapia fotodinâmica, em particular, a hipericina e ftalocianinas de zinco.

2.2. Específicos

- Sintetizar os micro/nanotubos conjugados com fotossensibilizadores e caracteriza-los utilizando técnicas de microscopia (óptica, MEV e AFM) e técnicas de espectroscopia de fluorescência, absorção, FTIR e DRX;
- Expandir trabalho realizado anteriormente no âmbito do mestrado, investigando sistematicamente os efeitos da organização estrutural dos micro/nanotubos de L,L-difenilalanina, na fase hexagonal e ortorrômbica sobre as propriedades fotofísicas da hipericina;
- Avaliar a fotocitotoxicidade dos MNTs-FF contendo ftalocianina de zinco (ZnPc3) em células tumorais mamárias (MCF-7) comparando com resultados obtidos para o FS livre, com ensaios de viabilidade celular e utilizando técnicas de citometria de fluxo, espectroscopia e microscopia de fluorescência.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes e equipamentos

Todos os reagentes usados nos experimentos possuíam pureza analítica. O dipeptídeo L,L-difenilalanina e 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O dimetilsulfóxido (DMSO), clorofórmio e metanol (MeOH) foram obtidos da LabSynth. O álcool 1,1,1,3,3,3- hexafluor-2-propanol (HFP) foi adquirido da Fluka.

Tanto a hipericina quanto as ftalocianinas de zinco foram sintetizadas e fornecidas pelo grupo de pesquisa do professor Anderson Orzari Ribeiro, do Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC e todas as amostras foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

A água utilizada para a síntese dos materiais foi purificada pelo sistema Direct-Q System, da Millipore, com resistividade superior a 18 M Ω .cm⁻¹ (a 25°C).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um equipamento modelo 660 da Varian. Difrátogramas de raios X das amostras em pó dos MNTs-FF conjugados foram obtidos em um difratômetro D8 Discover (Bruker), usando radiação CuK α $\lambda=0,154$ nm, fenda de divergência de 0,6 mm, fenda de espalhamento de 8 mm, detector LynxEye (PSD - *position sensitive detector*), abertura angular de 3 graus (2 θ), varredura contínua, com passo ~ 0,008 graus (2 θ). Espectros Raman foram obtidos no Espectrômetro Raman triplo T64000 (Horiba Jobin-Yvon) com detector CCD 1024x256 – Open-3LD/R e refrigerado termoeletricamente; Laser Verdi G5 (Coherent Inc.) operando em

532,8 (verde) com potência máxima de 5W. Esses equipamentos estão localizados na Central Experimental Multiusuário (CEM) localizada na UFABC.

Medidas de fluorescência foram realizadas utilizando um espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian, com lâmpada de xenônio, (CEM – UFABC). As medidas de tempo de vida de fluorescência (τ) foram realizadas no Instituto de Química da USP, utilizando um equipamento Edimburg Analytical Instruments modelo FL-900, excitação em 350 nm e emissão em 590 nm. Os espectros na região do UV-Vis foram obtidos em um equipamento modelo Cary50 da Varian localizado no Laboratório de Eletroquímica e Materiais Nanoestruturados (LEMN) da UFABC.

Imagens de fluorescência dos MNTs-FF/Hyp foram realizadas em um microscópio confocal de varredura a laser (MCVL), modelo Leica DMIRE, situado no Centro de Pesquisa Paulo Pascal na Universidade de Bourdeaux 1– França. Já as imagens de fluorescência das células tumorais MCF-7 foram obtidas no microscópio de fluorescência Modelo: Leica DMI 6000B (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) localizado no laboratório do professor Tiago Rodrigues na UFABC.

As Microscopias Eletrônicas de Varredura (MEV) foram obtidas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), em Campinas e realizadas sob a proposta de pesquisa (SEM-LV-14754). Microscopia de Força Atômica (AFM, do inglês Atomic Force Microscopy) foi obtida no LNNano com a proposta (AFM-NSIIIa-16137).

Nos ensaios de cultura, foi empregado um leitor de placa de absorvância (Biochrom® Asys Expert Plus) – UFABC. O sistema de irradiação para células Biotable® foi fornecido em colaboração com o grupo de óptica do Instituto de

Física da Universidade de São Paulo – São Carlos (IFSC-USP), sob coordenação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato. A fonte de luz utilizada, chamada de Biotable, é constituída por um conjunto de LEDs com emissão em 660 nm, com intensidade média por área igual a 10 mW cm^{-2} .

3.2. Preparo dos MNTs-FF conjugados com hipericina

Os nanotubos de L,L-difenilalanina contendo hipericina foram preparados via fase líquida em eppendorfs diluindo 3 mg do dipeptídeo L,L-difenilalanina em HFP com concentração de 100 mg mL^{-1} . Uma alíquota da solução de hipericina em metanol previamente preparada em balão volumétrico ($10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foi adicionada à solução anterior e as duas fases foram misturadas por alguns minutos. Em seguida, foi adicionada água Milli-Q, e após 12 horas em repouso obtêm-se os micro/nanotubos de L,L-difenilalanina conjugados com hipericina. Com a formação dos tubos o sobrenadante foi removido e o material obtido foi lavado com água obtendo assim tubos com concentração final de 10 mg mL^{-1} .²⁰ A Figura 11 ilustra esquematicamente a preparação dos micro/nanotubos contendo hipericina.

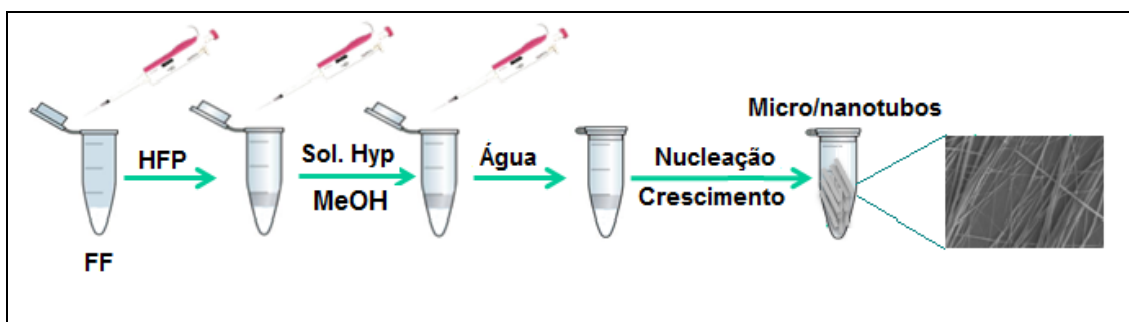


Figura 11. Ilustração do preparo MNTs-FF contendo hipericina.

3.3. Preparo dos MNTs-FF conjugados com ftalocianinas de zinco

De maneira semelhante ao anterior descrito, os micro/nanotubos de L,L-difenilalanina contendo ZnPc foram preparados em eppendorfs diluindo-se 5 mg de FF em HFP com concentração final de 100 mg mL⁻¹. Uma alíquota da solução da ftalocianina de zinco em DMSO previamente preparada foi adicionada à solução alcoólica e as duas fases foram misturadas por alguns minutos. Em seguida foi adicionada água Milli-Q à mistura, obtendo-se assim nanotubos de peptídeos conjugados com ftalocianina de zinco.

3.4. Síntese da hipericina

A hipericina utilizada nesse trabalho foi sintetizada a partir da molécula emodin, onde esse composto foi reduzido na presença de cloreto de estanho di-hidratado (SnCl₂.H₂O), ácido acético (AcOH) e ácido clorídrico (HCl) para obtenção do emodin antrone. Em seguida, foi adicionado t-butóxido e dimetilformamida (DMF). Essa mistura foi colocada em microondas com potência de 150W, temperatura de 155 °C, durante 20 minutos. O produto da reação foi dissolvido em acetona e colocado na presença de uma lâmpada de halogênio com o intuito de se obter a hipericina.⁵²⁻⁵³ As amostras foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3.5. Síntese das ftalocianinas de zinco

As ftalocianinas de zinco utilizadas para a conjugação com MNTs-FF foram obtidas a partir da ciclotetramerização dos precursores 4-solketalftalonitrilo, 4-metilftalonitrilo e ftalonitrilo, sendo os dois últimos obtidos comercialmente. As ftalocianinas obtidas apresentam grupos glicerol protegido, nas regiões periféricas do anel e, para remover o grupo acetal e se obter ftalocianinas com grupos glicerol desprotegidos, foi adicionado ácido acético (solução 80%) ao composto 1 e 3 à temperatura ambiente e agitado por 24 horas, resultando na precipitação e isolamento do composto 2 e 4 (estruturas dos compostos vide página x).⁶²

3.6. Preparação das amostras para análises

a. Difração de Raios X e Microscopia óptica

As amostras foram depositadas em uma superfície de vidro e secas em estufa a vácuo.

b. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram depositadas em uma superfície metálica (placa de cobre) e em seguida uma fina camada de ouro foi depositada na superfície da amostra, pois a mesma não é condutora.

c. Microscopia de força atômica

As amostras foram depositadas em uma placa de mica clivada e secas a vácuo.

3.7. Simulação computacional

As simulações foram realizadas pelo Professor Eudes Eterno Fileti (UNIFESP-São José dos Campos). A célula computacional consistiu de três unidades de tubos sobrepostas com um comprimento de 5,46 nm (10 hexâmeros), levando a uma área de superfície de 5,46 x 7,64 nm². Este sistema foi colocado em uma caixa com 8,40 nm de altura contendo Hyp/Água. As simulações foram realizadas utilizando GROMACS versão 4.5 e o campo de força Charmm27 foi empregado para descrever as interações dos nanotubos de FF e as moléculas de Hyp. O potencial de interação da molécula da água foi descrito usando modelo TIP3P. O sistema foi investigado utilizando condições normais de temperatura e pressão.

3.8. Método indireto da caracterização de oxigênio singlete

A geração de oxigênio singlete por um fotossensibilizador pode ser caracterizado por um método indireto utilizando uma sonda. A molécula DPBF, (Figura 12-A), foi escolhida por possuir uma reação específica com o oxigênio singlete, produzido por meio da excitação do fotossensibilizador, formando assim um endoperóxido, (Figura 12-B), que se decompõe rapidamente em 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB), incolor em 350 – 450 nm, (Figura 12-C).⁶³⁻⁶⁴ Assim, essa reação pode ser monitorada espectrofotometricamente pelo desaparecimento da banda de absorção característica, em torno de 417 nm, da sonda DPBF, uma vez que a espécie formada não absorve nessa região do espectro.

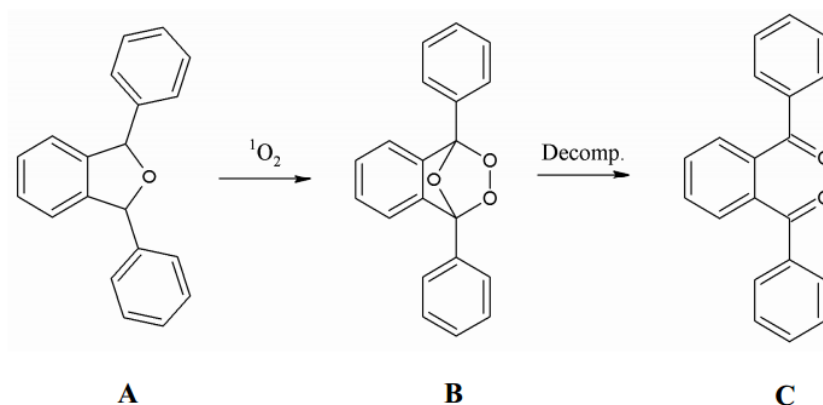


Figura 12. Degradação do DPBF (A) via reação com oxigênio singlete, com formação do endoperóxido (B) e consequente formação do produto incolor DBB (C).⁶⁵

3.9. Cultura celular

A linhagem de células tumorais mamárias, MCF-7, foi adquirida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em frascos de cultura utilizando meio RPMI suplementado com 10 – 20% de soro fetal bovino (SFB), crescimento de 72h e técnicas padrões de tripsinização. As células foram mantidas em estufa incubadora a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 .

3.10. Incubação com o fotossensibilizador

A incubação das células com as ftalocianinas de zinco ocorreu por 2 horas, na presença de 2% SFB, para evitar agregação das ZnPcs. As células foram lavadas duas vezes em solução PBS e irradiadas por 10 minutos a 660 nm com o equipamento Biotable®. Após irradiação, houve troca do meio PBS para meio de cultivo RPMI e as células voltaram às condições normais de cultivo. Apenas após 24 horas da irradiação, a viabilidade foi testada.

3.11. Viabilidade celular

Os testes de viabilidade celular ocorreram por vermelho neutro (NR, do inglês *Neutral Red*, hidrocloreto de [3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina]). O vermelho neutro é um marcador catiônico capaz de internalizar membranas biológicas através de difusão passiva não iônica e se direcionar para organela lisossomal. A internalização deste corante depende da capacidade celular em manter o gradiente de pH, através da produção de trifosfato de adenosina (ATP).

Em pH fisiológico, o corante apresenta carga líquida próxima a zero, permitindo sua internalização através da membrana celular. Dentro dos lisossomos, o gradiente de prótons para manter o pH menor que o citosólico, torna a molécula do corante carregada a qual é retida no interior da organela digestiva, através de ligações hidrofóbicas eletrostáticas à matriz lisossomal.⁶⁶

Após tratamento de irradiação descrito no item acima, as células foram lavadas com PBS e 0,1 mL de vermelho neutro a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ preparados em RPMI sem SFB foram adicionados a cada poço (a solução de vermelho neutro foi previamente filtrada para remover cristais do corante precipitados). Decorridas 3 horas de incubação com o corante nas mesmas condições de cultivo celular, o meio foi removido e as células lavadas 1X com PBS, 0,1 mL de solução de fixação (3% formaldeído, 1% CaCl_2) e 0,1 mL da solução de extração (1 % ácido acético glacial em etanol). As células foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação leve em agitador de placas. A absorbância final do experimento foi obtida no comprimento de onda 540 nm. A porcentagem de viabilidade celular (média de três experimentos) foi baseada na absorbância das células controle (sem compostos FS).

3.12. Microscopia de fluorescência

Os ensaios de fluorescência foram feitos com as células tumorais MCF-7 ($7,5 \times 10^4$ células/poço) em placas específicas contendo lamínula de vidro e divididas em quatro compartimentos. As amostras de controle (células sem tratamento), com MNTs-FF ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$), ftalocianina de zinco ($0,72 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) e MNTs-FF/ZnPc3 ($0,3 \text{ mg mL}^{-1}$), foram incubadas por 2 horas em meio de cultura (DMEM) Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 2% SFB, sob condições normais de cultivo celular. Após período de incubação, as células foram lavadas com solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio (CMF-BSS). As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência utilizando tampão de fluorescência ($1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de CaCl_2 , 130 mmol L^{-1} de NaCl , $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de KCl , $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de MgSO_4 , 1 mmol L^{-1} de Na_2HPO_4 , 25 mmol L^{-1} de glicose, 2 mmol L^{-1} de Hepes, $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de NaHCO_3 , pH 7,3), filtro Y5 em 675 nm e exposição de 20x e 63x, conforme indicado nas figuras.

3.13. Análise de marcação simultânea com anexina V-FITC/Iodeto de propídeo por citometria de fluxo

Para a avaliação da morte celular foi utilizado marcação com anexina V-FITC (permite a detecção de apoptose) e com Iodeto de propídeo (PI) (permite a detecção de necrose). Cabe esclarecimento quanto à diferenciação dos estágios de apoptose e necrose celular e a nomenclatura usada na sua identificação: *Apoptose recente* (An^+/PI^-) e *apoptose* (An^+/PI^+), as células no estágio *apoptose* têm dois sinalizadores de morte marcados: a fosfatidil serina (PS), que corresponde a fosfolipídio da membrana interna que é internalizado

através de movimento *flip flop*, se posiciona na membrana celular externa para que macrófagos reconheçam a célula que está em processo de morte, evitando assim um processo inflamatório e extravasamento do conteúdo intracelular. A outra marcação corresponde ao DNA corado por iodeto de propídeo. Esta marcação nuclear ocorre em células que estão em processo de necrose, uma vez que se tornam permeáveis a este tipo de corante. *Necrose* (An^-/PI^+) e células vivas (An^-/PI^-).

As células MCF-7 (6×10^5 células/poço) foram incubadas em placas de 24 poços com meio de cultura DMEM *high glucose* + 10% SFB por 24 horas em estufa com 5% de CO_2 a $37^\circ C$. Após este período de adesão celular, o ensaio de irradiação ocorreu em amostras contendo MNTs-FF, ZnPc3 e MNTs-FF/ZnPc3 na concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de MNTs-FF e $0,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ZnPc3. Após incubação de 2 horas contendo as amostras relatadas acima em meio DMEM + 2% SFB, em condições de cultivo celular 5% de CO_2 a $37^\circ C$, as células foram lavadas com solução CMF-BSS e irradiadas por 10 minutos (em CMF-BSS), a 10 cm da fonte de luz Biotable[®] 660 nm. O ensaio foi feito em duplicata e no escuro, ou seja, sem irradiação, para efeito comparativo. Após irradiação, o meio CMF-BSS foi substituído por meio de cultura e as células submetidas as condições normais de cultivo celular; o ensaio de citometria iniciou 24 horas após tratamento de irradiação. O meio de cultura foi então retirado e transferido para eppendorfs de 2mL. Os poços foram lavados com 100 μ L de CMF-BSS e transferidos para o eppendorf de 2mL. Foram adicionados 200 μ L de tripsina durante 5 minutos, 400 μ L de DMEM *high glucose* + 10% SFB e então foi feita a transferência para o eppendorf de 2 mL. As amostras foram centrifugadas a 700 g por 6 minutos e o precipitado foi ressuspendido em 50 μ L de tampão Anexina

(Hepes 0,1 mol L⁻¹, NaCl 1,4 mol L⁻¹, CaCl₂ 2,5 mol L⁻¹) e foram adicionados 3μL de solução de Anexina V-FITC e 3μL de solução de iodeto de propídeo. A reação foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e sob abrigo de luz. Em seguida, foram adicionados 200μL de tampão Anexina. A intensidade de fluorescência (FITC e PI) foi avaliada utilizando o equipamento FACS Canto II (BD, Bioscience, Bencton Dickinson, USA) e os dados coletados foram avaliados através do software FACSDiva e Flow Jo (Tree Star, Inc., USA).

4. Resultados e Discussão

Os resultados deste trabalho serão apresentados em duas partes. A primeira aborda o estudo dos conjugados dos MNTs-FF com hipericina, sua caracterização morfológica, estrutural e fotofísica. A atividade foi testada utilizando método indireto para avaliar o desempenho fotodinâmico da Hyp e seus conjugados com MNTs-FF. Além disso, foram comparados os resultados obtidos nas duas fases da FF (hexagonal e ortorrômbica).

A segunda parte discute os resultados obtidos com as amostras MNTs-FF com ftalocianinas de zinco, a caracterização das amostras obtidas e os ensaios celulares.

4.1. Micro/Nanotubos de L,L-difenilalanina contendo hipericina

4.1.1. Caracterização Morfológica e Estrutural

Os conjugados de micro/nanotubos de L,L-difenilalanina com hipericina foram caracterizados por microscopia óptica, eletrônica e força atômica. Utilizando a microscopia confocal, foi possível investigar em detalhe, e de maneira combinada, morfologia e fluorescência do material obtido. Na Figura 13-A, apresentamos a imagem de um único microtubo onde é possível visualizar subunidades também tubulares que se unem para formar a estrutura maior (vide Figura 5), enquanto, na Figura 13-B, é exibida a fluorescência do mesmo microtubo. Observa-se a partir desse par de imagens que a funcionalização foi homogênea, uma vez que a fluorescência é uniforme ao longo do material e não é visível a formação de agregados na superfície do mesmo. Imagens de MEV,

Figura 13-C, revelam ainda que é possível obter materiais com diferentes diâmetros, desde nanotubos até microtubos, corroborando com dados da literatura ²⁷ que apontam que a automontagem desses materiais em solução é bastante complexa, com alta polidispersão em tamanho. Portanto, é de se esperar que ocorram também grandes variações da área interfacial entre Hyp e MNTs-FF, um fator que deve ser considerado no desenvolvimento desses conjugados.

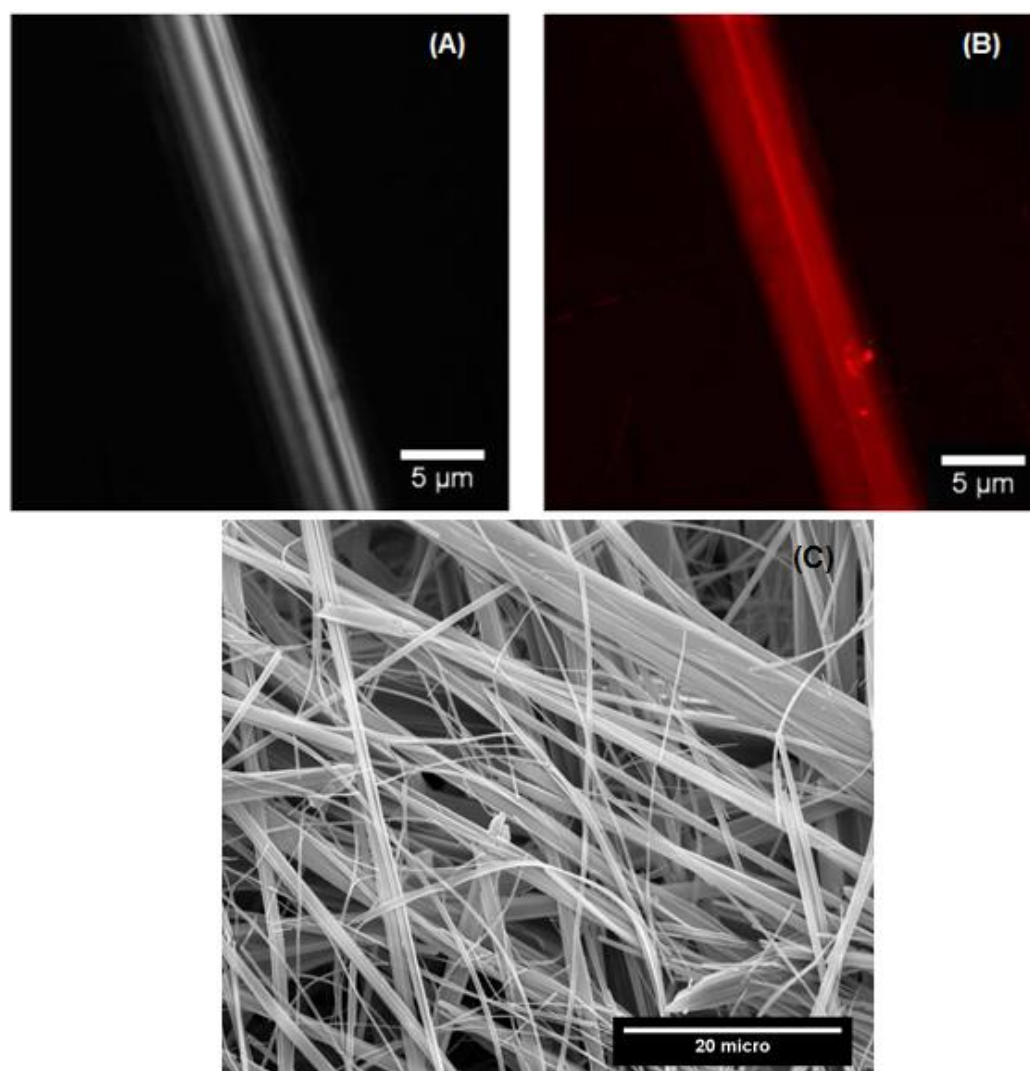


Figura 13. (A) Microscopia Confocal de um único MNTs-FF contendo hipericina, (B) Microscopia de fluorescência do mesmo MNTs-FF com $\lambda_{ex} = 543\text{nm}$ e (C) Imagem de MEV dos MNTs-FF contendo hipericina (concentração de Hyp = $2.85 \mu\text{mol L}^{-1}$). ⁶⁷

Além disso, trabalho anteriormente publicado mostra que a hipericina inibe ou interrompe a agregação dos peptídeos, pois quanto maior a concentração de hipericina durante a automontagem da FF menor o diâmetro do tubo (Figura 14).⁶⁸

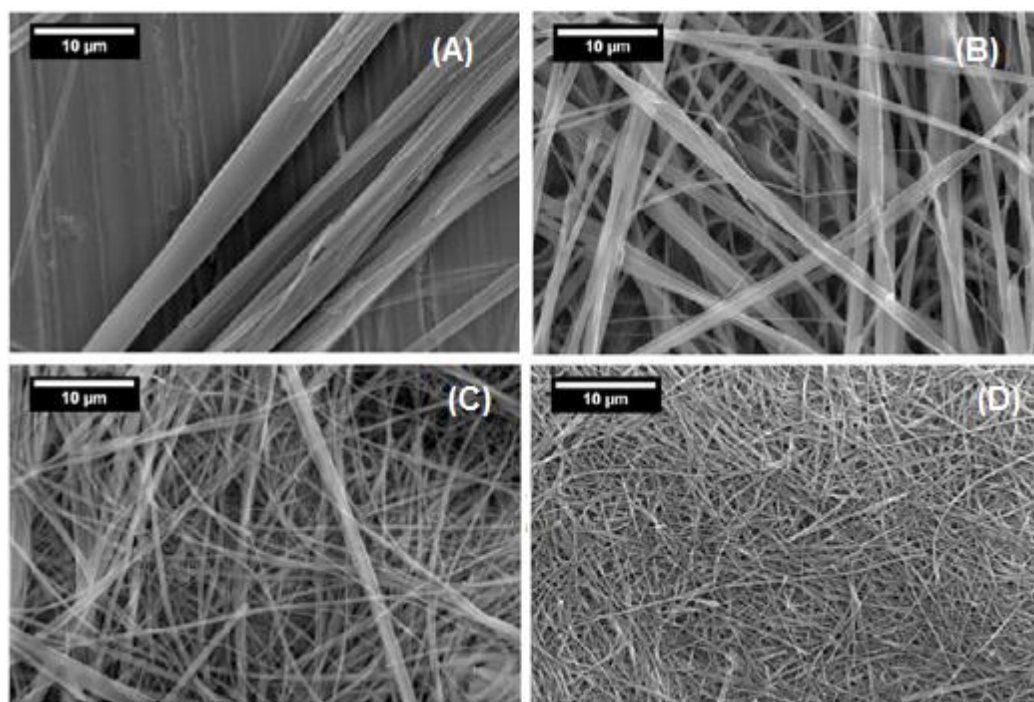


Figura 14. Imagens de MEV dos MNTs-FF com concentração de Hyp de (A) 0,7, (B) 2,1, (C) 4,2 e (D) 6,0. $\mu\text{mol L}^{-1}$.⁶⁸

O diâmetro médio dos tubos foi obtido a partir da estatística de mais de 100 contagens em imagens de MEV dos conjugados MNT-FF/Hyp e é exibido em função da concentração de hipericina (Figura 15). Usando essa relação empírica observa-se que o diâmetro médio dos tubos varia de 290 nm em altas concentrações de Hyp, indicando que a concentração de fluoróforo é um parâmetro que influencia diretamente o diâmetro médio das estruturas.

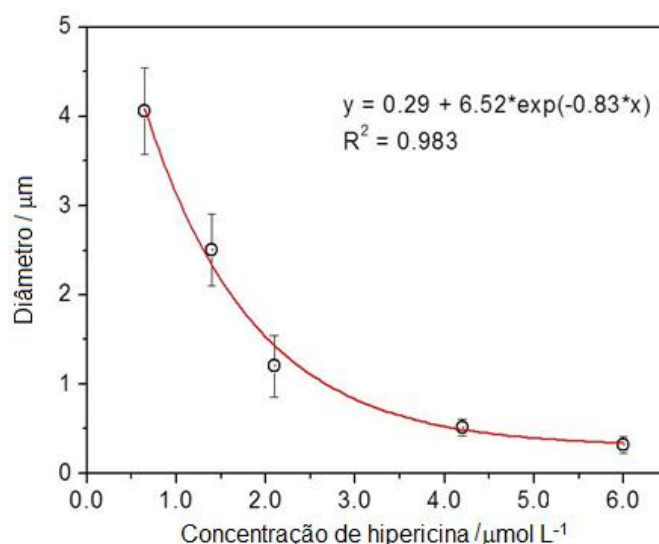


Figura 15. Correlação entre o diâmetro médio dos tubos e a concentração de hipericina.⁶⁸

Para obter mais detalhes sobre a superfície do tubo funcionalizado com hipericina, foram feitas imagens de AFM em modo de contato intermitente. Este modo se baseia no fato da ponta oscilar e tocar a amostra regularmente. Assim tem-se a vantagem de danificar menos a amostra e elimina a contribuição de forças laterais na imagem topográfica. A Figura 16 mostra imagens de AFM obtidas a partir de microtubos de FF contendo Hyp. A amostra foi preparada e adicionada sobre lamina de mica e seca a vácuo por pelo menos 12 horas antes dos ensaios. Na Figura 16-A, observa-se uma imagem de contraste de fase onde as regiões onde ocorreu adsorção de Hyp aparecem em cores escuras (negativo e próximo à zero, mudança de fase), enquanto as áreas livres de fluoróforo aparecem mais claras (valores de fase positivos). A imagem de topografia, Figura 16-B, mostra a ausência de aglomerados de hipericina na superfície do tubo, provavelmente devido à grande afinidade entre a superfície altamente hidrofóbica dos peptídeos e os grupos poliaromáticos do fluoróforo. A

reconstrução tridimensional, Figura 16-C, apresenta em detalhe a topologia, enquanto um perfil de secção transversal indicado em B mostra a altura do tubo, Figura 16-D.⁶⁸

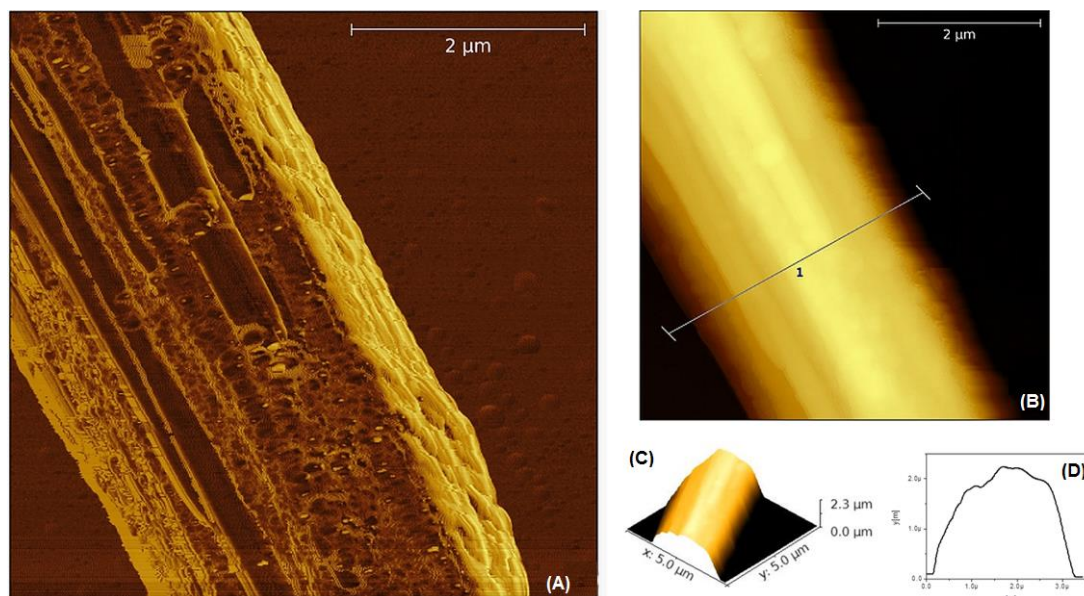


Figura 16. Imagens de AFM de um microtubo de L,L-difenilalanina funcionalizado com hipericina. (A) Imagem de contraste de fase do conjugado MNTs-FF / Hyp, indicando áreas com composições diferentes. (B) Imagem de topografia mostrando a ausência de aglomerados de hipericina. (C) e (D) reconstrução 3-D. da imagem exibida em (B) e perfil ao longo da secção transversal indicada em (B).⁶⁸

Em trabalhos recentes, investigamos em detalhe conjugados MNTs-FF funcionalizados com hipericina.⁶⁸⁻⁶⁷ Quando preparados em meio aquoso, esses sistemas apresentam a mesma estrutura cristalina hexagonal dos MNTs-FF com grupo espacial $P6_1$. Após tratamento térmico (150°C), os conjugados exibem transição de fase para ortorrômbica, a qual foi identificada como pertencente ao grupo espacial $P22_12_1$. Na Figura 17, são exibidos difratogramas desses conjugados, mostrando o refinamento de Rietveld tendo em conta o grupo espacial ortorrômbico $P22_12_1$ apresentado por Gdaniec e Liberek,⁶⁹ onde os

parâmetros refinados da célula unitária e fatores estatísticos foram os seguintes:

$a = 6,185(1) \text{ \AA}$, $b = 10,397(2) \text{ \AA}$, $c = 23,786(3) \text{ \AA}$, $V = 1529,6(5) \text{ \AA}^3$, $R_{wp} = 1,272\%$

$R_p = 1,023\%$, $R_{Bragg} = 0,171\%$ and $\chi^2 = 0,866$.

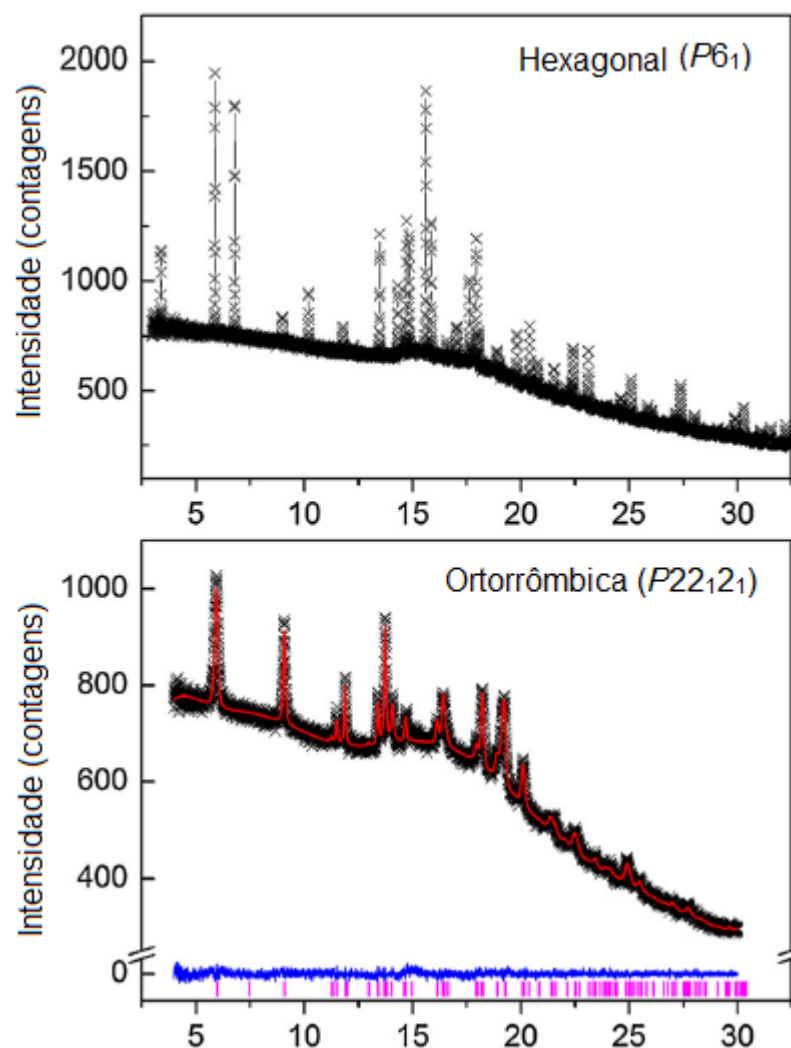


Figura 17. DRX dos MNTs-FF/Hyp antes (superior) e após tratamento térmico a 150°C (preto). Preto indicam o padrão observado, enquanto que a linha vermelha indica a calculada. A linha azul demonstra a diferença entre os observados e calculados de dados. As barras de magenta na parte inferior indicam as reflexões de Bragg da fase ortorrômbica ($P22_12_1$).⁶⁷

Os MNTs-FF conjugados com Hyp na fase ortorrômbica também foram investigados por microscopia óptica e eletrônica a fim de comparar possíveis

mudanças na morfologia do material. Empregando a microscopia confocal, observamos que, após a transformação de fase, não ocorre mudança na morfologia. Assim, o aspecto geral das estruturas permanece com a mesma morfologia tubular, Figura 18-A.

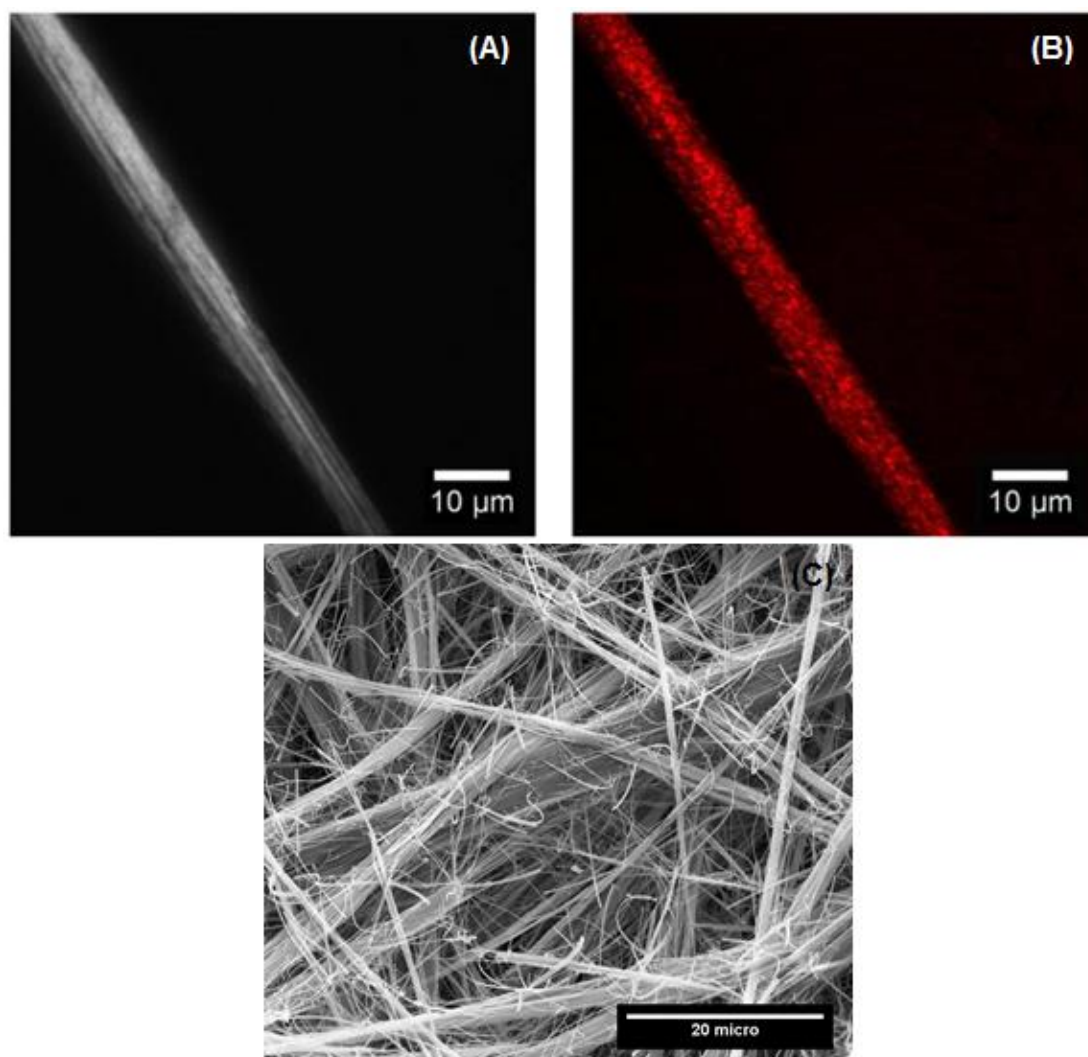


Figura 18. Conjugados MNTs-FF/hipericina após tratamento térmico e transição cristalina para fase ortorrômbica. (A) Microscopia Confocal de um único MNTs-FF contendo hipericina, (B) Microscopia de fluorescência do mesmo MNTs-FF com $\lambda_{\text{ex}} = 543\text{nm}$ e (C) Imagem de MEV dos MNTs-FF contendo hipericina (concentração de Hyp = $2,85 \mu\text{mol L}^{-1}$).⁶⁷

Na Figura 18-B, pode-se averiguar que mesmo após o tratamento térmico, a hipericina permanece uniformemente distribuída ao longo da estrutura. Porém, uma diferença visível entre as estruturas nas fases hexagonal e ortorrômbica é que, na primeira (Figura 13-B), a hipericina se distribui de modo suave na superfície do tubo formando uma camada lisa. Já na fase ortorrômbica, a superfície apresenta maior rugosidade, (Figura 18-B), com a formação de “clusters”. Imagens de MEV revelam que a amostra submetida a tratamento térmico apresenta grande quantidade de filamentos de peptídeos, presumivelmente nanofios das microestruturas (Figura 18-C). O emaranhamento destas sub-unidades pode estar na origem do aumento da rugosidade da superfície das estruturas. Além disso, esse fenômeno pode estar relacionado com a interação entre o feixe de elétrons do microscópio e da estrutura, como observado anteriormente por Amdursky em nanotubos de peptídeo.^{25b}

Por meio de ensaios de dinâmica molecular, foi possível analisar as propriedades estruturais da hipericina em solução na superfície do nanotubo. Foram analisadas as propriedades estruturais e dinâmicas das soluções aquosas contendo nanotubos após 20 ns de simulações. Pelo fato da hipericina ser um composto poliaromático, ocorrem interações significativas de empilhamento π , e esta interação é responsável pelo padrão de agregação observado no ambiente aquoso, em que as moléculas de hipericina precipitam em cadeias longas e são depositadas sobre a superfície do tubo, como mostrado a Figura 19. Esses dados corroboram com as imagens de AFM e microscopia confocal onde foi possível observar que a hipericina não forma agregados na superfície dos tubos, e isso se deve a esse padrão de empacotamento.⁶⁸

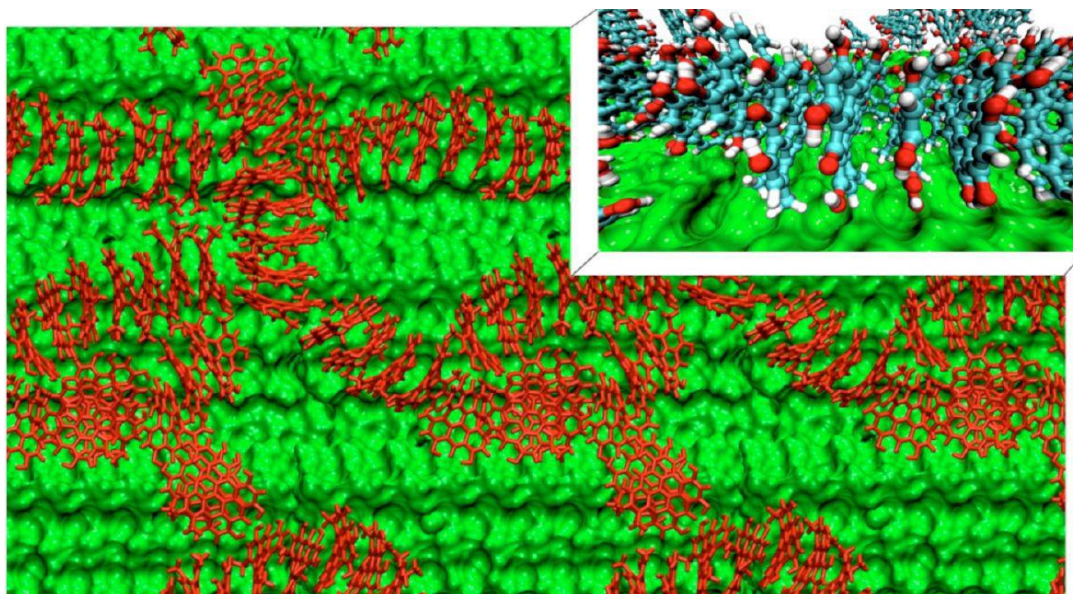


Figura 19. Vista perpendicular (planos XY) mostrando o padrão de empilhamento das moléculas de hipericina adsorvidas na superfície do nanotubos. Em destaque, uma visão ampliada da superfície do nanotubos (em verde) e as interações entre as moléculas de hipericina e do nanotubos peptídico.⁶⁸

A distribuição de densidade de massa para os componentes do sistema (nanotubo de FF, hipericina e água) foi calculada em ambas as fases (hexagonal e ortorrômbica) e, por meio da Figura 20, é possível averiguar que a água tem maior interação com a superfície do nanotubo na fase ortorrômbica, pois nessa fase o tubo apresenta uma superfície mais hidrofílica fazendo com que a hipericina forme agregados, diminuindo assim a geração de ROS (*quenching*). Já na fase hexagonal a hipericina tem maior afinidade com a superfície do tubo, por isso a difusão lateral da água nesse caso é maior.

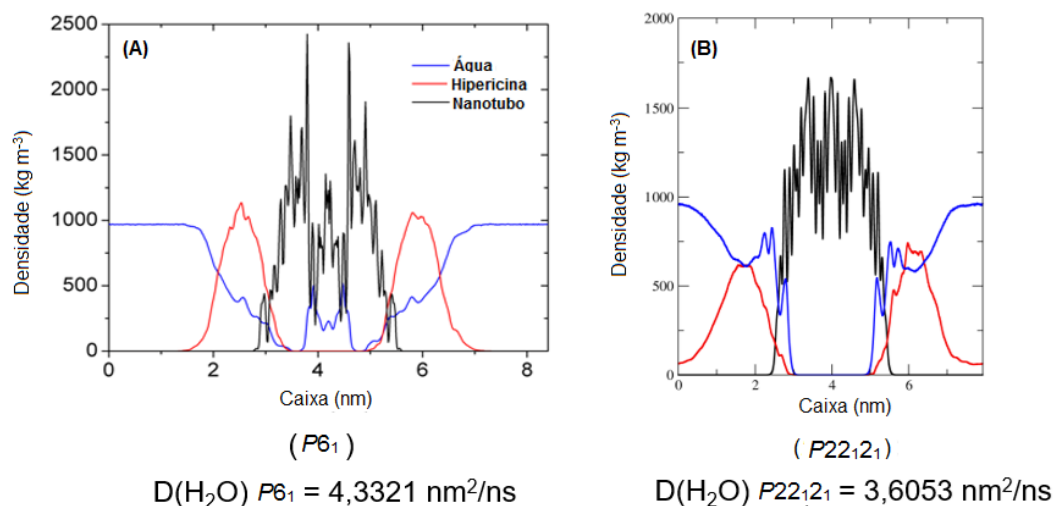


Figura 20. Distribuição de densidade de massa (kg m^{-3}) calculada para os componentes do sistema e o valor da difusão lateral da água em MNTs-FF na fase hexagonal (A) e fase ortorrômbica (B). ⁶⁸⁻⁶⁷ (adaptada)

4.1.2. Caracterização fotofísica

Inicialmente, apresentamos o espectro de absorção da hipericina e dos conjugados MNTs-FF /Hyp nas duas fases cristalinas, em DMSO (Figura 21-A). O espectro característico da molécula de hipericina apresenta uma banda intensa no intervalo entre 530 – 600 nm (Banda Q) e na Figura abaixo é possível observar que não ocorre deslocamentos ou mudanças significativas no espectro da Hyp após a conjugação com MNTs-FF em ambas as fases. Também são mostrados na (Figura 21-B) os espectros de emissão de fluorescência da Hyp e dos conjugados MNTs-FF/Hyp em ambas as fases.

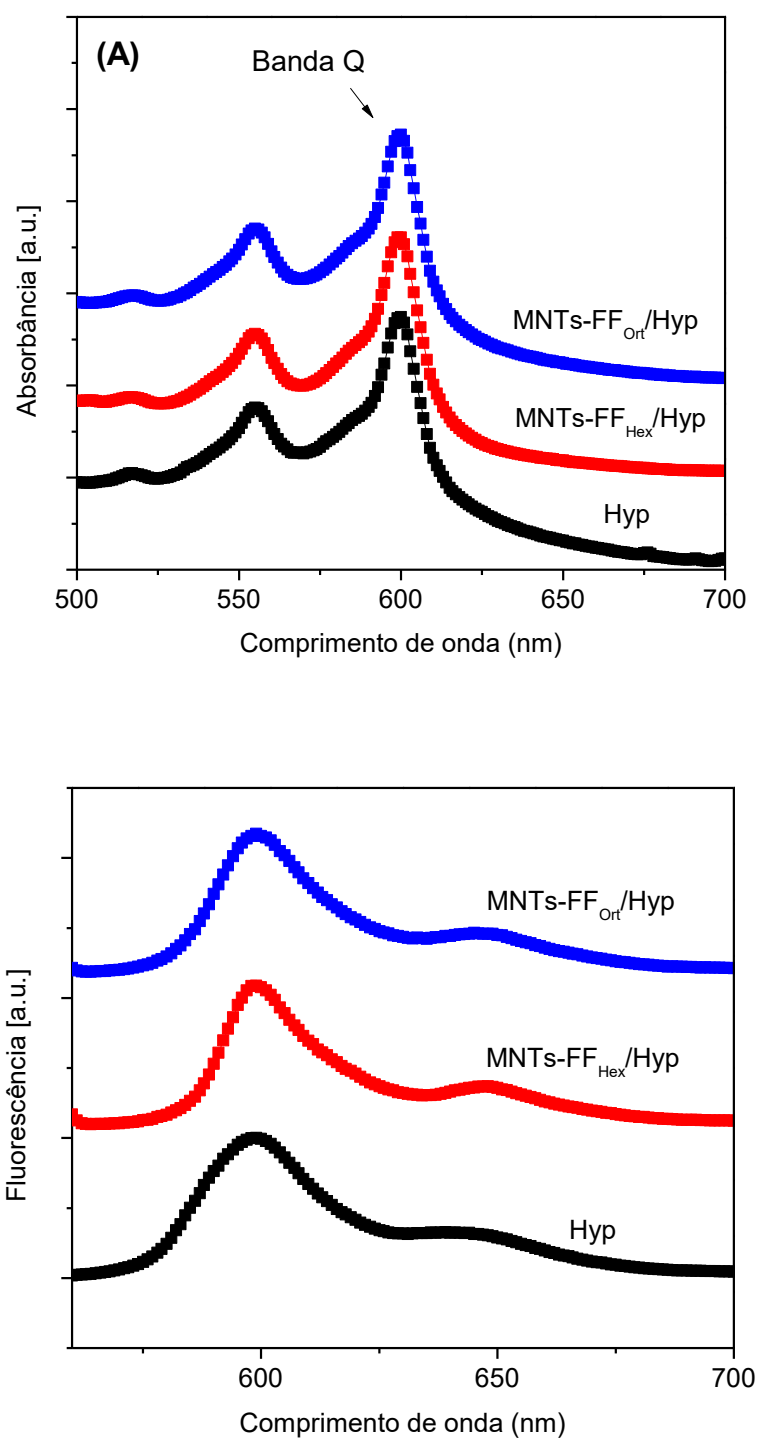


Figura 21. (A) Espectro de absorção e (B) espectro de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}}= 550\text{nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=560 \text{ nm}$) da Hyp livre (preto), MNTs-FF_{hex} / Hyp (vermelho) e MNTs-FF_{ort} / Hyp (azul).

Para avaliar as propriedades fotodinâmica dos conjugados MNTs-FF com Hyp, foi utilizado um método indireto de geração de ROS empregando a molécula de DPBF. O substrato DPBF (Figura 12), foi escolhido por possuir uma reação específica com o oxigênio singlete, produzido por meio da excitação da hipericina ($\lambda_{\text{ex}} = 590 \text{ nm}$), formando assim um endoperóxido, incolor que se decompõe rapidamente em 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB), incolor em 350 – 450 nm.⁶³⁻⁶⁴

A molécula de DPBF apresenta absorção máxima em torno de 417 nm. Nessa faixa do espectro eletrônico, foi feito o monitoramento da degradação do DPBF, permitindo assim medir a cinética da produção de ROS. Três amostras foram estudadas: uma contendo Hyp livre, e outras duas contendo os conjugados MNTs-FF com Hyp, uma na fase hexagonal (MNTs-FF_(hex) / Hyp) e outra na fase ortorrômbica (MNTs-FF_(ort) / Hyp). Todas as amostras foram preparadas em DMSO contendo a mesma concentração de Hyp.

Para a coleta de dados, foi utilizado um LED com λ de 590 nm e um agitador magnético, ambos acoplado ao suporte da cubeta do equipamento espectrofotômetro. O LED foi usado para promover a excitação da Hyp, e consequentemente produzir ROS para degradar o DPBF, e o agitador foi utilizado a fim de manter a amostra homogênea. Na cubeta, foram adicionados 3 mL da amostra e 50 μL da solução de DPBF em DMSO (concentração $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida, foram registrados 30 perfis de absorbância (uma varredura a cada 20 segundos) no alcance de 300 a 500 nm, conforme esquema da Figura 22.

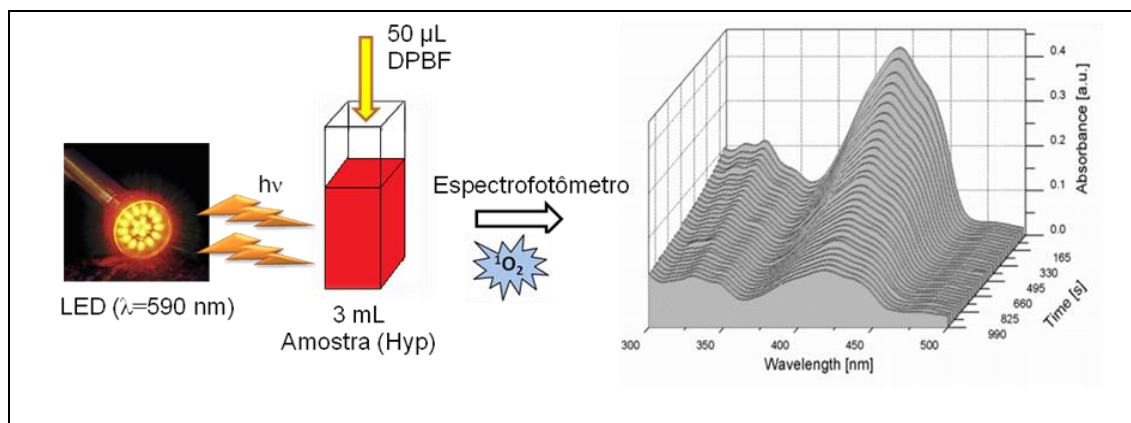


Figura 22. Resumo esquemático do aumento de performance fotofísica nos conjugados com diferentes estruturas.

Onze amostras foram preparadas para cada sistema (Hyp pura, MNTs-FF_(hex)/Hyp e MNTs-FF_(ort)/Hyp), cujas concentrações de Hyp utilizada são representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de Hyp nas amostras estudadas.

Amostra	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Amostra	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
1	0,276	7	2,85
2	0,524	8	3,79
3	0,994	9	4,36
4	1,24	10	5,18
5	1,89	11	5,69
6	2,62		

Para cada amostra, foi levantada a evolução no tempo da absorbância em 417 nm (máximo) para descrever a cinética. As curvas decorrentes deste procedimento realizado para a amostra 11 é mostrada na Figura 23.

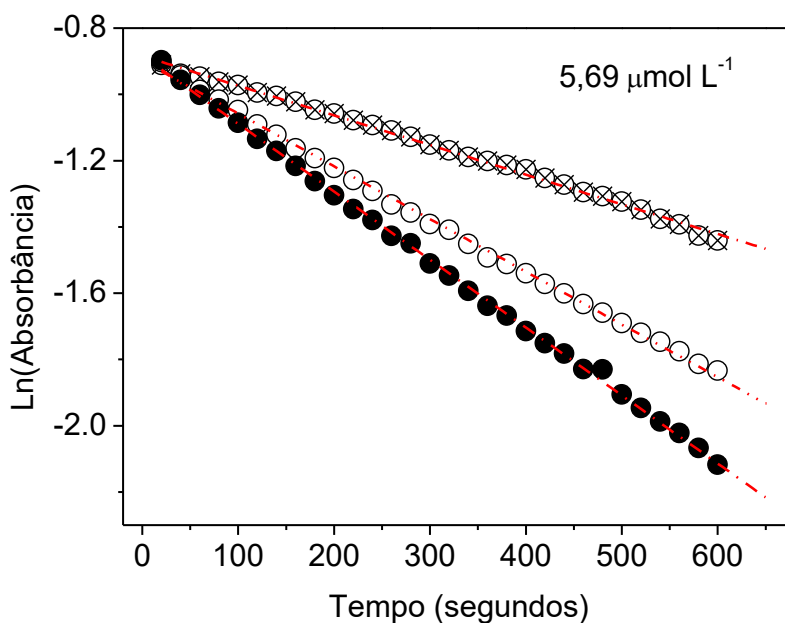


Figura 23. Taxas de decaimento representativas da absorção temporal do DPBF em 417 nm. Círculos com X amostras Hyp pura, círculos abertos MNTs-FF_(ort) / Hyp e círculos fechados MNTs-FF_(hex) / Hyp (todas as amostras com concentração de 5,69 mmol L⁻¹ de Hyp).

Para calcular as constantes cinéticas da geração de ROS a partir desses dados, primeiro linearizamos o decaimento da absorbância no tempo levantando curvas de Ln(Abs) x tempo. Em seguida, obtivemos ajustes lineares sobre essas curvas e traçamos os valores de $-\Delta \text{Ln}(\text{Abs})/\Delta t$ em função da concentração de Hyp, para estimar a taxa de degradação do DPBF (Figura 24).

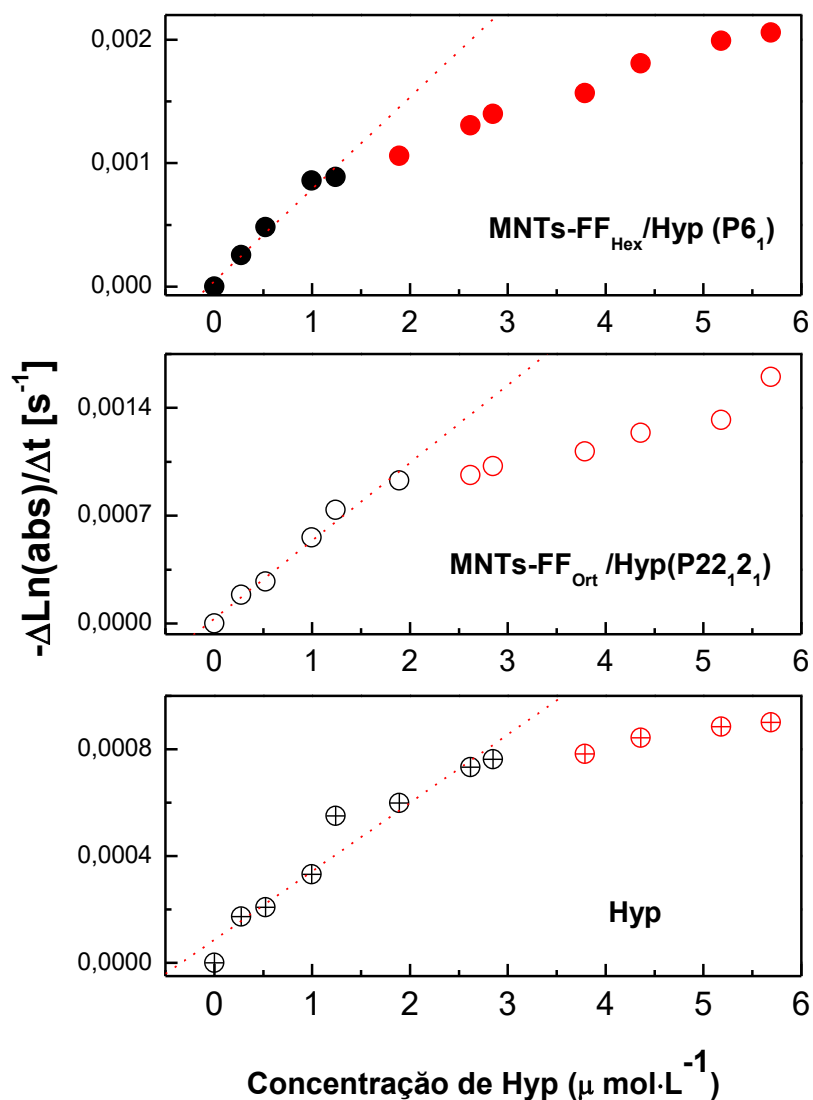


Figura 24. Taxas de degradação do DPBF em função da concentração de Hyp comparando conjugados MNTs-FF/Hyp nas fases hexagonal e ortorrômbica com o desempenho observado apenas em presença de hipericina.⁶⁷

As estimativas de constantes cinéticas, k , foram obtidas por meio da realização de ajustes sobre a região linear dos dados de $-\Delta \text{Ln}(\text{Abs})/\Delta t \times [\text{Hyp}]$, obtendo-se $k_{\text{hex}} = 7,4 \pm 0,7 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{ort}} = 5,0 \pm 0,4 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{hyp}} = 2,6 \pm 0,3 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, para amostras de MNTs-FF_(hex) / Hyp, MNTs-FF_(ort) / Hyp e Hyp pura. Os valores acima revelam que há

uma melhoria de desempenho de quase três vezes para amostras de MNTs-FF_(hex) / Hyp e duas vezes para amostras MNTs-FF_(ort) / Hyp, quando comparados com os dados obtidos para a Hyp pura.

Nota-se que o aumento da produção de ROS é mais pronunciado quando a Hyp está conjugada com MNTs-FF na fase hexagonal, que exibe simetria $P6_1$. Embora em menor proporção, esse aumento também ocorre quando o fluoróforo está na presença dos MNTs-FF na fase ortorrômbica ($P22_12_1$), onde a estrutura não apresenta moléculas de água hospedadas em cavidades no seio da matriz peptídica. Em outras palavras, uma melhoria notável na geração de ROS é encontrada mesmo na ausência de água dentro da estrutura.

O crescimento da constante cinética maior para a hipericina associada a MNTs-FF na fase hexagonal, provavelmente resulta da organização espacial da Hyp sobre a superfície hidrofóbica dos conjugados e de um possível auxílio de dipolos induzidos pela água facilitando a transferência de carga. A forte natureza não polar da interface favorece a criação de um padrão de empacotamento do fluoróforo na superfície dos tubos, onde este se distribui em toda a superfície (vide Figura 16). Por outro lado, as estruturas organizadas em simetria ortorrômbica têm grupos mais hidrofílicos disponíveis na interface e, presumivelmente, têm maior propensão à agregação de hipericina, perdendo assim a capacidade de geração de ROS em comparação com MNTs-FF na fase hexagonal.

Os tempos de vida de fluorescência foram medidos para as amostras dos conjugados em ambas as fases e para a Hyp pura na concentração de 2,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Hyp em clorofórmio. As curvas dos decaimentos estão ilustradas na Figura 25 e os respectivos resultados são apresentados na Tabela 2.

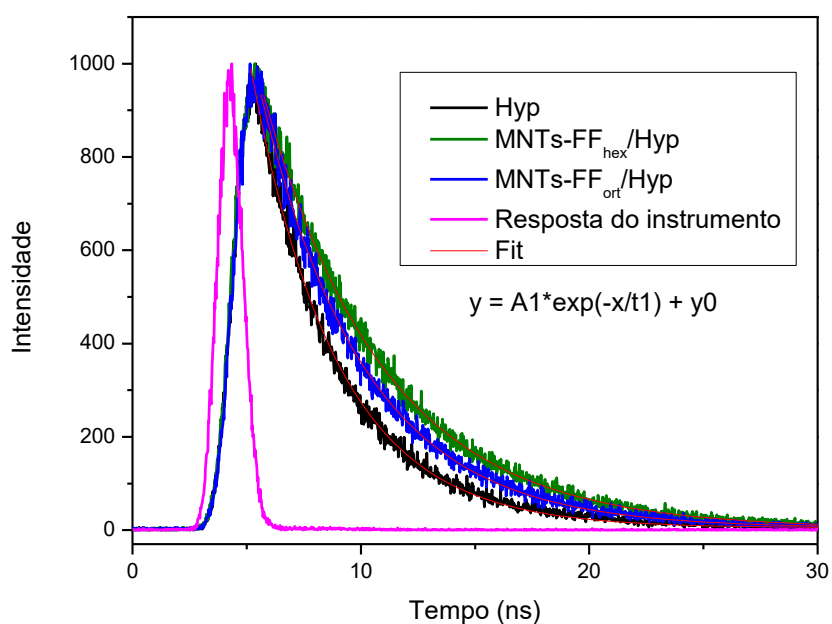


Figura 25. Decaimento do tempo de vida de fluorescência dos conjugados MNTs-FF Hex/Hyp, MNTs-FF ort/Hyp e Hyp pura. ($\lambda_{\text{exc}}=340 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$)

Tabela 2. Tempos de vida de fluorescência em clorofórmio para Hyp pura e para os conjugados MNTs-FF_(ort) / Hyp e MNTs-FF_(hex) / Hyp. $\lambda_{\text{exc}}=340\text{nm}$ (concentração de Hyp $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$)⁶⁷

Amostra	$\tau \pm \sigma \text{ (ns)}$	χ^2
Hyp pura	$3,904 \pm 0,002$	0,949
MNTs-FF _(ort) / Hyp	$4,663 \pm 0.003$	1,378
MNTs-FF _(hex) / Hyp	$5,274 \pm 0,003$	1,367

De forma semelhante ao comportamento observado para as constantes cinéticas, os tempos de vida também são sensivelmente mais elevados quando o fluoróforo aparece conjugado com os peptídeos, com respectivas melhoras de aproximadamente 35% e 20% para MNTs-FF_(hex) e MNTs-FF_(ort),

respectivamente. Esses resultados demonstram que as estruturas de peptídeos estabilizam o estado excitado do fotossensibilizador e evidenciam a melhoria das propriedades fotofísicas, uma vez que tempos de vida mais longos também implicam mais energia disponível para transferência para o $^3\text{O}_2$ e potencialmente aumenta a geração de ROS.

A literatura tem relatado que o comportamento fotofísico da hipericina pode ser influenciado pela presença de água em soluções de DMSO e os tempos de vida podem ser reduzidos mediante aumento de percentagem de volume de água na mistura.⁷⁰ Tendo em vista que MNTs-FF na fase hexagonal possuem cavidades que podem hospedar de 15 a 24 moléculas de água por hexamero¹⁸⁻¹⁹⁻²⁴, os incrementos observados na geração de ROS podem estar relacionados com a água residual dentro dos MNTs-FF_(hex). Para investigar mais esse efeito da água, foi avaliado também o comportamento da Hyp e dos conjugados MNTs-FF/Hyp nas duas fases, hexagonal e ortorrômbica, em misturas de DMSO e H₂O.

Na Figura 26, observa-se a cinética de consumo de DPBF para soluções contendo 10% e 20% de água, onde a concentração de Hyp foi ajustada em 6,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Nota-se que a adição de água tem efeitos evidentes sobre a cinética de degradação do DPBF, como atestado pelo aumento das taxas de decaimento, $\Delta\text{Ln}(\text{Abs})/\Delta t$ (Tabela 3). As velocidades de reação são novamente consideravelmente maiores quando MNTs-FF estão presentes em solução. No entanto, na presença de água, as propriedades dos MNTs-FF_(ort) aparentemente diminuem e os valores de $\Delta\text{Ln}(\text{Abs})/\Delta t$ são mais próximos aos da Hyp pura, isso se deve pelas fortes interações entre a superfície dos MNTs-FF_(ort) e a água permitindo a permeação da camada de hipericina na superfície da estrutura por moléculas de H₂O. Por outro lado, as propriedades de reforço de estruturas

peptídicas organizados em simetria $P6_1$ sobre a cinética parecem manter-se inalteradas e estas estruturas continuam apresentando maior geração de ROS.

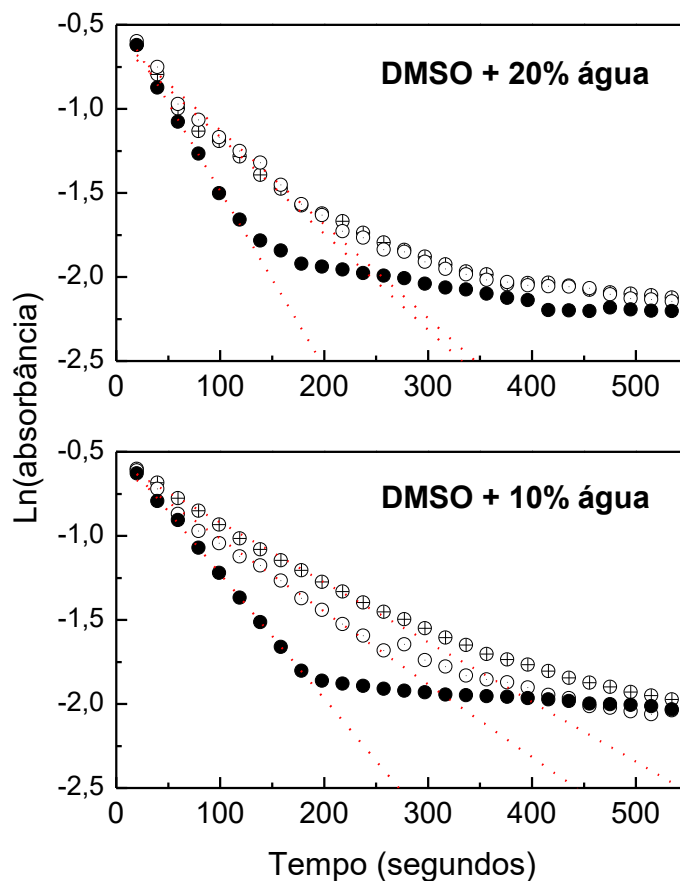


Figura 26. Cinética do consumo de DPBF em misturas de DMSO e água. Círculos preenchidos MNTs-FF_(hex) / Hyp, círculos abertos MNTs-FF_(ort) / Hyp e círculos com x Hyp pura. Linhas vermelhas pontilhadas: ajuste linear a partir dos valores $\Delta \text{Ln}(\text{Abs})/\Delta t$ listado na Tabela 3. Concentração de Hyp foi mantida a $6,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ em todas as amostras.⁶⁷

Tabela 3. Taxas de decaimento do consumo de DPBF em misturas de DMSO e água (concentração de Hyp $6,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) ⁶⁷

Amostra	$\Delta\text{Ln}(\text{abs})/\Delta t [\text{s}^{-1}]$	
	água 10%	água 20%
Hyp pura	$0,0034 \pm 0,0001$	$0,0051 \pm 0,0003$
MNTs-FF _(ort) / Hyp	$0,0043 \pm 0,0001$	$0,0058 \pm 0,0003$
MNTs-FF _(hex) / Hyp	$0,0074 \pm 0,0001$	$0,0099 \pm 0,0004$

4.2. Micro/nanotubos de L,L-difenilalanina contendo ftalocianinas de zinco

4.2.1. Caracterização morfológica e estrutural

As estruturas das ftalocianinas utilizadas nesse trabalho para a conjugação com MNTs-FF estão representadas na Figura 27. Nota-se que as ftalocianinas ZnPc1 e ZnPc2 são simétricas, pois apresentam quatro grupos glicerol. Já as ftalocianinas ZnPc3 e ZnPc4 são assimétricas e apresentam três grupos glicerol e um grupo metil. As ftalocianinas ZnPc2 e ZnPc4 apresentam os grupos glicerol desprotegidos para proporcionar possíveis interações com a superfície dos microtubulos.

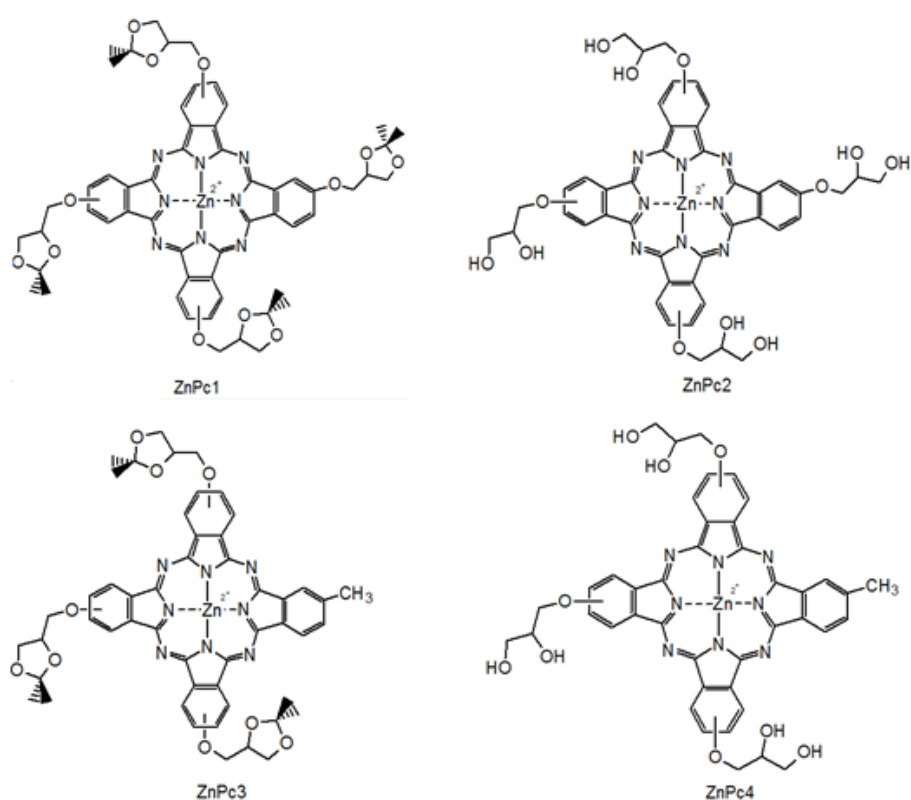


Figura 27. Ftalocianinas de zinco utilizadas na conjugação com MNTs-FF.

Primeiramente, foi realizada a caracterização por microscopia eletrônica a fim de investigar se a morfologia tubular dos MNTs-FF permaneceria após a conjugação com as ftalocianinas. Para todos os tipos de ZnPcs expostos na Figura 27, os conjugados mostraram notáveis mudanças morfológicas em relação à forma tubular convencional (Figura 28).

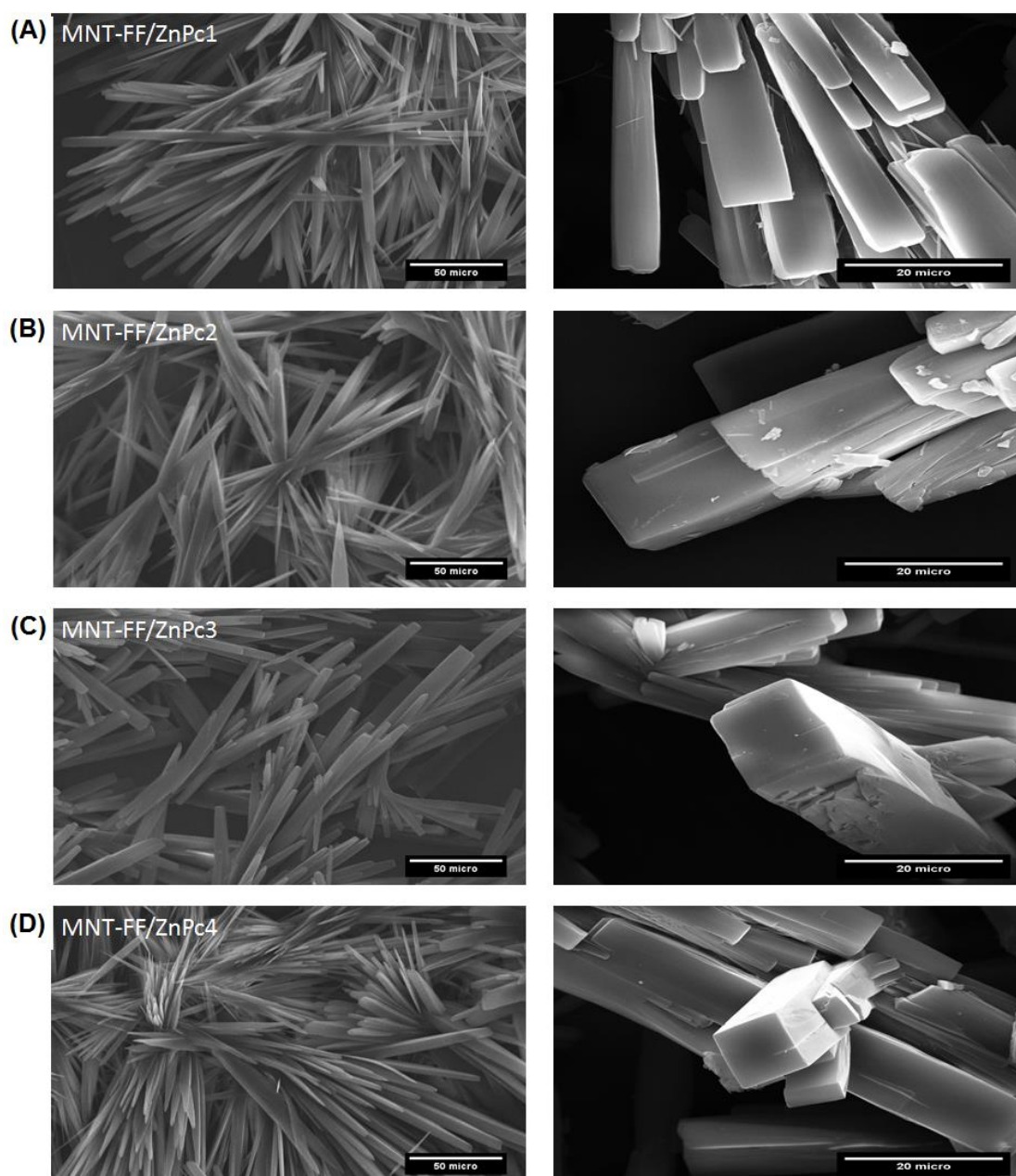


Figura 28. Imagens de MEV dos MNTs-FF funcionalizados com diferentes ftalocianinas de zinco: (A) ZnPc1, (B) ZnPc2, (C) ZnPc3, (D) ZnPc4. (Escala da direita 50 micro, esquerda 20 micro).

Observa-se na Figura 28 que o material obtido forma estruturas semelhantes a hastes com algumas extremidades pontiagudas, concordando com recentes descobertas de outros pesquisadores que sintetizaram complexos mistos ftalocianina/porfirina com terras raras.⁷¹ Outro aspecto perceptível é o crescimento radial das estruturas, o que sugere a presença de centros de nucleação a partir dos quais a auto-montagem ocorre.

Os conjugados MNTs-FF contendo ZnPcs também foram analisados por AFM para obter maiores informações da superfície das hastes. A Figura 29 ilustra as imagens de AFM dos conjugados MNTs-FF contendo ZnPc1.

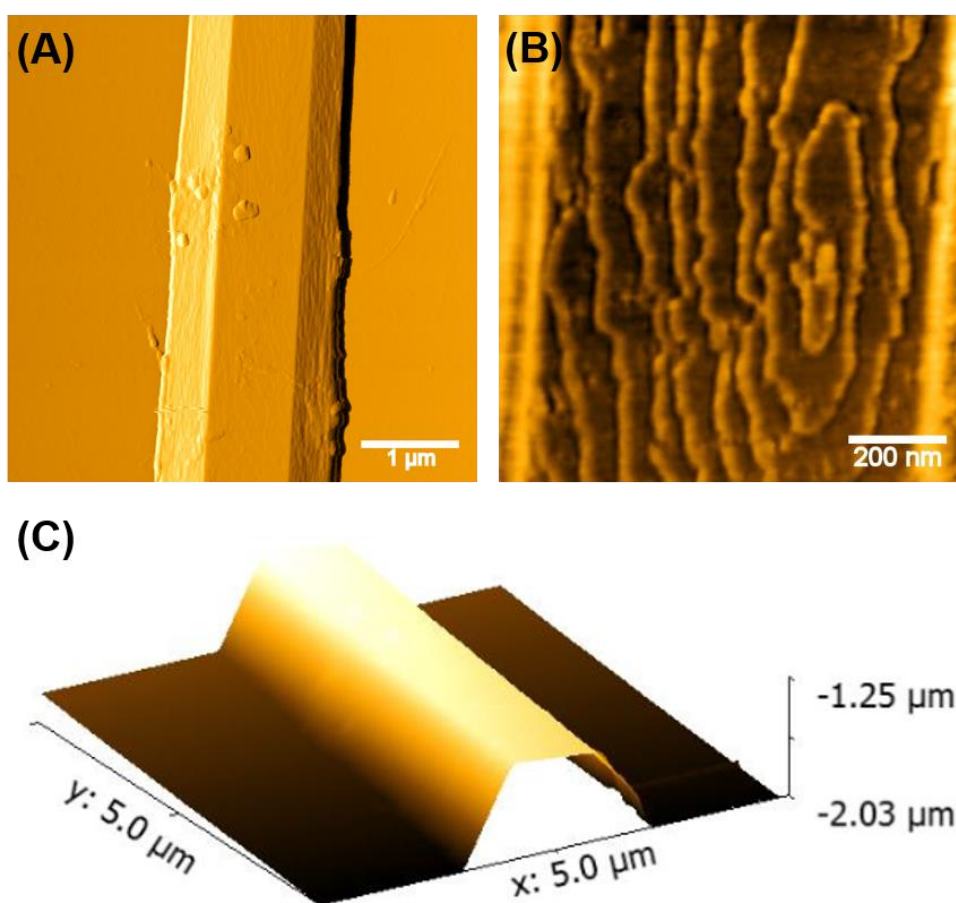


Figura 29. (A) MNTs-FF contendo ZnPc1, (B) imagem ampliada da superfície e (C) perfil topográfico da haste.

As imagens acima corroboram com as imagens de MEV, onde em (A) pode-se observar que a amostra contém arestas bem definidas. Em (B) observa-se camadas de ZnPc1 na superfície do material que forma degraus fornecendo assim uma maior rugosidade e (C) é ilustrada a reconstrução 3D da topografia.

Para os conjugados contendo ZnPc2 (Figura 30) observa-se uma superfície com bolhas contendo pequenos aglomerados, e com a imagem ampliada da superfície não foi possível observar a formação de camadas observadas nos conjugados com ZnPc1, mas a morfologia corrobora com a imagem de MEV para essa amostra.

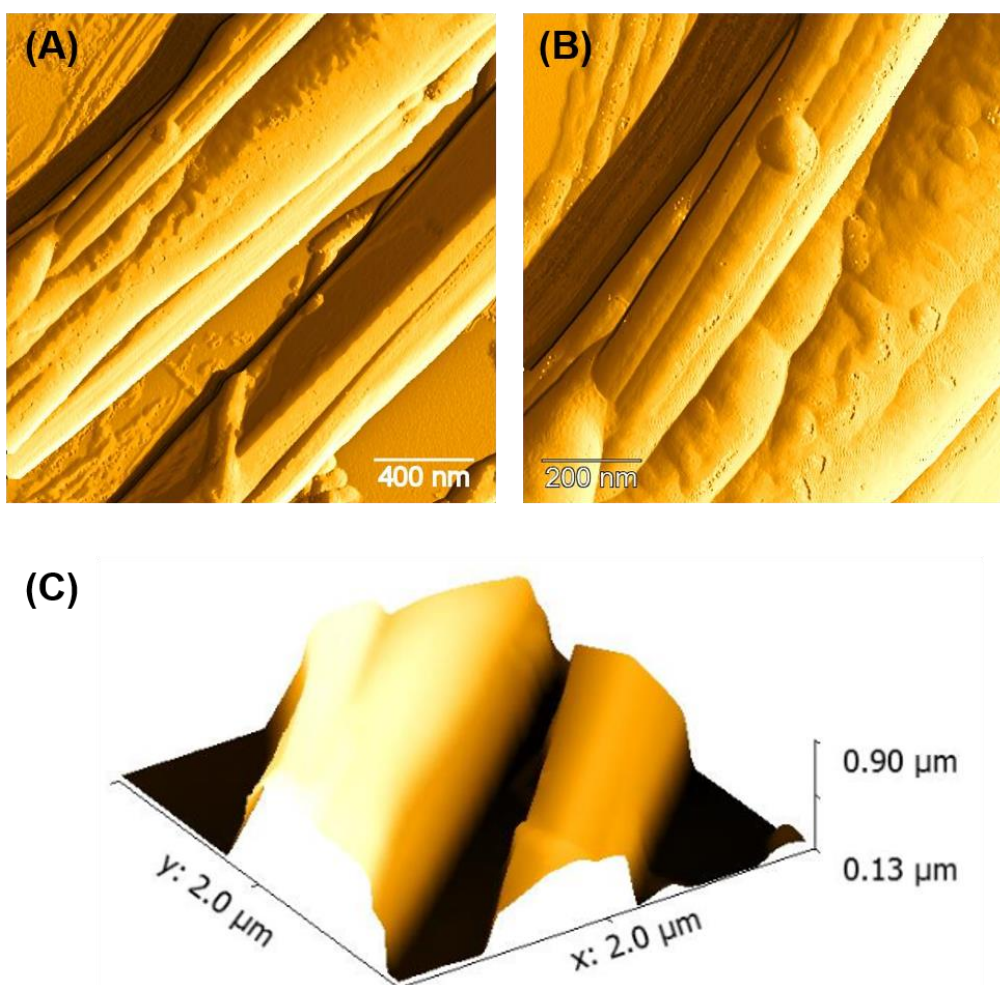


Figura 30. (A) MNTs-FF contendo ZnPc2, (B) imagem ampliada da superfície e (C) perfil topográfico da haste.

Os MNTs-FF contendo ZnPc3 (Figura 31) apresentam uma superfície com estrias ao longo do material fazendo com que sua rugosidade fique maior.

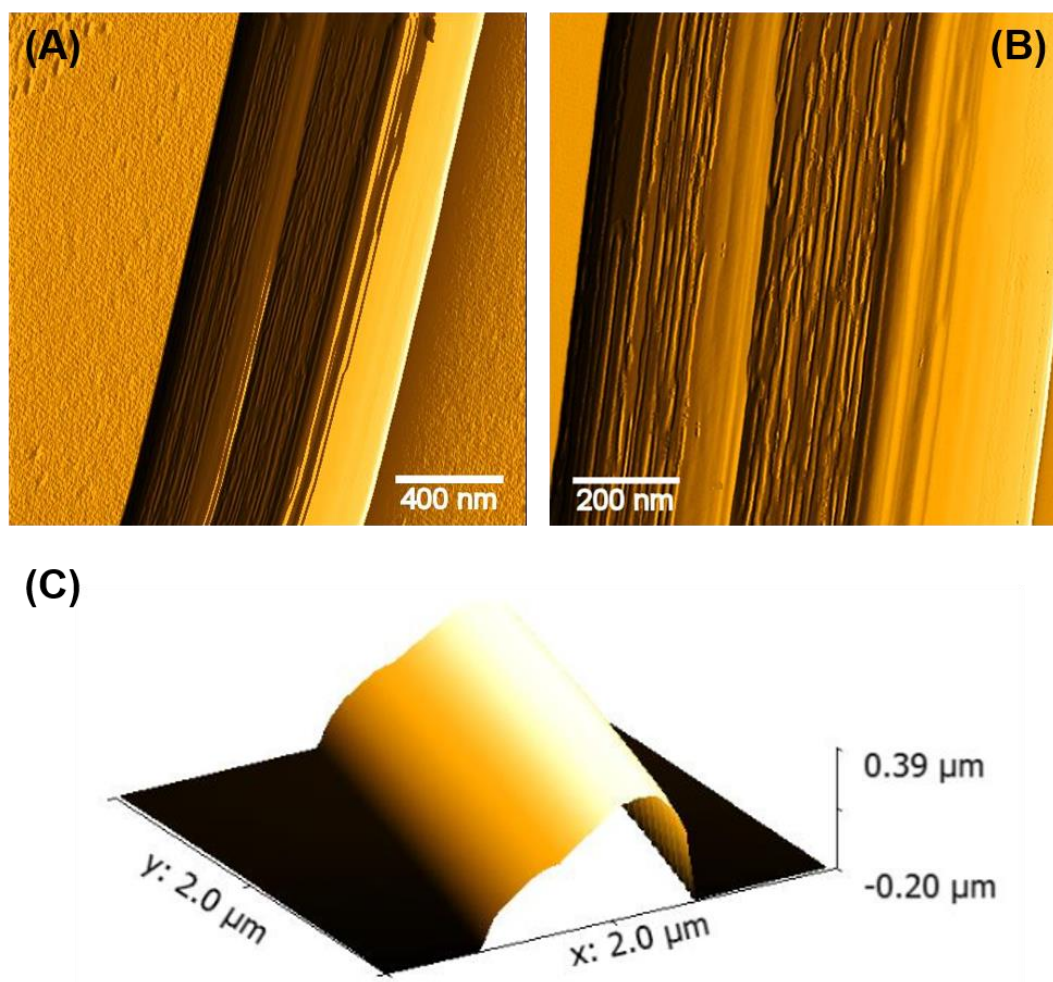


Figura 31. (A) MNTs-FF contendo ZnPc3, (B) imagem ampliada da superfície e (C) perfil topográfico da haste.

As estruturas formadas com ZnPc4 (Figura 32) apresentam uma superfície mais lisa, quando comparadas com os outros conjugados, e apresentam a formação de pequenas rugas. Nessa estrutura, é possível observar arestas, também visualizadas em imagens de MEV.

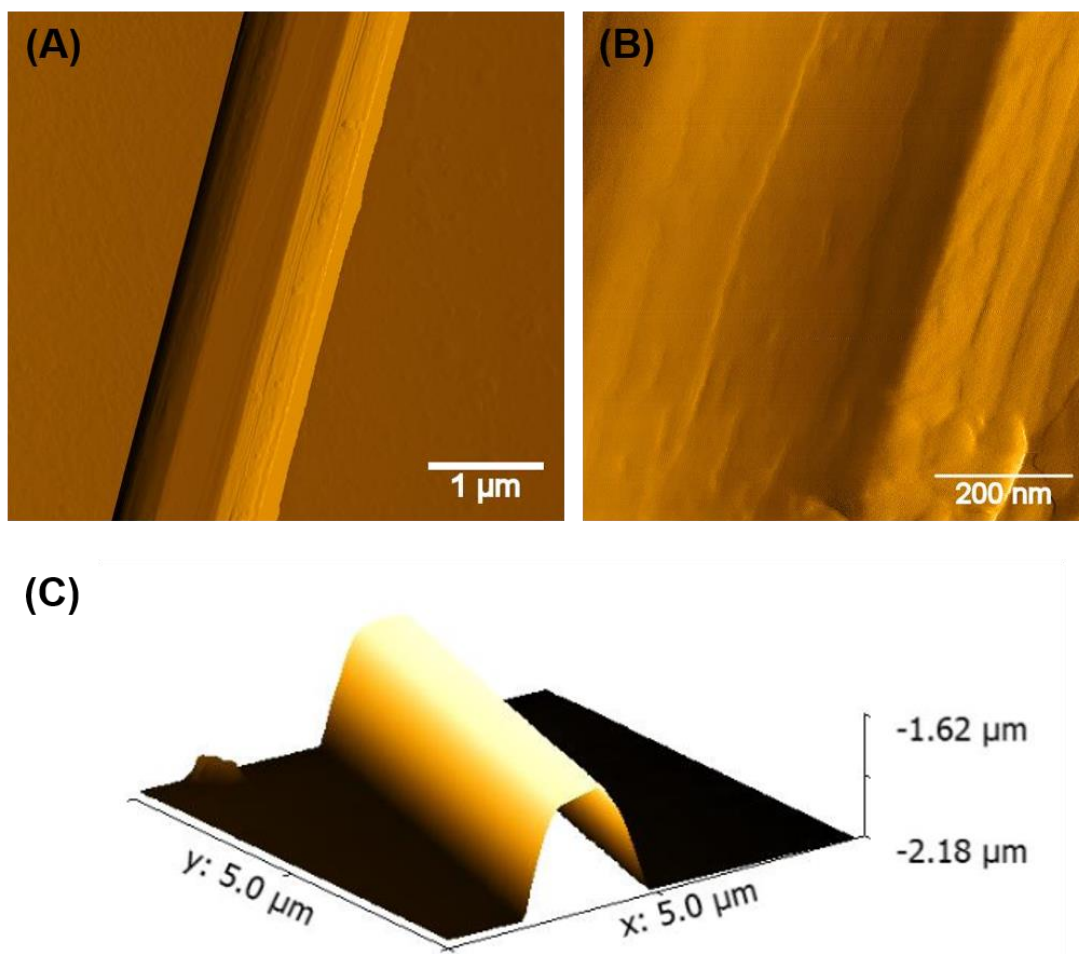


Figura 32. (A) MNTs-FF contendo ZnPc4, (B) imagem ampliada da superfície e (C) perfil topográfico da haste.

Com as imagens de topografia das amostras foi possível medir a rugosidade da superfície dos conjugados através do programa Gwyddion. A rugosidade média quadrática (R_q) foi calculada em cinco diferentes pontos de cada amostra e os valores da média estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores da rugosidade para os conjugados de MNTs-FF com ftalocianinas de zinco.

Amostra	Rq
MNTs-FF/ZnPc1	10,7 nm
MNTs-FF/ZnPc2	11,3 nm
MNTs-FF/ZnPc3	15,3 nm
MNTs-FF/ZnPc4	10,7 nm

Analisando a Tabela 4, observa-se que a rugosidade da superfície é maior para o conjugado contendo ZnPc3 onde foi possível averiguar a morfologia de hastes com arestas bem definidas e uma superfície com estrias.

A estrutura cristalina dos MNTs-FF após a conjugação com ZnPcs foi analisada por difratogramas de raio-X para avaliar possíveis mudanças (Figura 33).

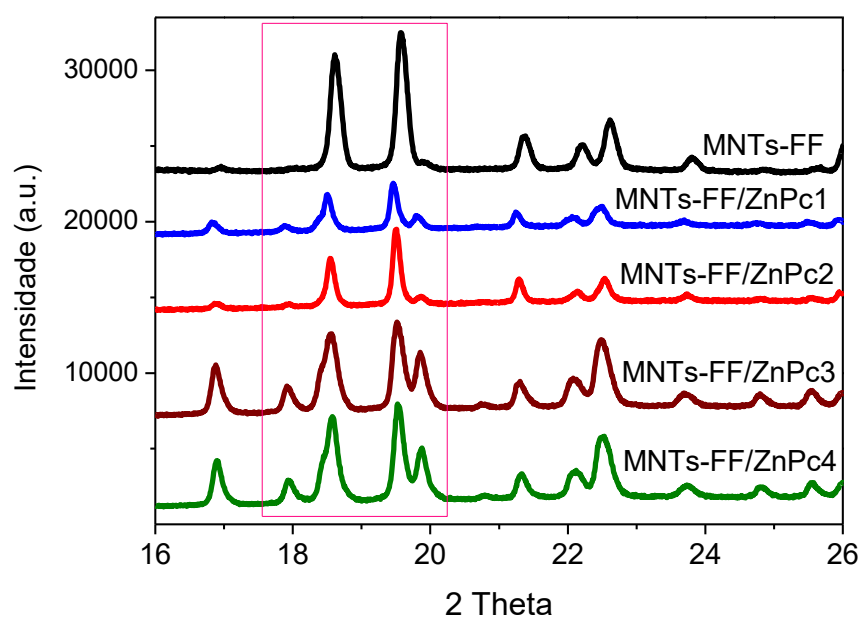


Figura 33. DRX dos conjugados MNTs-FF com quatro diferentes ftalocianinas de zinco e para MNTs-FF puro.

Os difratogramas revelam que para todos os conjugados a estrutura cristalina permanece a mesma $P6_1$, apesar dos materiais obtidos apresentarem morfologia diferente. Observa-se também que ocorrem diferenças nas intensidades relativas dos picos. Isso pode ser claramente observado, por exemplo, no intervalo $17.5^\circ < 2 \text{ Theta} < 20.5$ (indicado em magenta). Quando os MNTs-FF estão conjugados com ZnPc3 e ZnPc4, as intensidades relativas são maiores do que aquelas observadas em presença de ZnPc1 e ZnPc2. Esse efeito é devido a possíveis intercalações de ZnPc no interior da estrutura que, mesmo mantendo a mesma simetria cristalográfica, poderia introduzir mudanças no fator de espalhamento médio favorecendo intensidades em determinados planos em detrimento de outros.

O comportamento vibracional dos conjugados foi acompanhado por espectroscopia vibracional de FTIR, a fim de observar variações espectrais em função do tipo de ftalocianina. Os espectros para os quatro conjugados e para os MNTs-FF estão ilustrados na Figura 34.

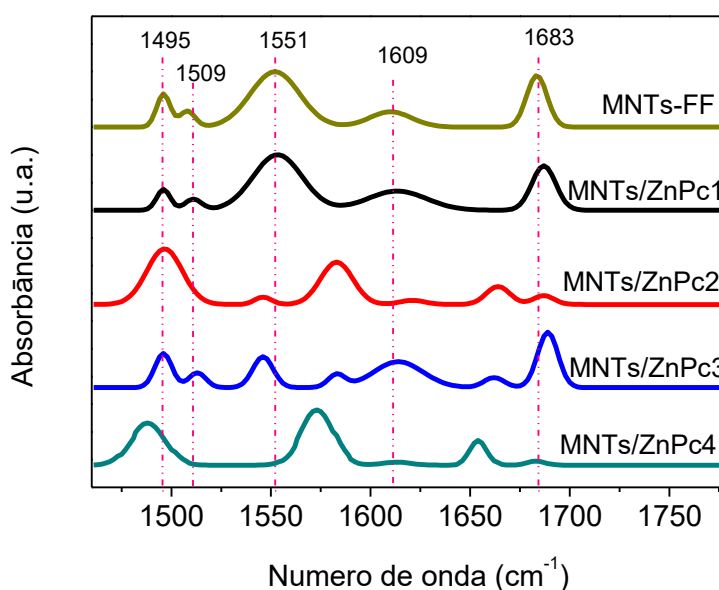


Figura 34. Espectros vibracionais para os conjugados MNTs-FF / ftalocianinas e para MNTs-FF puro.

As atribuições acerca dos modos vibracionais dos espectros da Figura 34 se encontram na Tabela 5.

Tabela 5. Número de onda e o modo vibracional esperado para os espectros acima. ⁷²⁻⁷³

Número de onda (cm⁻¹)	Modo vibracional esperado
1495	Deformação angular N–H
1509	Estiramento C=C anel aromático
1551	Estiramento assimétrico CO ₂
1609	Deformação angular N–H (Banda amida II)
1683	Estiramento C=O (Banda amida I)

Analisando o gráfico da Figura 34, é possível notar que, comparando o espectro do MNTs-FF com o conjugado MNTs-FF/ZnPc1, não ocorrem variações espectrais significativas. Isso pode ser devido ao fato da ZnPc1 ser simétrica contendo quatro grupos glicerol protegidos fazendo com que não haja interação entre as espécies. Para os conjugados com ZnPc2, onde os grupos glicerol estão na sua forma desprotegida, aparece um pico em 1582 cm⁻¹ e outro em 1663 cm⁻¹, que são atribuídos a espécies que contêm anéis aromáticos. Ocorre também uma sobreposição de picos na região de 1500 cm⁻¹ e os picos referentes aos da banda amida I e II sofre uma redução na intensidade, essa mudança no espectro pode ser devida à interação entre os grupos desprotegidos com as moléculas de água presente na parte interna do material.

Para os conjugados com a ftalocianina ZnPc3, onde apresenta 3 grupos glicerol e um grupo metil, há o aparecimento dos picos encontrados nos

conjugados com ZnPc2, mas com menor intensidade. E para os conjugados com ZnPc4 ocorre deslocamentos de picos e baixa intensidade dos picos referente a banda amida I e II.

A observação mais relevante seria em relação às bandas amida I e II, pois, quando os MNTs-FF estão na presença das ftalocianinas protegidas (ZnPc1 e ZnPc3), os picos relacionados a esse tipo de vibração são mais intensos. Entretanto, quando os conjugados são formados com ZnPc2 e ZnPc4, esses picos apresentam baixa intensidade mostrando que ocorre possível interação entre os grupos desprotegidos com os grupos amidas presente nos MNTs-FF.

4.2.2. Espectro de absorção dos fotossensibilizadores

Ftalocianinas de zinco são macrociclos sintéticos de elevada massa molecular. Seu sistema π conjugado, com 18 elétrons, exibe um típico espectro eletrônico com duas bandas de absorção significantes, uma na região do visível (banda Q), e outra banda na região UV (banda B). Os espectros de absorção na região do UV-Vis das ftalocianinas, em DMSO, estudadas nesse trabalho estão representados na Figura 35. Os espectros de absorção da banda Q para os conjugados estão representados na Figura 36 onde é possível observar que não ocorreu deslocamento de pico para as quatro amostras.

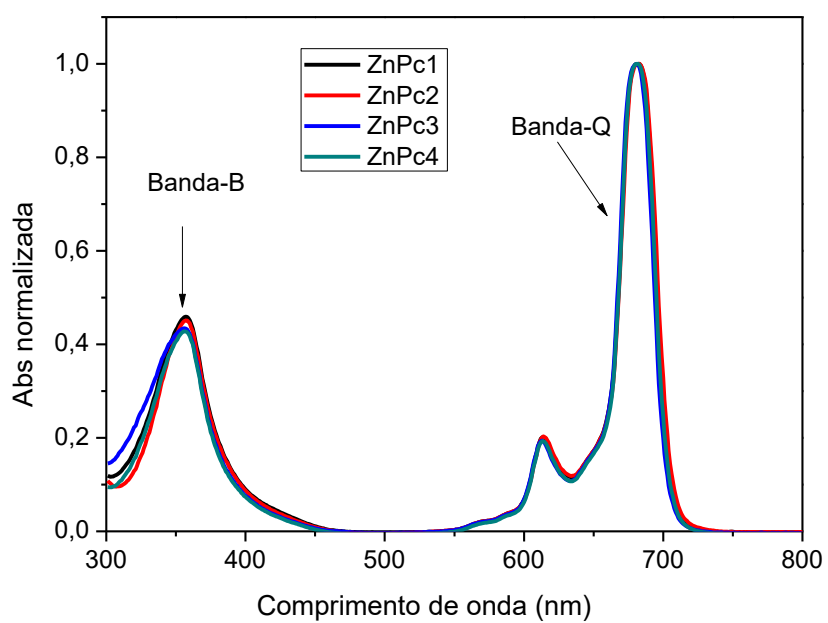


Figura 35. Espectros de absorção das ZnPcs em DMSO.

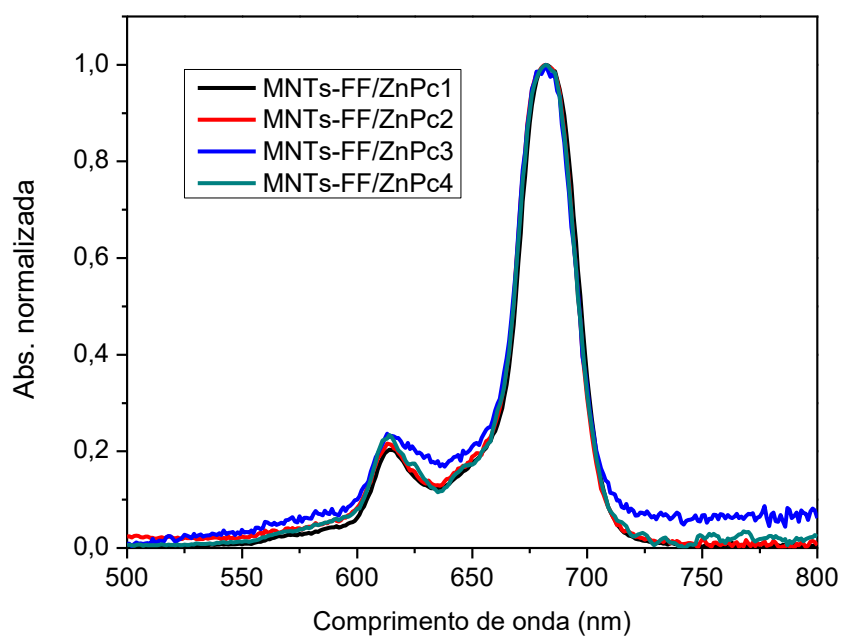


Figura 36. Espectros de absorção dos conjugados MNTs-FF com ZnPcs.

4.2.3. Geração de ROS com método indireto

Foi feito o mesmo estudo realizado com os conjugados contendo Hyp para as amostras MNTs-FF/ZnPcs. Diferentemente dos resultados observados para os conjugados contendo hipericina, nenhum incremento de produção de ROS foi observado quando ZnPcs foram conjugadas com MNTs-FF. Na Figura 37, observa-se que o decaimento é praticamente o mesmo para as amostras ZnPc3 e conjugado MNTs-FF/ZnPc3.

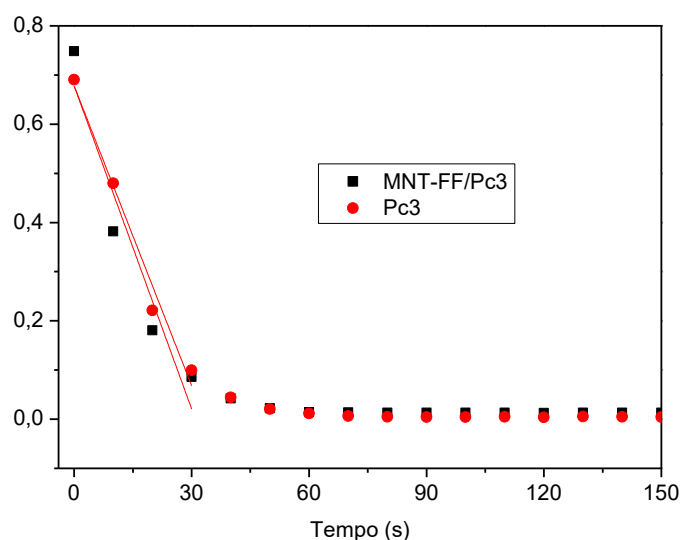


Figura 37. Taxas de decaimento representativas da absorção temporal do DPBF em 417 nm. Vermelho ftalocianina ZnPc3 e preto conjugado MNTs-FF / ZnPc3. (Concentração de ZnPc3 de $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$).

Esse resultado mostra que os MNTs-FF não prejudica a geração de ROS pelo fotossensibilizador e diante dessa ausência de ganho de produção de ROS nos conjugados MNTs-FF/ZnPCs, direcionamos nossos ensaios para testes em células com intuito de avaliar se a presença de peptídeos interfere no mecanismo de morte de células tumorais quando o fluoróforo é submetido à

irradiação. Como será mostrado a seguir, surpreendentemente, verificamos que, mesmo sem aumento da atividade fotofísica, os conjugados promovem aumento de eficiência do fluoróforo em relação a células.

4.2.4. Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade celular para a ftalocianina de zinco (ZnPc3) e seus conjugados com MNTs-FF foram realizados em linhagem de células tumorais mamárias (MCF-7) para verificarmos a toxicidade dos sistemas. As respectivas concentrações de todas as amostras estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentrações de ZnPc3 e MNTs-FF nas amostras.

Amostra	Concentração de ZnPc3	Concentração de MNTs-FF
MNTs-FF (a)		1 mg mL ⁻¹
MNTs-FF (b)		2 mg mL ⁻¹
MNTs-FF (c)		3 mg mL ⁻¹
MNTs-FF (d)		4 mg mL ⁻¹
ZnPc3 (a)	2,4 µmol L ⁻¹	
ZnPc3 (b)	3,7 µmol L ⁻¹	
ZnPc3 (c)	5,5 µmol L ⁻¹	
ZnPc3 (d)	8,3 µmol L ⁻¹	
MNTs-FF / ZnPc3 (a)	2,4µmol L ⁻¹	1 mg mL ⁻¹
MNTs-FF / ZnPc3 (b)	3,7 µmol L ⁻¹	2 mg mL ⁻¹
MNTs-FF / ZnPc3 (c)	5,5 µmol L ⁻¹	3 mg mL ⁻¹
MNTs-FF / ZnPc3 (d)	8,3 µmol L ⁻¹	4 mg mL ⁻¹

A escolha pela ftalocianina de zinco a ZnPc3 deu-se pelo fato desta apresentar melhores propriedades referentes à estrutura do material, como maior valor de rugosidade, apresentando assim maior área superficial para possíveis reações e/ou adesão. Para os ensaios foram utilizadas quatro concentrações de ftalocianina em DMSO, as concentrações de MNTs-FF também foram variadas.

Para irradiar as amostras e promover a geração de ROS, foi utilizado um sistema de irradiação para células Biotable® fornecido em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (IFSC-USP). O equipamento Biotable® é constituído de um conjunto de LEDs com emissão em 660 nm e é feito para irradiar placas de cultivo de células, como mostra a Figura 38.



Figura 38. Fonte de luz utilizada (LED com emissão em 660 nm).

A Figura 39 ilustra os resultados obtidos pelo teste de vermelho neutro para avaliação do efeito dos FS e seus conjugados com MNTs-FF sobre a viabilidade das células MCF-7. As células foram incubadas com 4 concentrações do agente fotossensibilizante (conforme Tabela 6) em DMSO na presença e ausência dos micro/nanotubos pelo período de 2 horas, após 24 horas todas as

amostras foram irradiadas com LED de 660 nm durante 10 minutos, a uma distância de 10 cm.

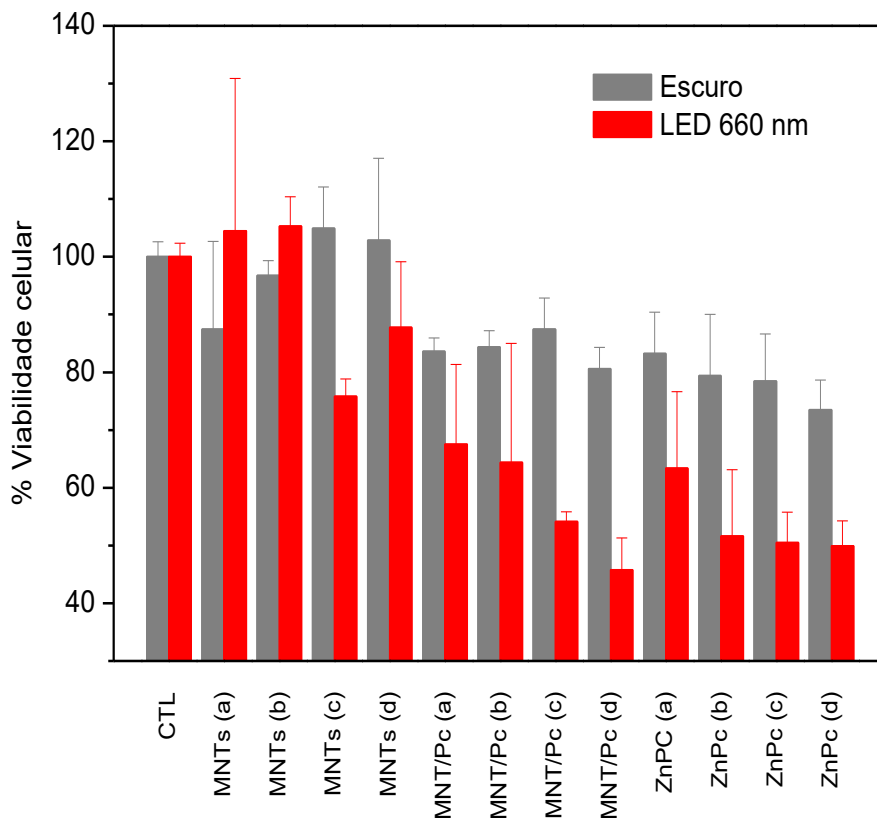


Figura 39. Viabilidade celular da linhagem celular MCF-7 por vermelho neutro. Tempo de incubação com agente ZnPC3, 2 horas e tempo de irradiação com LED 660 nm, 10 min. Concentrações dos agentes FS (a) 2,4 μmol , (b) 3,7 μmol , (c) 5,5 μmol e (d) 8,3 μmol ; MNTs-FF (a) 1mg mL⁻¹, (b) 2mg mL⁻¹, (c) 3mg mL⁻¹, (d) 4mg mL⁻¹. A % viabilidade celular (média de três experimentos) foi baseada na absorbância das células controle (sem compostos FS).

Por meio do gráfico acima, é possível observar um acréscimo da morte celular com o aumento da concentração do agente FS. Observa-se também que mesmo no escuro ocorre morte celular, fenômeno decorrente do fato da manipulação das amostras não ser 100% no escuro. Esse efeito não foi observado para as amostras contendo somente MNTs-FF.

Quando a ftalocianina está conjugada com os MNTs-FF, a morte celular é intensificada comparado ao fotossensibilizador livre. Possivelmente temos aqui um efeito de pré-concentração, onde os MNTs-FF concentram a ZnPc e também a luz, adquirindo assim propriedade de guia de onda, ou seja, os MNTs-FF se comportam como canais capazes de canalizar a luz. Além disso, eles também carregam a ZnPc e podem via interações de van der Waals se acumularem nas vizinhanças das células. Com isso, embora os MNTs-FF em si não aumentem a geração de ROS, eles colocam o fluoróforo e a luz nas vizinhanças da célula, provocando a morte. Quando o fluoróforo está sozinho, ele está disperso no meio, assim como a luz também está dispersa. Já quando os tubos também estão presentes, tanto fluoróforo quanto fótons estão concentrados nas vizinhanças da membrana.

4.2.5. Avaliação da morte celular

O ensaio de fluorescência foi realizado na tentativa de visualizar a capacidade da linhagem mamaria MCF-7 em internalizar as moléculas de ftalocianinas de zinco sozinhas e associadas aos micro/nanotubos de FF. A fim de adquirir um efeito exacerbado, foi selecionada uma alta concentração, escolhida dentre as concentrações utilizadas nos teste de viabilidade celular. A Figura 40 mostra a captação de ZnPc pelas células MCF-7 e através da imagem é possível visualizar que a intensidade de fluorescência é maior quando as ZnPcs estão conjugadas aos MNTs-FF.

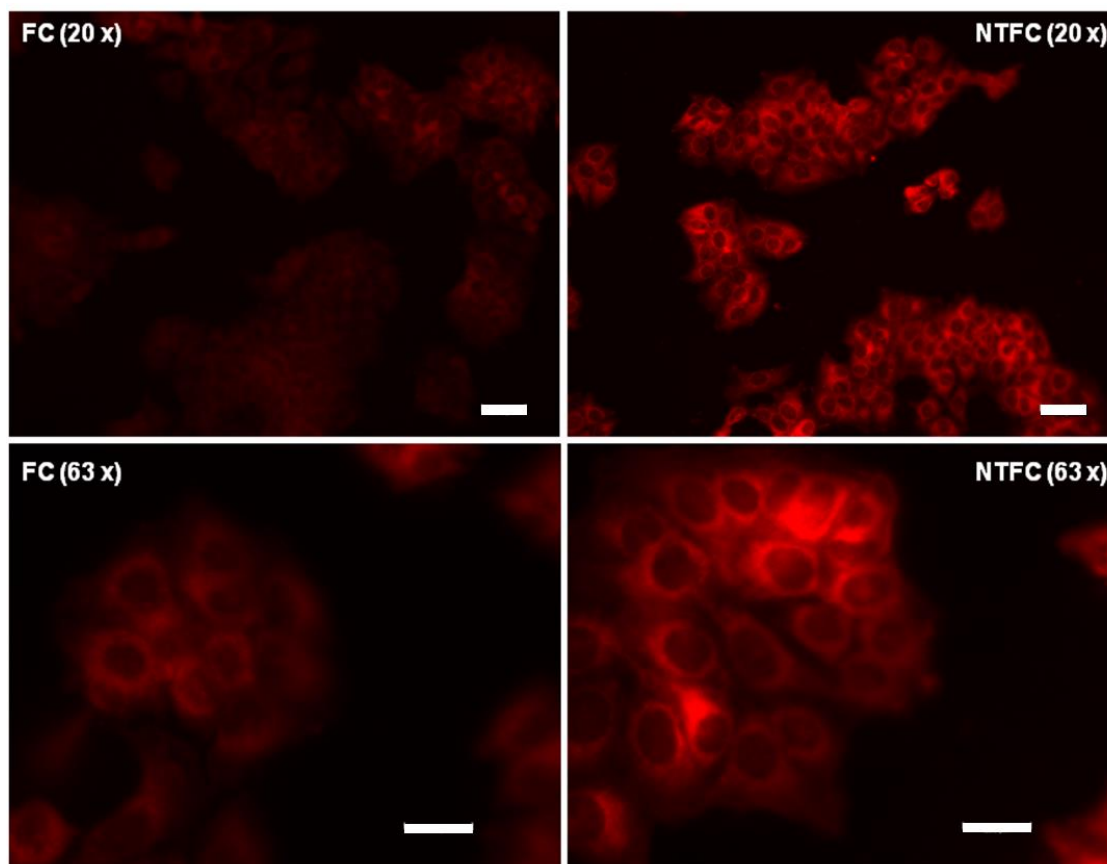


Figura 40. Captação de ZnPc pelas células MCF-7. Imagem de Fluorescência da linhagem MCF-7 após 2 horas de incubação com $0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ZnPc e $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ de Ftalocianina de zinco associada a MNTs-FF. Os quadrantes do lado esquerdo da figura correspondem as imagens das células incorporadas apenas com ZnPc sob aumento de 20x e 63x conforme indicação na figura, e os quadrantes do lado direito, correspondem as imagens das células tratadas com MNTs-FF/ZnPc. As imagens foram obtidas através do microscópio Leica DMI 6000B e filtro Y5 com excitação em 675nm. (Escala: imagens 20x = 50 micro, 63x = 20 micro)

Utilizando o programa Leica Application Suite (LAS, v. 3, Leica Microsystems), foi possível quantificar um aumento de 60% na intensidade de fluorescência para células tratadas com MNTsFF/ZnPc na comparação com a ZnPc3 sozinha (veja o gráfico da Figura 41) e uma hipótese é que os MNTs-FF pré-concentram a ZnPc na vizinhança da membrana celular. A quantificação da captação de ftalocianina de zinco pelas células MCF-7 foi obtida utilizando áreas das imagens com aumento de 63x da Figura 40.

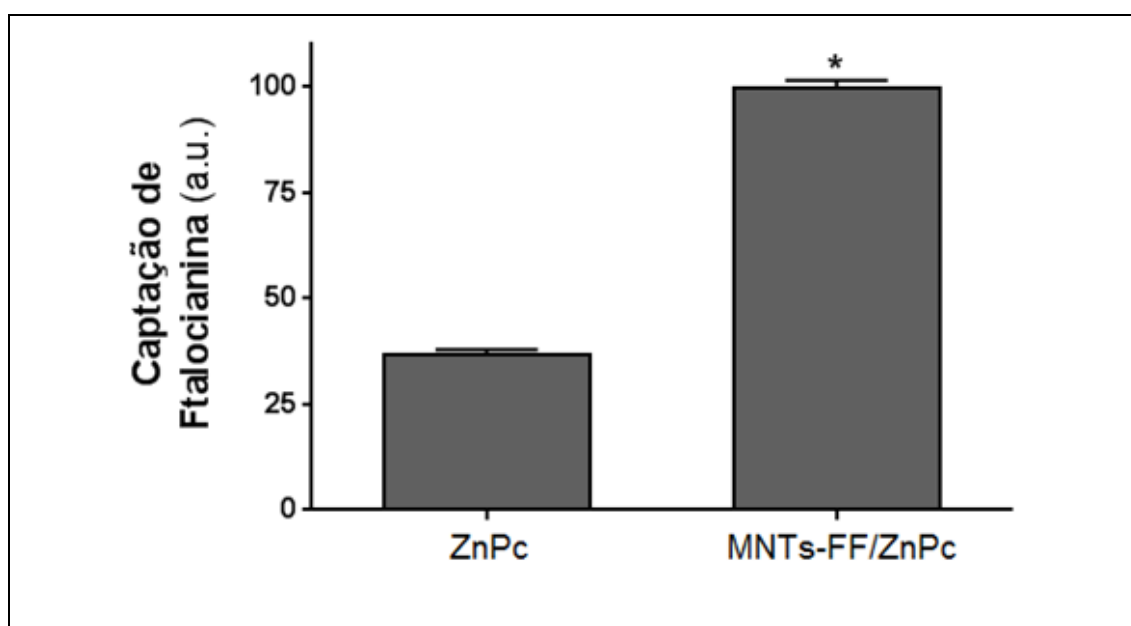


Figura 41. Quantificação da captação de ftalocianina pelas células da linhagem MCF-7. A quantificação foi obtida pelo programa Leica Application Suite (LAS, v. 3, Leica Microsystems) utilizando áreas das imagens com aumento de 63x da figura 38.

Em paralelo, o ensaio de citometria identificou a principal via de morte celular induzida pela irradiação das células MCF-7 quando tratadas com ZnPc e conjugados como sendo necrose. Os valores de células necróticas (An^-/PI^+), além de identificar o tipo de morte, confirmam os dados da microscopia de fluorescência e mostram maior internalização da ZnPc quando associada a MNTs-FF. A internalização foi de 15% de células em necrose para incubação com ZnPc, comparados a 80% para células incubadas com MNTs-FF/ZnPc (vide gráfico (Figura 42-B)).

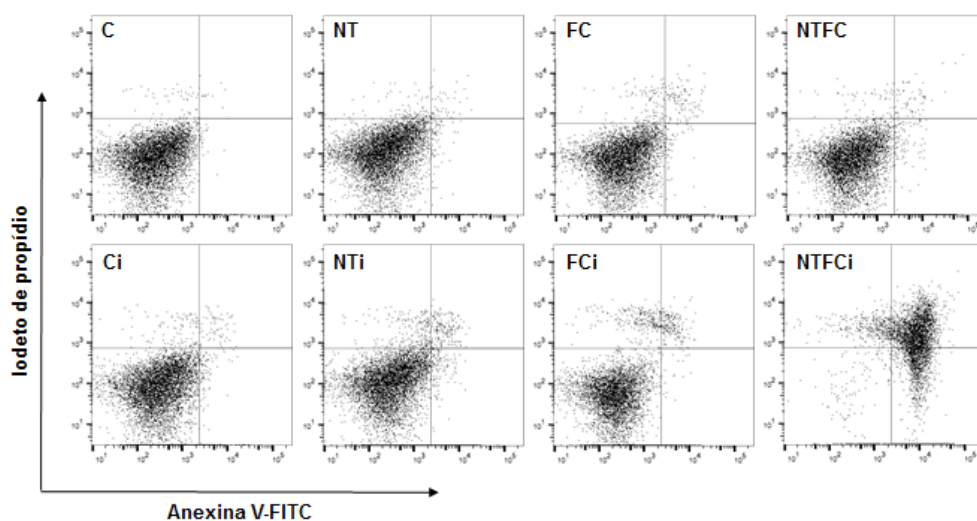
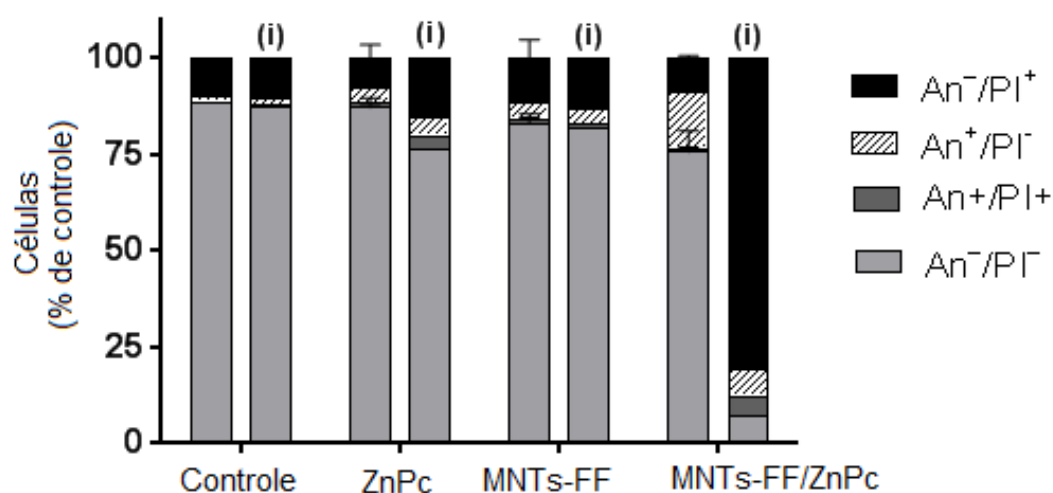
A**B**

Figura 42. (A) Citogramas representativos ilustrando viabilidade da linhagem MCF-7 x ZnPc, estimados por marcadores Anexina V-FITC e PI. As células MCF-7 ($0,6 \times 10^6$ células/experimento) foram incubadas com ZnPc ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), MNTs-FF ($0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) e MNTs-FF/ZnPc por 2 horas e irradiadas a 660 nm. O ensaio de citometria foi realizado 24 horas após irradiação (i) e comparado com células submetidas ao mesmo tratamento porem sem irradiação. (B) % de população apoptótica. A marcação An⁻/PI⁺ corresponde células mortas por necrose através do marcador nuclear de células permeáveis, ou seja, células necróticas; An⁺/PI⁻ marca apenas externalização de PS (fosfatidil serina) correspondendo a apoptose inicial; An⁺/PI⁺ marca PS e núcleo, apoptose avançada, e An⁻/PI⁻ corresponde a células vivas.

5. Conclusões

As conclusões obtidas nesta tese podem ser divididas em dois grupos, de acordo com o fluoróforo utilizado para a formação de conjugados. No primeiro caso, em que se fez uso da hipericina, foi investigado o comportamento de conjugados MNTs-FF/Hyp em duas fases cristalinas, hexagonal e ortorrômbica, onde a primeira contém água no interior da estrutura e a segunda não. Melhorias significativas no tempo de vida de fluorescência no estado excitado e taxas de consumo mais elevadas da molécula de DPBF foram encontrados em ambos os arranjos. Estes resultados indicam maior eficiência de geração de ROS nesses conjugados, mesmo na ausência de água residual na matriz peptídica. Combinados com informações de simulações numéricas, que apontam tanto estruturação local do fluoróforo na interface com os peptídeos quanto a criação de microambiente hidrofóbico nas vizinhanças dos MNTs-FF, esses resultados demonstram um papel primordial da organização espacial no comportamento fotofísico do sistema, sendo que no arranjo hexagonal a abundância de sítios hidrofóbicos na interface do peptídeo favorece a criação de um nanoreator onde as espécies não-polares, tais como hipericina, DPBF e oxigênio singlete são reunidos em uma geometria confinada.

Além disso, o processo de auto-organização pode eventualmente induzir um ordenamento de Hyp na superfície do tubo levando a um acoplamento dipolar com influência direta na performance fotofísica. Os melhores desempenhos foram encontrados sistematicamente para os conjugados MNTs-FF na fase hexagonal onde há presença de moléculas de H₂O dentro dos túneis estreitos

hidrofílicos na matriz do peptídeo. Por isso, uma cooperação sinérgica entre organização e dipolos de água alinhados poderia estar na origem do aumento nas propriedades fotofísicas.

Para os conjugados na fase ortorrômbica, a presença de sítios hidrofílicos sobre a sua superfície é uma desvantagem para a criação de uma vizinhança hidrofóbica capaz de confinar as espécies não-polares, explicando o seu pior desempenho em comparação com a simetria hexagonal altamente hidrofóbica.

Para os híbridos contendo ftalocianinas de zinco, a tradicional morfologia tubular dos MNTs-FF foi drasticamente modificada após a conjugação. Neste caso, os arranjos apresentam morfologia de hastes, porém, a estrutura cristalina permanece com o mesmo arranjo hexagonal encontrado em MNTs-FF não-conjugados. Utilizando microscopia de força atômica, foi possível fazer uma análise detalhada dos conjugados, onde averiguou-se a presença de camadas de fotossensibilizadores na superfície do material e, dependendo do tipo de ftalocianina empregada, a superfície do material apresenta a formação de rugas ou estrias.

Análises vibracionais mostram que quando as ftalocianinas apresentam os grupos protegidos os espectros são semelhantes dos MNTs-FF e quando os grupos estão desprotegidos esses apresentam deslocamento de picos, indicando que pode haver interação desses grupos com moléculas de água presente no interior dos peptídeos. Medidas indiretas de produção de ROS mostram que para esses conjugados não há incremento de propriedades fotofísicas. No entanto, quando em contato com células cancerígenas mamárias, os conjugados exibem aumento significativo de morte celular quando comparados com resultados obtidos para as ftalocianinas livres. Portanto, os

ensaios celulares evidenciam que a conjugação das ZnPc com os MNTs-FF aumenta a morte celular. Imagens de fluorescência indicam uma maior captação de ZnPc quando conjugadas aos MNTs-FF e o ensaio de citometria aponta que a principal via de morte celular induzida pela irradiação das células MCF-7 quando tratadas com ZnPc como sendo necrose. Embora o conjunto de dados aqui apresentado não nos permita estabelecer com precisão um mecanismo para o aumento de necrose induzido pelos MNTs-FF, a capacidade dessas estruturas em atuar como guia de onda demonstrada que esses arranjos podem servir como pré-concentradores de luz e de fluoróforos nas vizinhanças da membrana celular. Com isso, é criado um cenário em que todos os elementos necessários para a morte celular por terapia fotodinâmica estejam reunidos no mesmo local.

6. Referências

1. Kogikoski Jr., S.; Bianchi, R. M. C.; Liberato, M. S.; Decandio, C. C.; Alves, W. A., Auto-Organização Hierárquica de Peptídeos: das Moléculas aos Nanomateriais. Em: Wendel Andrade Alves. (Org.). Química Supramolecular e Nanotecnologia. 1 ed.; Atheneu: São Paulo, 2014; Vol. 10, p 67-87.
2. Factori, I. M.; Silva, E. R.; Cipriano, T. C.; Souza, M. I.; Alves, W. A., Nanoestruturas Peptídicas: Estrutura, Propriedades e Aplicações. Em: Wendel Andrade Alves. (Org.). Química Supramolecular e Nanotecnologia. 1 ed.; Atheneu: São Paulo, 2014; Vol. 10, p 91-107.
3. Ilisz, I.; Aranyi, A.; Pataj, Z.; Péter, A., Recent advances in the direct and indirect liquid chromatographic enantioseparation of amino acids and related compounds: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, 69 (0), 28-41.
4. Gazit, E., Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization. *Chemical Society Reviews* **2007**, 36 (8), 1263-1269.
5. Yan, X.; Zhu, P.; Li, J., Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. *Chemical Society Reviews* **2010**, 39 (6), 1877-1890.
6. Cheng, J.; Zhu, J.; Liu, B., Molecular modeling investigation of adsorption of self-assembled peptide nanotube of cyclo-[(1R,3S)- γ -Acc-d-Phe]₃ in CHCl₃. *Chemical Physics* **2007**, 333 (2-3), 105-111.
7. Marchesan, S.; Vargiu, A.; Styan, K., The Phe-Phe Motif for Peptide Self-Assembly in Nanomedicine. *Molecules* **2015**, 20 (11), 19658.
8. Colombo, G.; Soto, P.; Gazit, E., Peptide self-assembly at the nanoscale: a challenging target for computational and experimental biotechnology. *Trends Biotechnol* **2007**, 25 (5), 211-218.
9. Holmes, T. C.; de Lacalle, S.; Su, X.; Liu, G.; Rich, A.; Zhang, S., Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, 97 (12), 6728-6733.
10. Chen, C.; Pan, F.; Zhang, S.; Hu, J.; Cao, M.; Wang, J.; Xu, H.; Zhao, X.; Lu, J. R., Antibacterial Activities of Short Designer Peptides: a Link between Propensity for Nanostructuring and Capacity for Membrane Destabilization. *Biomacromolecules* **2010**, 11 (2), 402-411.
11. Castillo-León, J.; Andersen, K. B.; Svendsen, W. E., Self-Assembled Peptide Nanostructures for Biomedical Applications: Advantages and Challenges. INTECH Open Access Publisher: 2011.
12. Guha, S.; Banerjee, A., Self-Assembled Robust Dipeptide Nanotubes and Fabrication of Dipeptide-Capped Gold Nanoparticles on the Surface of these Nanotubes. *Advanced Functional Materials* **2009**, 19 (12), 1949-1961.

13. Ryu, J.; Park, C. B., Synthesis of Diphenylalanine/Polyaniline Core/Shell Conducting Nanowires by Peptide Self-Assembly. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, 48 (26), 4820-4823.
14. Martins, T. D.; de Souza, M. r. I.; Cunha, B. B.; Takahashi, P. M.; Ferreira, F. F.; Souza, J. A.; Fileti, E. E.; Alves, W. A., Influence of pH and Pyrenyl on the Structural and Morphological Control of Peptide Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115 (16), 7906-7913.
15. Adler-Abramovich, L.; Reches, M.; Sedman, V. L.; Allen, S.; Tendler, S. J. B.; Gazit, E., Thermal and Chemical Stability of Diphenylalanine Peptide Nanotubes: Implications for Nanotechnological Applications. *Langmuir* **2006**, 22 (3), 1313-1320.
16. Ryu, J.; Park, C. B., High stability of self-assembled peptide nanowires against thermal, chemical, and proteolytic attacks. *Biotechnology and Bioengineering* **2010**, 105 (2), 221-230.
17. Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N., Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture. *Nature* **1993**, 366 (6453), 324-327.
18. Görbitz, C. H., Nanotube Formation by Hydrophobic Dipeptides. *Chemistry – A European Journal* **2001**, 7 (23), 5153-5159.
19. Gorbitz, C. H., The structure of nanotubes formed by diphenylalanine, the core recognition motif of Alzheimer's [small beta]-amyloid polypeptide. *Chemical Communications* **2006**, (22), 2332-2334.
20. Reches, M.; Gazit, E., Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Science* **2003**, 300 (5619), 625-627.
21. Scanlon, S.; Aggeli, A., Self-assembling peptide nanotubes. *Nano Today* **2008**, 3 (3-4), 22-30.
22. Görbitz, C. H., Microporous Organic Materials from Hydrophobic Dipeptides. *Chemistry – A European Journal* **2007**, 13 (4), 1022-1031.
23. Kim, J.; Han, T. H.; Kim, Y.-I.; Park, J. S.; Choi, J.; Churchill, D. G.; Kim, S. O.; Ihee, H., Role of Water in Directing Diphenylalanine Assembly into Nanotubes and Nanowires. *Advanced Materials* **2010**, 22 (5), 583-587.
24. Andrade-Filho, T.; Ferreira, F. F.; Alves, W. A.; Rocha, A. R., The effects of water molecules on the electronic and structural properties of peptide nanotubes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, 15 (20), 7555-7559.
25. (a) Heredia, A.; Bdikin, I.; Kopyl, S.; Mishina, E.; Semin, S.; Sigov, A.; German, K.; Bystrov, V.; Gracio, J.; Kholkin, A. L., Temperature-driven phase transformation in self-assembled diphenylalanine peptide nanotubes. *J. Phys. D- Appl. Phys.* **2010**, 43 (46); (b) Amdursky, N.; Beker, P.; Koren, I.; Bank-Srouer, B.; Mishina, E.; Semin, S.; Rasing, T.; Rosenberg, Y.; Barkay, Z.; Gazit, E.; Rosenman, G., Structural Transition in Peptide Nanotubes. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (4), 1349-1354.
26. Bianchi, R. C.; da Silva, E. R.; Dall'Antonia, L. H.; Ferreira, F. F.; Alves, W. A., A Nonenzymatic Biosensor Based on Gold Electrodes Modified with Peptide Self-Assemblies for Detecting Ammonia and Urea Oxidation. *Langmuir* **2014**, 30 (38), 11464-11473.

27. Yan, X.; Li, J.; Möhwald, H., Self-Assembly of Hexagonal Peptide Microtubes and Their Optical Waveguiding. *Advanced Materials* **2011**, 23 (25), 2796-2801.
28. Matos, I. d. O.; Alves, W. A., Electrochemical Determination of Dopamine Based on Self-Assembled Peptide Nanostructure. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, 3 (11), 4437-4443.
29. Ryu, J.; Park, C. B., Synthesis of Diphenylalanine/Polyaniline Core/Shell Conducting Nanowires by Peptide Self-Assembly. *Angewandte Chemie* **2009**, 121 (26), 4914-4917.
30. Lakshmanan, A.; Zhang, S.; Hauser, C. A. E., Short self-assembling peptides as building blocks for modern nanodevices. *Trends in biotechnology* **2012**, 30 (3), 155-165.
31. Ryu, J.; Lim, S. Y.; Park, C. B., Photoluminescent Peptide Nanotubes. *Advanced Materials* **2009**, 21 (16), 1577-1581.
32. Kim, J. H.; Lim, S. Y.; Nam, D. H.; Ryu, J.; Ku, S. H.; Park, C. B., Self-assembled, photoluminescent peptide hydrogel as a versatile platform for enzyme-based optical biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26 (5), 1860-1865.
33. Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J., Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer research* **1976**, 36 (7 pt 1), 2326-9.
34. Foote, C. S., DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTSENSITIZED OXIDATION. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, 54 (5), 659-659.
35. Dai, T.; Fuchs, B. B.; Coleman, J. J.; Prates, R. A.; Astrakas, C.; St. Denis, T. G.; Ribeiro, M. S.; Mylonakis, E.; Hamblin, M. R.; Tegos, G. P., Concepts and Principles of Photodynamic Therapy as an Alternative Antifungal Discovery Platform. *Frontiers in Microbiology* **2012**, 3, 120.
36. Yi, E.; Chang, J.-E.; Leem, C.; Kim, S.; Jheon, S., Clinical results of photodynamic therapy in tracheobronchial malignancy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2016**, 156, 56-60.
37. Perussi, J. R., Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Química Nova* **2007**, 30, 988-994.
38. Ribeiro, J. N.; Flores, A. V.; Mesquita, R. C.; Nicola, J. H.; Nicola, E. M. D., Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. 2005 **2005**, 10.
39. Arabei, S. M.; Galaup, J. P.; Jardon, P., Analysis of the site selected fluorescence and the phosphorescence spectrum of hypericin in ethanol. *Chemical Physics Letters* **1997**, 270 (1-2), 31-36.
40. Kirakosyan, A.; Sirvent, T. M.; Gibson, D. M.; Kaufman, P. B., The production of hypericins and hyperforin by in vitro cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2004**, 39 (1), 71-81.
41. Kubin, A.; Wierrani, F.; Burner, U.; Alth, G.; Grünberger, W., Hypericin--the facts about a controversial agent. *Curr Pharm Des.* **2005**, 11 (2), 233-253.

42. Brockmann, H.; Haschad, M.; Maier, K.; Pohl, F., Über das Hypericin, den photodynamisch wirksamen Farbstoff aus *Hypericum perforatum*. *Naturwissenschaften* **1939**, 27 (32), 550-550.
43. Falk, H., From the Photosensitizer Hypericin to the Photoreceptor Stentorin— The Chemistry of Phenanthroperylene Quinones. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, 38 (21), 3116-3136.
44. Butterweck, V.; Petereit, F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A., Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta medica* **1998**, 64 (4), 291-294.
45. Hadjur, C.; Richard, M.-J.; Parat, M.-O.; Jardon, P.; Favier, A., Photodynamic Effects of Hypericin on Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Melanoma Cells. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, 64 (2), 375-381.
46. Mortensen, T.; Shen, S.; Shen, F.; Walsh, M. K.; Sims, R. C.; Miller, C. D., Investigating the Effectiveness of St John's Wort Herb as an Antimicrobial Agent against Mycobacteria. *Phytotherapy Research* **2012**, 26 (9), 1327-1333.
47. Nakajima, N.; Kawashima, N., A basic study on Hypericin-PDT in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2012**, 9 (3), 196-203.
48. Sharma, K. V.; Davids, L. M., Hypericin-PDT-induced rapid necrotic death in human squamous cell carcinoma cultures after multiple treatment. *Cell Biology International* **2012**, 36 (12), 1261-1266.
49. Kiesslich, T.; Krammer, B.; Plaetzer, K., Cellular Mechanisms and Prospective Applications of Hypericin in Photodynamic Therapy. *Current Medicinal Chemistry* **2006**, 13 (18), 2189-2204.
50. Sgarbossa, A.; Buselli, D.; Lenci, F., In vitro perturbation of aggregation processes in β -amyloid peptides: A spectroscopic study. *FEBS Letters* **2008**, 582 (23), 3288-3292.
51. Sánchez-Cortés, S.; Miskovsky, P.; Jancura, D.; Bertoluzza, A., Specific Interactions of Antiretrovirally Active Drug Hypericin with DNA As Studied by Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, 100 (5), 1938-1944.
52. Falk, H.; Meyer, J.; Oberreiter, M., A convenient semisynthetic route to hypericin. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **1993**, 124 (3), 339-341.
53. Huygens, A.; Kamuhabwa, A. R.; de Witte, P. A. M., Stability of different formulations and ion pairs of hypericin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, 59 (3), 461-468.
54. Sakamoto, K.; Ohno-Okumura, E., Syntheses and Functional Properties of Phthalocyanines. *Materials* **2009**, 2 (3), 1127.
55. Davidson, A. T., The effect of the metal atom on the absorption spectra of phthalocyanine films. *The Journal of Chemical Physics* **1982**, 77 (1), 168-172.
56. Darwent, J. R.; Douglas, P.; Harriman, A.; Porter, G.; Richoux, M.-C., Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. *Coordination Chemistry Reviews* **1982**, 44 (1), 83-126.

57. Herbst, W.; Hunger, K.; Wilker, G.; Ohleier, H.; Winter, R., Polycyclic Pigments. In *Industrial Organic Pigments*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2005; pp 421-566.
58. Dahlen, M. A., The Phthalocyanines A New Class of Synthetic Pigments and Dyes. *Industrial & Engineering Chemistry* **1939**, 31 (7), 839-847.
59. Claessens, C. G.; Hahn, U.; Torres, T., Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications. *The Chemical Record* **2008**, 8 (2), 75-97.
60. (a) Smertenko, P. S.; Kostylev, V. P.; Kislyuk, V. V.; Syngaevsky, A. F.; Zynio, S. A.; Dimitriev, O. P., Photovoltaic cells based on cadmium sulphide–phthalocyanine heterojunction. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **2008**, 92 (8), 976-979; (b) Guillaud, G.; Simon, J.; Germain, J. P., Metallophthalocyanines: Gas sensors, resistors and field effect transistors¹. *Coordination Chemistry Reviews* **1998**, 178–180, Part 2 (0), 1433-1484.
61. Oliveira, D. M.; Lacava, Z. G. M.; Lima, E. C. D.; Morais, P. C.; Tedesco, A. C., Zinc Phthalocyanine/Magnetic Fluid Complex: A Promising Dual Nanostructured System for Cancer Treatment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2006**, 6 (8), 2432-2437.
62. do Nascimento, F. B.; Manieri, T. M.; Cerchiaro, G.; Ribeiro, A. O., Synthesis of unsymmetrical phthalocyanine derivatives and their interaction with mammary MCF7 cells. *Dyes and Pigments* **2013**, 99 (2), 316-322.
63. Spiller, W.; Kliesch, H.; Wöhrle, D.; Hackbarth, S.; Röder, B.; Schnurpfeil, G., Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1998**, 2 (2), 145-158.
64. Engelmann, F. M.; Mayer, I.; Araki, K.; Toma, H. E.; Baptista, M. c. S.; Maeda, H.; Osuka, A.; Furuta, H., Photochemistry of doubly N-confused porphyrin bonded to non-conventional high oxidation state Ag(III) and Cu(III) ions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2004**, 163 (3), 403-411.
65. De Paula, L. F. Desenvolvimento de dispositivos de irradiação utilizando LED e sua aplicação à fotoinativação de *Staphylococcus aureus* e *Trichophyton rubrum*. Instituto de Química, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia Uberlândia 2008.
66. Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L., Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protocols* **2008**, 3 (7), 1125-1131.
67. Souza, M. I.; Silva, E. R.; Jaques, Y. M.; Ferreira, F. F.; Fileti, E. E.; Alves, W. A., The role of water and structure on the generation of reactive oxygen species in peptide/hypericin complexes. *Journal of Peptide Science* **2014**, 20 (7), 554-562.
68. Souza, M. I.; Jaques, Y. M.; de Andrade, G. P.; Ribeiro, A. O.; da Silva, E. R.; Fileti, E. E.; Ávila, É. d. S.; Pinheiro, M. V. B.; Krambrock, K.; Alves, W. A., Structural and Photophysical Properties of Peptide Micro/Nanotubes Functionalized with Hypericin. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, 117 (9), 2605-2614.

69. Gdaniec, M.; Liberek, B., Structure of cyclo(-l-phenylalanyl-l-phenylalanyl-). *Acta Crystallographica Section C* **1986**, 42 (10), 1343-1345.
70. Falk, H.; Meyer, J., On the homo- and heteroassociation of hypericin. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* **1994**, 125 (6), 753-762.
71. Sun, R.; Wu, X.; Hao, Z.; Zhang, X., Crystal structure and self-assembly property of sandwich-type mixed (phthalocyaninato)(porphyrinato) rare earth double-decker complexes. *Inorganica Chimica Acta* **2012**, 384 (0), 204-209.
72. Silverstein, R.; Webster, F. X.; Kiemle, D., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed.; LCT: Rio de Janeiro, 2007.
73. Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S., Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. 3 ed.; Harcourt College Publishers: Fort Worth, 2001.

Súmula Curricular

Dados Pessoais

Márcia Isabel de Souza Prado
Jundiaí/SP, 13 de dezembro de 1982.

Educação

Mestrado em Nanociências e Materiais Avançados
Universidade Federal do ABC, Santo André – SP, 2011

Bacharelado em Química
Faculdade Campo Limpo Paulista, Campo Limpo Paulista - SP, 2008

Formação complementar

Cristalografia Básica e Método de Rietveld. UFABC, Santo André/SP. (Carga horária: 32h). 2011

Microscopia Eletrônica de Varredura/LV. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron. Campinas/SP. (Carga horária: 18h). 2011

Conceitos e Aplicações em Fotoquímica. Sociedade Brasileira dos Químicos. (Carga horária: 6h). 2010

Artigos publicados

Souza, M. I.; Silva, E. R.; Jaques, Y. M.; Ferreira, F. F.; Fileti, E. E.; Alves, W. A.
The role of water and structure on the generation of reactive oxygen species in peptide/hypericin complexes. Journal of Peptide Science, v. 20, p. 554-562, 2014.

Souza, M. I.; Jaques, Y. M.; Andrade, G. P.; Ribeiro, A. O.; Silva, E. R.; Fileti, E. E.; Avilla, E. S.; Pinheiro, M. V. B.; Krambrock, K.; Alves, W. A.. Structural and Photophysical Properties of Peptide Micro/Nanotubes Functionalized with Hypericin. *Journal of Physical Chemistry. B*, v. 117, p. 2605-2614, 2013.

Martins, T. D.; **Souza, M. I.**; Cunha, B. B.; Takahashi, P. M.; Ferreira, F. F.; Souza, J. A.; Fileti, E. E.; Alves, W. A. Influence of pH and Pyrenyl on the Structural and Morphological Control of Peptide Nanotubes. *Journal of physical chemistry. C*, v. 115, p. 7906-7913, 2011.

Capítulos de livros publicados

Factori, I. M.; Silva, E. R.; Cipriano, T. C.; **Souza, M. I.**; Alves, W. A. Nanoestruturas peptídicas: estrutura, propriedades e aplicações. *Química Supramolecular e Nanotecnologia*. 1ªed.São Paulo: Atheneu, 2014, v. 5, p. 91-107.

Silva, E. R.; Liberato, M. S.; **Souza, M. I.**; Silva, R. F.; Matos, I. O.; Kogikoski JR., S.; Bianchi, R. M. C.; Alves, W. A. . Microscopy Tools for Investigating Nano-to-Mesoscale Peptide Assemblies.. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*. 5ed.Badajoz: Formatex Research Center, 2012, v. 5, p. 1456-1467.

Resumos em congressos:

Souza, M. I.; Nascimento, F. B.; Prieto, T.; Silva, E. R.; Ribeiro, A. O.; Alves, W. A. Antitumor activity in L-diphenylalanine/phthalocyanine conjugates. In: 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2015, Águas de Lindóia. FOT-018, 2015.

Souza, M. I.; Nascimento, F. B.; Silva, E. R.; Ribeiro, A. O.; Alves, W. A. Microtubos de L-difenilalanina funcionalizados com ftalocianinas. In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. MAT-066. (Apresentação oral)

Souza, M. I.; Silva, E. R.; Ribeiro, A. O.; Ferreira, F. F.; Alves, W. A. Estudo da influência da água em nanotubos de L-difenilalanina funcionalizados com hipericina na geração de oxigênio singlete. In: 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2013, Águas de Lindóia. CD de Resumo FOT-013. (Apresentação oral)

Souza, M. I.; Jaques, Y. M.; Silva, E. R.; Ribeiro, A. O.; Ferreira, F. F.; Fileti, E. E.; Alves, A. A. Structure Dependence of ROS Production in Peptide Nanotubes Functionalized with Hypericin. In: 1ST CONFERENCE ON PEPTIDE MATERIALS FOR BIOMEDICINE AND NANOTECHNOLOGY, 2013, Sorrento. Livro de Resumo - P29, 2013.

Souza, M. I.; Jaques, Y. M.; Ribeiro, A. O.; Fileti, E. E.; Pinheiro, M. V. B.; Krambrock, K.; Alves, W. A. Peptide nanostructures functionalized with hypericin. In: International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials, 2012, Nice. International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials (N.I.C.E. 2012), 2012. (Apresentação oral)

Souza, M. I.; Jaques, Y. M.; Fileti, E. E.; Ribeiro, A. O.; Krambrock, K.; Alves, W. A. Nanotubos de Peptídeos na Terapia Fotodinâmica. In: 35ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira dos Químicos, 2012, Águas de Lindóia. CD de Resumo MAT-094. (Apresentação oral)

Souza, M. I.; Ribeiro, A. O.; Silva, A. L.; Alves, W. A. Estudo da Intercalação da Hipericina em Nanotubos de L-Difenilalanina. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis - SC. CD de Resumo MAT-257, 2011.

Souza, M. I.; Martins, T. D.; Takahashi, P. M.; Alves, W. A. Estudo Espectroscópico de Nanotubos de Peptídeos Modificados com Sondas Fluorescentes. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia -SP. CD de Resumo MAT-042, 2010.

Souza, M. I.; Martins, T. D.; Takahashi, P. M.; Alves, W. A. Synthesis of pyrenyl-labeled peptide nanotubes. In: IX Brazilian MRS Meeting, 2010, Ouro Preto/MG. CD de Resumo - H563, 2010.

Atividades profissionais:

Metal Printing Indústria e Comércio LTDA

Cargo: Analista de laboratório

Atividades: Pesquisa e desenvolvimento de tintas UV, controle de qualidade de tintas metalográficas e matéria prima; análise físico-química; análise colorimétrica (espectrodensitômetro); aplicabilidade de tintas UV e convencionais; aplicabilidade de esmaltes e vernizes; análises titrimétricas; elaboração e interpretação de FISPQs; Conhecimentos NBR-ISO 9001:2000.

Prêmio

Painel premiado na Sessão Coordenada de Fotoquímica, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2013.