

Cláudia Sofia Pessa Buga

Nanossistemas mais eficientes para terapia fotodinâmica

Projeto de Dissertação na área científica de Engenharia Biomédica, orientada pelo Professor Hermínio José Cipriano de Sousa e pela Doutora Mara Elga Medeiros Braga e apresentada ao Departamento De Engenharia Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Fevereiro de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Dissertação em Engenharia Biomédica

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Sistemas mais eficientes para Terapia Fotodinâmica



Orientador: Professor Hermínio José Cipriano de Sousa

Orientadora: Doutora Mara Elga Medeiros Braga

Aluna: Cláudia Sofia Pessa Buga

Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

“The capacity to blunder slightly is the real marvel of DNA. Without this special attribute, we would still be anaerobic bacteria and there would be no music.”

— Lewis Thomas

Agradecimentos

Aproximando-me agora do final do meu percurso académico, não poderia deixar de agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento, quer a nível de estudos quer a nível pessoal.

Primeiramente gostaria de agradecer ao Professor Hermínio C. de Sousa e à Doutora Mara M. Braga por toda a disponibilidade, conhecimento partilhado e acima de tudo por me terem ajudado a encarar este projeto com a perseverança e disciplina requerida, incentivando-me sempre a dar o próximo passo e contribuindo com o seu apoio e materiais necessários para o fazer. Queria ainda deixar um agradecimento à Doutora Ana M. Dias, cujo auxílio e sugestões foram muitas vezes valiosas para o prosseguimento deste projeto.

À Sylvia Sousa, ao Gustavo Marques, ao Usman Syed e à Mariana Silva agradeço pela colaboração e auxílio na realização de algumas das experiências, bem como pelo precioso apoio dispensado ao longo deste projeto.

Ao Professor Abel Ferreira, à Professora Graça Rasteiro e ao Professor Miguel Morgado pela colaboração e disponibilização de equipamentos essenciais à realização deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer também a todo o incrível grupo do B18 que primou sempre pelo seu entusiasmo e dinamismo, e cujo apoio, disponibilidade e experiência partilhada foi inestimável para a conclusão do meu trabalho.

A todos os amigos que, embora não tão envolvidos neste trabalho, me encorajaram sempre e me deram o ânimo que por vezes escasseava. Fica assim um agradecimento especial à Rita, à Inês, ao Alexandre, ao Gonçalo, ao Bernardo, ao Miguel, e à Sofia.

Finalmente, mas não menos importante, à minha família, em especial aos meus pais, Francisco e Fátima, e à minha irmã Catarina por todos os sacrifícios que fizeram em meu favor, pelo apoio e dedicação incondicional e por terem construído os alicerces daquilo que fui capaz de conquistar até hoje.

Resumo

A terapia fotodinâmica (PDT) combina dois agentes terapêuticos relativamente inofensivos para o organismo humano, um composto fotossensível (PS) e a luz de um comprimento de onda adequado, com oxigênio molecular presente no meio, provocando assim a destruição seletiva dos tumores através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que criam stress e provocam a morte celular. A PDT afirma-se assim como uma alternativa viável e eficiente aos métodos tradicionais mais agressivos de terapias do cancro (quimioterapia e radioterapia). No entanto, e apesar de existirem já medicamentos aprovados para este tipo de terapia, estes ainda apresentam algumas limitações no que diz respeito à estabilidade e à seletividade dos veículos de administração terapêuticos, bem como à profundidade a que é possível desencadear o efeito anti tumoral pretendido.

Sendo assim, neste trabalho propõe-se a preparação de um sistema inovador baseado em nanocápsulas de sílica porosa, contendo no seu interior um PS (Protoporfirina IX, Pp IX) dissolvido num líquido que possui a capacidade de absorver, reter e libertar quantidades apreciáveis de oxigênio, mantendo a sua estabilidade química e mecânica e apresentando baixos níveis de toxicidade.

Estas nanocápsulas de sílica porosa foram desenvolvidas combinando técnicas de microemulsão e métodos de sol-gel em meio aquoso. Assim, numa primeira fase deste trabalho, foi necessário estudar e escolher qual o sistema de surfatantes mais adequado e qual o líquido disperso apropriado para usar na emulsificação. Esta fase envolveu o estudo preliminar de dois sistemas de surfatantes, tendo-se calculado as suas concentrações micelares críticas (CMC) pelo método do anel de du Noüy. Calcularam-se ainda os diâmetros hidrodinâmicos e as cinéticas de formação e degradação das emulsões obtidas por emulsificação de líquidos dispersos com uma grande capacidade de absorver, reter e libertar oxigênio: um perfluoroalcano (perfluorodecalina, PFD) e um líquido iónico (LI) da família dos fosfónios (trihexal(tetradecil)fosfónio bis(trifluorometilsulfonil)amida, [P_{6,6,6,14}][NTf₂]). Isto foi feito através do método de dispersão dinâmica de luz (DLS). Paralelamente, efetuaram-se ainda estudos de solubilidade da Pp IX em PFD e em [P_{6,6,6,14}][NTf₂], tendo-se concluído que a Pp IX só era solúvel em [P_{6,6,6,14}][NTf₂].

Optou-se assim, e numa segunda fase de trabalho, por estudar e desenvolver nanocápsulas de sílica porosa contendo o LI, (nc/Si-LI+Pp IX). Para isto, foi necessário estudar as condições experimentais da reação de hidrólise e de condensação da sílica a

partir de um precursor de alcoxi-silano (tetraetoxi silano, TEOS), as condições de processamento e lavagem/remoção e recoleção de água das nanocápsulas formadas, e as condições de armazenamento dos materiais, por forma a se obter nanocápsulas com características mais favoráveis para o nosso objetivo. Foram obtidas nanocápsulas para dois tempos de reação distintos (29 horas e 168 horas).

Após a obtenção das nanocápsulas em quantidade suficiente (através da realização de várias experiências de síntese e processamento), passou-se para a terceira fase deste trabalho, a qual consistiu na caracterização dos nanomateriais obtidos. Os diâmetros das nanocápsulas formadas foram avaliados através de DLS, microscopia ótica (OM), microscopia de varrimento eletrónico (SEM) e microscopia de transmissão eletrónica (TEM). A carga à superfície das nanocápsulas foi aferida por medidas de potencial zeta, e os rendimentos das reações foram estimados através de secagem em estufa, liofilização e análise termogravimétrica (TGA). Finalmente, as nanocápsulas foram sujeitas a testes para avaliar as suas capacidades de carregar/libertar oxigénio e de produzir espécies reativas de oxigénio (ROS) quando excitadas com luz visível ($\lambda=532$ nm).

Estes testes permitiram concluir que as nanocápsulas obtidas apresentavam dimensões numa gama adequada à sua utilização para PDT (100-300 nm) e que a sua superfície era carregada negativamente (< -25 mV). A análise de TGA permitiu calcular eficazmente a quantidade de LI e de sílica presente em cada amostra, sendo ainda possível concluir que os rendimentos estimados foram superiores para as amostras que permaneceram em suspensão aquosa, ao invés de serem secas em estufa ou liofilizadas, o que nos levou também a concluir que as nanocápsulas perdiam estabilidade, integridade e LI durante os vários processos de remoção de água. Os testes de carregamento e libertação de oxigénio permitiram concluir que, tanto as nanocápsulas como as emulsões iniciais de LI eram capazes de consumir e de libertar oxigénio, o que é de elevada importância para a sua utilização na PDT, pois permite aumentar a quantidade de oxigénio presente na zona do tratamento, promovendo e melhorando a eficácia de criação de ROS. Os ensaios preliminares de quantificação da atividade oxidante das nanocápsulas permitiram concluir que as nc/Si-LI+Pp IX apresentavam atividade oxidante e que este efeito era promovido durante os primeiros 300 minutos de ensaio, quando as nanocápsulas eram previamente saturadas com O₂.

Com este trabalho fica demonstrado que é possível encapsular um LI hidrofóbico em nanocápsulas de sílica porosa, usando técnicas de microemulsão com sistemas de surfatantes adequados, combinadas com métodos de sol-gel em meio aquoso. Foi também

demonstrado que essas nanocápsulas apresentavam algumas características favoráveis para a sua aplicação em PDT. Apesar de não ter sido ainda possível testar estas formulações em culturas celulares ou sistemas in-vivo, espera-se que num futuro próximo estudos adicionais possam comprovar e demonstrar o potencial destas novas formulações para as aplicações previstas.

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) combines two therapeutic agents, which are relatively harmless to the human organism, a photosensitizer (PS) and light at adequate wavelength, with molecular oxygen, thus inducing selective destruction of tumours through the generation of reactive oxygen species (ROS) that cause cellular stress and death. PDT stands itself as a viable and efficient alternative to the more aggressive traditional cancer therapy methods (such as chemotherapy and radiotherapy). However, and although several approved drugs for this therapy already exist, it still presents some limitations regarding the stability and selectivity of the therapeutic administration vehicles, as well as the deepness at which it is possible to initiate the desired anti tumour effect.

Therefore, in this work it is proposed an innovative PDT system based in porous silica nanocapsules, containing a PS (Protoporphyrin IX, Pp IX) dissolved in a liquid which has the ability to absorb, retain and release appreciable quantities of oxygen, while maintaining its stability and low toxicity levels.

These porous silica nanocapsules were developed combining microemulsion techniques and aqueous sol gel methods. Thus, and in the first phase of this work, it was necessary to study and choose which surfactant system was more adequate and which dispersed liquid would be appropriate to use in the emulsification. This phase involved the preliminary study of two surfactant systems, and the critical micellar concentrations (CMC) were calculated by the du Noüy ring method. The hydrodynamic diameters and the emulsion formation and degradation kinetics were obtained through the emulsification of two dispersive liquids with the capacity to absorb, retain and release oxygen: a perfluoroalkane (perfluorodecalin, PFD) and an ionic liquid from the phosphonium family (trihexyl(tetradecyl)phosphonium bis(trifluoromethylsulfonyl)amide, $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$). These results were obtained by dynamic light scattering (DLS). Simultaneously, the solubilities of Pp IX in PFD and in $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$ were also studied, and it was concluded that Pp IX was only soluble in $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$.

Therefore, and in the second part of this work it was chosen to develop porous silica nanocapsules containing IL, (nc/Si-IL+Pp IX). For this, it was necessary to study the experimental hydrolysis and condensation conditions for silica synthesis, using tetraethylorthosilicate (TEOS) as the silica precursor, as well as the processing and washing/water removal/recollection/storing conditions of the formed nanocapsules in order

to obtain nanocapsules with the best properties for our purposed goal. Nanocapsules were synthesized for two different reaction periods (29 hours and 168 hours).

After producing the nanocapsules in sufficient amounts (by performing several synthesis/ processing experiments), the third phase of this work consisted in the characterization of the obtained nano materials. The diameters of formed nanocapsules were evaluated by DLS, optic microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The superficial charge of the nanocapsules was evaluated by the zeta potential measurements, and the reaction yields were estimated by oven drying, freeze-drying and thermogravimetric analysis (TGA). Finally, prepared nanocapsules were subjected to tests in order to evaluate their abilities to absorb, retain and release oxygen and to produce reactive oxygen species (ROS) when excited with visible light ($\lambda=532$ nm).

These tests allowed to conclude that the prepared nanocapsules presented dimensions that are in an adequate range for PDT (100-300 nm) and that their surface charge was negative (<-25 mV). TGA analysis allowed the calculation of the relative amounts of LI and silica present in each sample. Results indicated that the estimated yields obtained when nanocapsules were stored in aqueous suspension were superior to those obtained for the oven dried and freeze dried ones, which led to the conclusion that nanocapsules were losing stability, integrity and LI during the employed water removal processes. The oxygen sorption and releasing tests led to the conclusion that both the prepared nanocapsules and the initial emulsions were able to consume and to release oxygen, which is of high importance for PDT use because it enables the increase of oxygen concentration located at the treatment area, thus promoting and improving the efficacy of ROS generation. The preliminary quantification of oxidant activity of the nanocapsules allowed to conclude that nc/Si-LI+Pp IX presented oxidant activity and that this effect was promoted during the first 300 minutes of the assay, when the nanocapsules were previously saturated with O₂.

With this work it was preliminarily demonstrated that it is possible to encapsulate a hydrophobic LI into porous silica nanocapsules, combining microemulsion techniques with adequate surfactant systems with aqueous sol-gel methods. It was also proved that those nanocapsules presented some favourable properties to be applied in PDT. Although it was not yet possible to test these formulations in cellular cultures nor in in-vivo systems, it is expected that in the near future additional studies will prove and demonstrate the potential of these new formulations for the envisaged applications.

Índice de matérias

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xv
Índice de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Abreviaturas	xxii
1 Motivações e Objetivos	1
2 A terapia fotodinâmica	3
2.1 Princípios funcionais da PDT.....	4
2.2 Efeitos biológicos da PDT.....	8
2.3 Fontes de luz e agentes fotossensíveis	9
2.4 Vantagens e limitações atuais da PDT	17
3 Nanosistemas para PDT.....	20
3.1 Tipos de sistemas	21
3.1.1 Micelas.....	21
3.1.2 Lipossomas	24
3.1.3 Nanoesferas e nanocápsulas	26
3.1.4 Uso de líquidos com elevada capacidade para absorver, reter e libertar oxigénio	30
4 Materiais e métodos.....	33
4.1 Materiais.....	33
4.2 Métodos de preparação e processamento	34
4.2.1 Concentração micelar crítica (CMC) para dois sistemas de surfatantes distintos 35	
4.2.2 Cinética de formação e de estabilidade das emulsões	36
4.2.3 Testes de solubilidade da Pp IX em PFD e em LI.....	39
4.2.4 Cápsulas de sílica porosa usando o método sol-gel em meio aquoso.....	39
4.3 Métodos de caracterização	41
4.3.1 Caracterização das nanocápsulas de sílica porosa	41
4.3.2 Composição, morfologia e rendimento de massa da reação de formação de micro/nano cápsulas de sílica porosa.....	42
4.3.3 Quantificação da absorção/libertação de oxigénio pelas micro/nano cápsulas de sílica porosa	43
4.3.4 Quantificação da produção de ROS pelas nanocápsulas de sílica porosa ...	46

5	Resultados experimentais e discussão	50
5.1	Concentração micelar crítica para dois sistemas de surfatantes.....	50
5.2	Cinética de formação e de estabilidade de emulsões PFD em água e LI em água usando dois sistemas de surfatantes	52
5.3	Nanocápsulas de sílica porosa usando o método sol-gel em meio aquoso	57
5.3.1	Evolução da dimensão e do potencial zeta das nc/Si-LI+Pp IX.....	57
5.3.2	Caraterização, morfologia e rendimento da reação de formação de nanocápsulas de sílica porosa	59
5.3.2	Quantificação da absorção/libertação de oxigénio pelas nanocápsulas de sílica porosa.....	68
5.3.2	Quantificação da atividade oxidante das nanocápsulas de sílica porosa	73
	Conclusão.....	79
	Trabalhos futuros	81
	Bibliografia	83
	Anexos	93
	Anexo A	93
	Anexo A1 – Representação esquemática dos meios de ação da PDT e principais agentes envolvidos no processo.....	93
	Anexo A2 – Representação gráfica do espetro de absorção da Protoporfirina IX.	93
	Anexo B - Concentração micelar crítica para vários sistemas de surfatantes	94
	Anexo C – Dados obtidos através de DLS	96
	Anexo D – Perfis da análise de TGA para os compostos usados no seu estado puro..	100
	Anexo E – Exemplos do cálculo dos K_{La} 's	102
	Anexo F - Ensaio de quantificação de ROS preliminares	103

Índice de Figuras

Figura 1 O princípio da PDT. Adaptado da referência 3.	4
Figura 2 Diagrama de Jablonski. Adaptado e simplificado a partir da referência 12.	6
Figura 3 Vias de destruição de tumores mediadas por PDT ilustrando as possíveis contribuições a partir de danos vasculares, morte celular direta e resposta imune do hospedeiro. Adaptado da referência 22.	9
Figura 4 Propriedades do PS ideal. Adaptado da referência 24.	12
Figura 5 Representação esquemática da conversão da Protoporfirina IX no grupo HEME. Estruturas químicas baseadas na referência 33.	16
Figura 6 Representação esquemática de alguns veículos de administração de fármacos frequentemente usados em formulações para PDT. Adaptado da referência 38.	20
Figura 7 Representação esquemática dos procedimentos efetuados.	35
Figura 8 Metodologia para obtenção de nanocápsulas de sílica porosa.	39
Figura 9 Representação esquemática do sistema experimental para os ensaios de quantificação da absorção/libertação de oxigênio e respetiva legenda.	44
Figura 10 Representação genérica do cálculo das constantes K_{La1} , K_{La2} e K_{La3}	46
Figura 11 Esquematização da reação do DPPH com ROS ($DPPH^{\cdot} \rightarrow DPPHR$) baseada na referência 98.	47
Figura 12 Representação dos resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfatantes para o sistema (1) excluindo o valor de tensão superficial da água (a) e incluindo o valor da tensão superficial da água no ajuste linear (b).	50
Figura 13 Representação dos resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfatantes para o sistema (2) excluindo o valor de tensão superficial da água (a) e incluindo o valor da tensão superficial da água no ajuste linear (b).	51
Figura 14 a) Cinética de formação para o sistema PFD/[S1:S2:S3]; b) Cinética de estabilidade para o sistema PFD/[S1:S2:S3].	52
Figura 15 a) Cinética de formação para o sistema LI/[S1:S2:0] obtida recorrendo à sonda microtip; b) Cinética de formação para o sistema LI/[S1:S2:0] obtida com a sonda macrotip.	55
Figura 16 a) Cinética de estabilidade para o sistema LI/[S1:S2:0] obtido com a sonda microtip; b) Cinética de estabilidade para o sistema LI/[S1:S2:0] obtido com a sonda macrotip.	55

Figura 17 Evolução dos valores de potencial zeta e pH da mistura reacional ao longo das sucessivas fases do processo de formação de cápsulas. Foram usadas para esta análise amostras de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 29 horas e de 168 horas.....	57
Figura 18 Evolução do diâmetro hidrodinâmico das partículas [nm] ao longo das progressivas fases da reação sol-gel. Foram usadas para esta análise amostras de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 29 horas e de 168 horas.	58
Figura 19 a) Imagem MO recolhida após 29 horas de reação de condensação de uma amostra seca ao ar (pré-diálise) A=50 µm; b) Imagem MO recolhida após procedimento de diálise para amostra seca em N2 e imersa em óleo (após diálise) A= 50 µm.....	59
Figura 20 Imagens obtidas através de lupa. a) Nanocápsulas após secagem na estufa em placas de Teflon (amostra de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 29 horas). b) Nanocápsulas liofilizadas (amostra de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 168 horas).....	60
Figura 21 Imagens obtidas através de SEM para cápsulas de reação de 168 horas, com Pp IX (a), b), c)) e sem Pp IX (d), e), f)) para três ampliações diferentes (10K, 50K e 100K da direita para a esquerda).	61
Figura 22 a) Amostra de cápsulas (de reação de 168 horas, com Pp IX) calcinada na mufla observada na lupa. b) microscopia de SEM de cápsulas calcinadas na mufla (escala: 200 nm).	62
Figura 23 Microscopia de TEM para amostra húmida de cápsulas de 168 horas de reação com Pp IX. a) e b) escala de 1000 nm (segmentada de 200 em 200 nm); c) e d) escala de 500 nm (segmentada de 100 em 100 nm).	63
Figura 24 Perfis de TGA obtidos para 2 amostras de cápsulas LI-Pp IX e para uma amostra de LI puro.....	64
Figura 25 Espectro obtidos através de FTIR do resíduo de sílica, do [P _{6,6,6,14}][NTf ₂], da Pp IX, de amostra de cápsulas liofilizadas, de amostra de cápsulas secas em estufa e de amostra de cápsulas em suspensão.	67
Figura 26 Ensaio de absorção de O ₂ : a) Com saturação prévia da água e adição de 5 mL de amostra (1:8 (v/v)); b) Com saturação prévia da água e adição de 10 mL de amostra (1:4 (v/v))..	69
Figura 27 Ensaio de libertação de O ₂ com saturação prévia da água e adição de 10 mL de amostra (1:4 (v/v)).	70

Figura 28 Representação comparativa dos valores de K_{La1} obtidos para os diversos ensaios. a) K_{La1} em função da concentração de LI no ensaio; b) K_{La1} em função do volume de amostra adicionado.....	72
Figura 29 Representação dos dados obtidos através do espectro UV-VIS e devidamente tratados para o ensaio com DPPH.....	74
Figura 30 Representação dos dados obtidos através do espectro UV-VIS para o ensaio com DPBF.....	76

Lista de Tabelas

Tabela 1 Fatores envolvidos no efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) de fármacos em tumores sólidos. Adaptado da referência 9.	5
Tabela 2 PSs em desenvolvimento clínico para PDT aplicada ao tratamento do cancro. Adaptado das referências 11, 24 e 28.	13
Tabela 3 Principais PSs já aprovados para o uso na PDT, e respetivas neoplasia. Adaptado das referências 11, 24 e 28.....	15
Tabela 4 Compilação de sistemas de direcionamento de fármaco para PDT.	29
Tabela 5 Solubilidade (mM) e difusibilidade ($10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$) de O ₂ em diversos LIs e na PFD.	32
Tabela 6 Especificações dos procedimentos realizados para emulsificação dos sistemas estudados e para estudo das cinéticas de formação e de estabilidade das mesmas. (Nota: por motivos de propriedade industrial não são indicados os valores precisos estudados).	37
Tabela 7 Condições experimentais dos testes de DPPH preliminares	48
Tabela 8 Temperatura de degradação característica para os componentes usados na formulação das cápsulas	64
Tabela 9 Dados obtidos através de TGA para as receitas de cápsulas completas.	66
Tabela 10 Quantificação comparativa da eficiência de difusão de oxigénio para os diferentes casos estudados, através dos K_{La}	71
Tabela 11 Variação dos valores de absorvância registados para os testes efetuados com DPPH.	75

Lista de Abreviaturas

ATR – do inglês: *Attenuated total reflection*

CIS – Conversão Intersistema

CMC – Concentração micelar crítica

CrEL – Cremóforo EL

DI – Desionizada

dH – Diâmetro hidrodinâmico

DLI – Intervalo de tempo entre administração e irradiação (do inglês: *Drug light interval*)

DLS – Dispersão dinâmica de luz (do inglês: *Dynamic light scattering*)

DPBF – 1,3-difenilisobenzofuran

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

EPR – do inglês electron paramagnetic resonance

EPR – Permeabilidade e retenção aumentada (do inglês: *Enhanced permeability and retention*)

FTIR – Espetroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (do inglês: *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*)

FDA – do inglês: *Food and Drug Administration*

LI – Líquido iônico

OM – Microscopia ótica (do inglês: *Optical microscopy*)

PDT – Terapia fotodinâmica (do inglês: *Photodynamic therapy*)

PFC – Perfluorocarbono

PFD – Perfluorodecalina

Pp IX – Protoporfirina IX

PS – Composto fotossensível (do inglês: *Photosensitizer*)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês: *Reactive oxygen species*)

RTILs - do inglês: *Room Temperature Ionic Liquids*

SEM – Microscopia de varrimento eletrônico (do inglês: *Scanning electron microscopy*)

SPR – do inglês surface plasmon resonance

TEM – Microscopia de transmissão eletrônica (do inglês: *Transmission electron microscopy*)

TEOS - Tetraetilortosilicato

TGA – Análise termogravimétrica (do inglês: *Termogravimetric analysis*)

1 Motivações e Objetivos

A terapia fotodinâmica (PDT) surge-nos como uma alternativa às terapias tradicionais invasivas aplicadas no tratamento do cancro que apresentam desvantagens para a saúde do doente, na medida em que não são seletivas e aumentam a probabilidade de reincidência de cancro a longo prazo. Neste sentido, e tendo em conta que todos os anos o número de diagnosticados incrementa, é imperativo que a investigação seja direcionada ao desenvolvimento de alternativas de tratamento que apresentem taxas de eficácia e segurança superiores às terapias tradicionais e que confirmem uma maior esperança de vida aos afetados.

A PDT pressupõe que uma molécula fotossensível seja localizada em tecidos malignos e posteriormente ativada através de irradiação com luz visível, levando à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e à consequente destruição das células cancerígenas, de forma rápida, precisa e não tóxica para as células saudáveis. É ainda aplicada em tratamentos paliativos, com elevado sucesso no aumento da esperança de vida e conforto do doente.

Apesar de todas as vantagens e potencialidades identificadas, há ainda aspetos que carecem de melhoramento científico de forma a otimizar a sua eficácia. Um dos problemas inerentes à PDT prende-se com a necessidade de administrar o composto fotossensível através de veículos estáveis, seletivos e não tóxicos, que permitam que este seja facilmente administrável e conserve as suas características como a sua fórmula química e tempo de vida. Para além disto, o sucesso da PDT está intimamente dependente da presença abundante de oxigénio no tecido a tratar e da profundidade a que os efeitos da terapia são desencadeados, o que constitui uma desvantagem na medida em que muito frequentemente os tumores sólidos apresentam uma perfusão de oxigénio heterogénea, o que leva à existência de zonas hipóxicas.

Numa tentativa ultrapassar algumas destas limitações já conhecidas, neste trabalho pretende-se desenvolver uma formulação de nanocápsulas de sílica porosa que sejam biocompatíveis e não tóxicas, eficazes para PDT aplicada ao tratamento do cancro. Essas cápsulas serão preenchidas por um agente fotossensível (Protoporfirina IX), dissolvido num líquido iónico ([P_{6,6,6,14}][NTf₂]) que, para além de ser um solvente eficaz para a Pp IX, se espera que seja responsável por manter uma concentração de oxigénio molecular elevada, pois é capaz de absorver e libertar grandes quantidade de O₂ nos tecidos circundantes, o que

permite a formação de ROS que conseqüentemente desencadeiam a morte celular das células cancerígenas. Para isso propõe-se a obtenção de uma microemulsão estabilizada por um sistema de surfatantes seguida da produção de partículas através do método de sol-gel em meio aquoso de forma a se obterem nanocápsulas de sílica porosa. Adicionalmente pretende-se ainda caracterizar química, física e morfologicamente as cápsulas obtidas, quantificar a difusão de oxigênio pelo sistema e estudar a produção de espécies reativas de oxigênio pelas cápsulas irradiadas.

2 A terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) é um tratamento quimioterapêutico que envolve 1) administração e acumulação seletiva de um composto fotossensível (PS), 2) uma área alvo onde exista uma boa perfusão de oxigênio e 3) posterior irradiação com luz com comprimento de onda adequado, com o objetivo de induzir a morte celular. Estas três etapas acima enumeradas participam numa reação fotoquímica na qual o PS é ativado pela luz e interage com o oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o singlete de oxigênio ($^1\text{O}_2$) e radicais livres, que são altamente citotóxicos e capazes de causar a morte de células, incluindo as cancerígenas por necrose, apoptose ou autofagia ^{1,2}. Apenas células simultaneamente expostas a estas três etapas sequenciais são destruídas, o que confere a esta terapia uma elevada seletividade para certos tipos de células, caracterizada não só por uma acumulação preferencial do composto fotossensível nestas, como também da ativação precisa do mesmo pela luz.

Desde a sua origem nos inícios do século XX e da sua primeira demonstração moderna, por Dougherty et al. em 1975, a terapia fotodinâmica tem sido alvo de investigação intensa tendo-se afirmado como uma alternativa importante e inovadora para o tratamento de tumores malignos, servindo também como método de pesquisa e prática pré-clínica. Deste então, terão sido realizados mais de 200 ensaios clínicos com o intuito de estudar e caracterizar a eficácia da terapia fotodinâmica, sendo que, diversos artigos de revisão recentemente publicados têm vindo a revelar sistematicamente que esta é uma opção credível para o tratamento de tumores sólidos, não metastizados e cujo acesso por uma fonte de luz seja possível, especialmente no caso de melanomas malignos e pré malignos. É ainda usado no tratamento de cancro do esófago e de colangiocarcinomas inoperáveis. Para além disso, nas aplicações cutâneas a terapia fotodinâmica tem a vantagem de permitir tratar várias lesões ao mesmo tempo. Outros alvos terapêuticos para os quais existem compostos fotossensíveis em desenvolvimento são o cancro da bexiga, fígado, ductos biliares, pâncreas, colo do útero e cérebro ³.

Para além das utilizações clínicas contra o cancro, esta terapia já foi implementada com sucesso no tratamento de condições como a acne, infeções microbianas, psoríase e herpes ⁴.

2.1 Princípios funcionais da PDT

A PDT é um processo composto por três passos principais: a administração do PS, distribuição e acumulação seletiva do mesmo na zona de interesse e finalmente irradiação da lesão.

Após a administração do composto fotossensível, é necessário aguardar um determinado período para que o composto fotossensível se espalhe sistemicamente e se acumule preferencialmente no tecido alvo. Este período designa-se por DLI (do inglês Drug-light interval) e depende da via de administração, do tipo de composto fotossensível, da sua possível funcionalização e das suas propriedades cinéticas e de biodistribuição ⁵. Posteriormente, a área tumoral é irradiada com luz no comprimento de onda adequado (normalmente correspondente à banda de absorção mais intensa do composto fotossensível), sendo que atualmente a irradiação pode ser direcionada a qualquer parte do corpo através de dispositivos de fibra ótica flexíveis ⁵ (Figura 1).

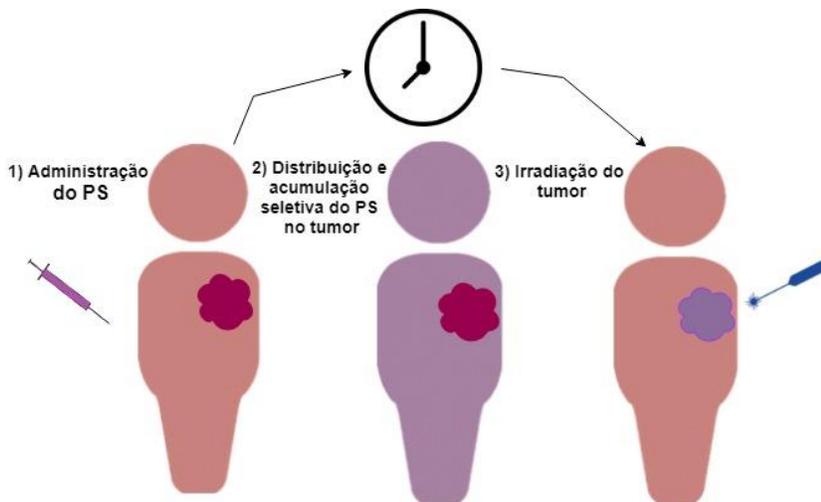


Figura 1 O princípio da PDT: 1) O composto fotossensível (PS) é administrado sistemicamente ou topicamente. 2) Após um período de tempo de distribuição sistémica de PS (DLI), este acumula-se seletivamente no tumor. 3) Irradiação ativa o PS e, na presença de oxigénio molecular é iniciada a reação fotoquímica que culmina com a produção de singlete de oxigénio (1O_2). Adaptado da referência 3.

A acumulação do composto fotossensível na área neoplásica ocorre graças ao efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR), nomeado por Maeda et al ⁷ e que toma partido da vasculatura tumoral atípica e permite que partículas com certas características entrem no tecido necrótico, ao mesmo tempo que suprime a filtração linfática e as obriga a permanecerem nas zonas alvo por períodos mais longos (24 horas ou mais) ⁷. Este fenómeno, que ocorre naturalmente e sem necessidade de modificação da superfície das partículas em

questão, tem funcionado como a principal plataforma nanotecnológica de distribuição específica de fármacos aos tumores ^{7,8}. Com o objetivo aumentar o tempo de circulação destas partículas na corrente sanguínea, até que sejam aprisionadas nas massas tumorais, as nanopartículas formuladas devem ter um diâmetro limite até cerca de 300 nm e de ser preferencialmente hidrofílicas na superfície externa ⁸. Os vasos sanguíneos da maioria dos tumores sólidos possuem características únicas que se encontram enumeradas na Tabela 1 e que não se observam na vasculatura normal, sendo responsáveis pela EPR ⁹.

Tabela 1 Fatores envolvidos no efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) de fármacos em tumores sólidos. Adaptado da referência 9.

<ul style="list-style-type: none">• Angiogênese (mecanismo responsável pelo crescimento de novos vasos sanguíneos) extensiva e consequente elevada densidade vascular;
<ul style="list-style-type: none">• Produção intensiva de mediadores vasculares, tais como a bradicinina, o óxido nítrico, VPF/VEGF e outras citocinas, prostaglandinas, colagenase e peroxinitrito, etc, que promovem a permeabilidade vascular (entrada de nanopartículas para os vasos sanguíneos);
<ul style="list-style-type: none">• Arquitetura vascular defeituosa, causada pela carência de células musculares lisas, carência ou inexistência de recetores para a Angiotensina II, elevados hiatos nas junções célula-célula endoteliais e conformação anômala como bifurcação ou estiramento dos vasos;
<ul style="list-style-type: none">• Drenagem linfática enfraquecida de macromoléculas e lípidos presentes no tecido intersticial (promove o efeito de retenção vascular).

As características enumeradas na tabela acima aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos dos tecidos tumorais certos compostos, como a nanopartículas com diâmetros preferencialmente entre os 10 e os 200 nm (janela terapêutica mais eficaz), sendo possível no entanto obter-se este efeito para partículas até aos 300 nm ^{7,8}. Após a entrada das partículas para os vasos sanguíneos do tumor, a sua saída é inibida, já que o efeito de drenagem linfática nos microambientes tumorais é enfraquecido. A maioria dos fármacos acumula-se nos tumores em concentrações 5-10 vezes superiores às concentrações presentes no plasma e nos tecidos normais, 24 horas após a sua administração ^{7,9}.

Como forma de tornar mais eficaz o direcionamento ao tumor e evitar a ação imunitária do organismo contra as mesmas é ainda possível modificar a superfície das nanopartículas, melhorando o efeito de EPR ¹⁰.

A obtenção dos efeitos desejados depende, portanto, do tipo de composto fotossensível e dose administrada, da sua localização intracelular, do intervalo de tempo entre a administração do fármaco e a irradiação (geralmente entre 24 a 48 horas para permitir que

o PS se acumule no tumor por EPR), da dose total de luz aplicada, do seu comprimento de onda, das características do tumor, da disponibilidade local de oxigênio, e ainda da modificação ou não da superfície das nanopartículas ¹⁰. A eficácia da terapia fotodinâmica depende assim da conjugação precisa destes componentes (e suas variáveis), o que representa um grande desafio no que toca à otimização dos respetivos protocolos terapêuticos ¹¹.

Ao ser irradiada com luz no comprimento de onda adequado, a molécula fotossensível interage com o oxigênio molecular originando várias espécies reativas de oxigênio (ROS) que danificam as células alvo via apoptose, necrose ou autofagia. As moléculas fotossensíveis funcionam assim como catalisadores, que ao absorver a radiação, convertem o O₂ num conjunto de ROS – singlete de oxigênio (¹O₂) e radicais livres, tais como OH[•], O₂^{-2•} e O₂^{-•} ⁶.

O mecanismo de ação da PDT assenta no facto do composto fotossensível (PS) ter uma configuração eletrónica estável com um estado singlete no nível mais baixo de energia (¹PS₀). Sob ativação, o composto fotossensível, no estado basal de energia absorve um fóton e é promovido a um estado singlete excitado (¹PS*). O estado excitado pode, em seguida, relaxar novamente para o estado de energia basal emitindo um fóton de fluorescência ou pode converter-se no estado tripleto (³PS*) via conversão intersistema, que envolve uma variação de spin do eletrão. Este estado tripleto é um estado fotoativo, que pode por sua vez interagir com o oxigênio molecular e produzir ROS, através de dois tipos de reações principais – Tipo I e Tipo II- dependentes da concentração de oxigênio (Figura 2) ^{4,6}.

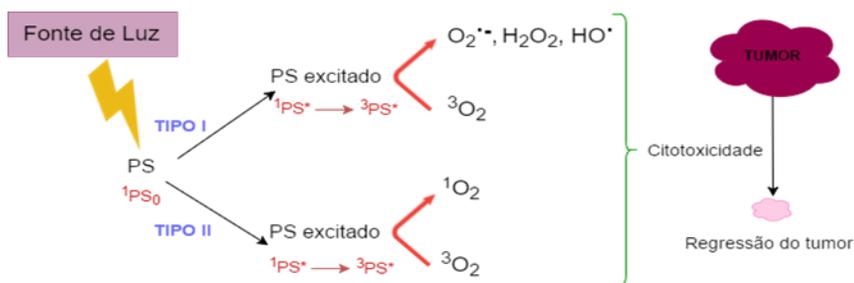


Figura 2 Diagrama de Jablonski. Adaptado e simplificado a partir da referência 12.

Na reação do Tipo I, o composto fotossensível transfere um eletrão a várias moléculas recetoras, produzindo radicais livres ou iões superóxido resultantes do hidrogénio ou da transferência de eletrões ⁶. Ocorre em condições de baixa concentração de oxigênio no tecido

e baseia-se na reação entre o estado tripleto excitado do composto fotossensível ($^3\text{PS}^*$) e o tecido lesado, que é um substrato na reação. Desta reação resultam radicais que interagem rapidamente com o oxigênio presente no ambiente reacional e conduzem à produção de ROS que danificam o tecido lesado (cancerígeno) através de vias cujo caráter teórico será desenvolvido no capítulo seguinte (2.2 Efeitos biológicos da PDT) ⁴.

No Tipo II, a reação conduz à produção de um estado de oxigênio eletronicamente excitado e altamente reativo, conhecido como singleto de oxigênio. Na PDT, os processos do Tipo II são mais relevantes e a geração do $^1\text{O}_2$ é responsável por causar danos irreversíveis às células tumorais ⁶. Esta via ocorre predominantemente em situações em que existem elevadas concentrações de oxigênio no tecido examinado e tem por base interações que se desenrolam entre o estado tripleto excitado do composto fotossensível ($^3\text{PS}^*$) e o oxigênio. É portanto a via principal nos organismos humanos e processa-se quando o $^3\text{PS}^*$ transfere energia para o tripleto de oxigênio, conduzindo à geração de singleto de oxigênio excitado ⁴.

Para além de atingir diretamente as células cancerígenas, através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a terapia fotodinâmica danifica a vasculatura circundante ao tumor, causando enfarte arterial local e podendo ativar resposta imune contra as células tumorais, pois ao provocar inflamação nos tecidos estimula o influxo de neutrófilos e a ativação consequente de uma resposta imunitária de longo prazo ⁶.

A disponibilidade de oxigênio molecular nos tecidos a tratar tem um efeito profundo no sucesso dos resultados obtidos após aplicação da PDT, já que na sua ausência a terapia não vai ter qualquer efeito anti tumoral. Para além disso, é sabido que células hipóxicas de tumores sólidos são geralmente resistentes à PDT. É possível reconhecer dois tipos distintos de hipoxia: i) hipóxia pré-existente em células tumorais, que resulta do desenvolvimento fisiológico do tumor e existe em muitos tumores sólidos; ii) hipóxia induzida pela PDT, resultante do rápido consumo do fornecimento de oxigênio molecular local. Neste sentido, a monitorização da oxigenação do tumor durante a PDT torna-se relevante para o entendimento dos mecanismos fisiológicos básicos e da dosimetria adequada para a terapia ^{12,13,14}. A tensão intra-tumoral de oxigênio (pO_2) pode ser medida por eléctrodos sensíveis a oxigênio, métodos de fluorescência não-invasivos, ou outras técnicas de espectroscopia ¹⁵.

Várias técnicas têm sido propostas para contornar a depleção de oxigênio pré-existente ou induzida pela PDT. Uma delas consiste no fracionamento da irradiação através

de períodos controlados de irradiação/descanso no escuro para que o fornecimento de O₂ aos tecidos seja reestabelecido durante o período de descanso, compensando assim a depleção causada pelas reações fotoquímicas. No entanto, esta técnica apresenta a desvantagem de apenas colmatar o problema causado pela depleção de oxigénio induzida pela PDT, não afetando as células que se encontram em pré-hipóxia. Para além disso, o fracionamento da irradiação acarreta um aumento de tempo necessário para administração de uma determinada dose de luz ^{16,17,18}. A utilização de líquidos com elevado poder de retenção e libertação de oxigénio (como é o exemplo dos perfluoroalcanos) nas formulações de veículos de PS podem também ajudar a mitigar este problema de depleção de O₂, bem como servir para diminuir o tempo de descanso no escuro no caso de se optar pelo fracionamento da irradiação, pois promovem o aumento rápido de oxigénio na zona a tratar, servindo como uma possível solução para mitigar a problemática da disponibilidade de oxigénio molecular.

Foram já realizados também ensaios clínicos de PDT recorrendo a câmaras hiperbáricas, com o objetivo de estimular híper oxigenação na zona do tratamento ^{19,20,21}. Embora os resultados obtidos não tenham sido conclusivos, estes demonstraram que a hiperoxigenação permitiu estender o período de sobrevivência em doentes com carcinomas do esófago. Para além disso, apesar da aplicação de oxigénio hiperbárico requerer a utilização de câmaras pressurizadas, cuja disponibilidade é limitada, estudos pré-clínicos permitiram já demonstrar que híper oxigenação normobárica (a condições de pressão normais) é tão ou mais eficaz que a hiperbárica ^{12,13}. A hiperoxigenação dos tecidos permite oxigenar as células com hipóxia pré existente, tornando-as susceptíveis à PDT, bem como compensar pela depleção de oxigénio durante as reações fotoquímicas pois aumenta a disponibilidade de O₂ assumindo-se assim como uma alternativa atrativa para resolver as questões associadas à hipoxia registada durante a PDT.

2.2 Efeitos biológicos da PDT

Existem três mecanismos identificados que contribuem para a diminuição visível do volume (e por vezes até desaparecimento) das lesões tumorais quando tratadas por PDT. São eles 1) o efeito vascular, que se caracteriza pela ocorrência de danos associados à vasculatura do tumor, caracterizado pela formação de coágulos que causam privação de oxigénio e nutrientes e conseqüente enfarte das células alvo; 2) o efeito citotóxico direto sobre as células

neoplásicas, no qual as espécies reativas de oxigênio, geradas pelas vias descritas acima podem causar morte celular direta por apoptose e/ou necrose e por último 3) o efeito imunitário, despoletado pela ação inflamatória e que ativa uma resposta imune contra células tumorais remanescentes ou metastáticas, fulcral para a cura a longo prazo do cancro. Apesar de se saber que estes três mecanismos estão interrelacionados e que a sua combinação é requerida para uma cura eficaz e de longo prazo, a importância relativa de cada um ainda não foi clarificada ²².

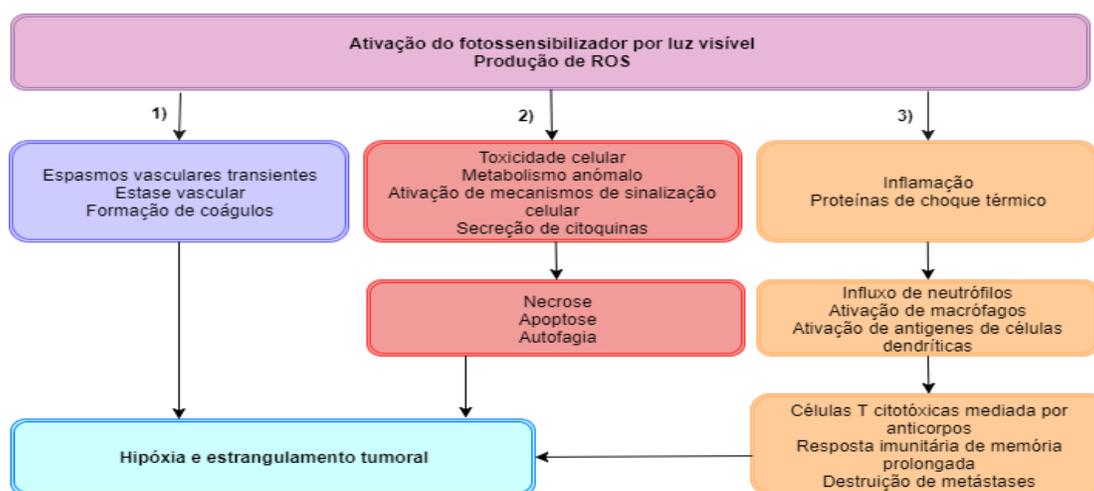


Figura 3 Vias de destruição de tumores mediadas por PDT ilustrando as possíveis contribuições a partir de danos vasculares, morte celular direta e resposta imune do hospedeiro. Adaptado da referência 22.

Na Figura 3 encontram-se esquematizadas as vias de morte acima referidas e na Figura A1 do anexo encontra-se a representação da evolução dos danos provocados no tumor bem como os agentes celulares que medeiam.

2.3 Fontes de luz e agentes fotossensíveis

A seleção do sistema de irradiação está dependente do espectro de absorção do PS selecionado, do tamanho e localização do tumor e da dimensão e preço do sistema a usar. Para tratamentos dermatológicos, onde o acesso à área alvo é fácil, o método base é a utilização de lâmpadas associadas a fibras óticas. As lâmpadas são baratas, requerem pouca manutenção e possuem um espectro de emissão alargado, o que obriga à utilização de um filtro

de banda estreito em frente à fonte de luz para selecionar o comprimento de onda adequado ao máximo de absorção do composto fotossensível ¹¹.

De forma a melhorar o desempenho, reduzir custos, e diminuir a dimensão destes sistemas, as lâmpadas têm vindo a ser substituídas por díodos emissores de luz (LEDs). O uso da terapia fotodinâmica para tratamento de tumores internos e/ou de maiores dimensões (não diretamente acessíveis à luz) requer o uso de sistemas laser acoplados a fibras óticas que permitam o envio de luz de forma precisa e em doses apropriadas à maioria das partes do organismo ¹¹.

A propagação de luz nos tecidos é determinada maioritariamente pelos fenómenos de difração, absorção, reflexão e transmissão, da composição do tecido e do comprimento de onda da luz. A estrutura dos tecidos não é uniforme devido à presença de macromoléculas, organelos celulares e outras estruturas, que contribuem para a difração da luz, especialmente para comprimentos de onda mais baixos. Para comprimentos de onda inferiores a 600 nm verifica-se absorção da luz por cromóforos endógenos, tais como a hemoglobina ou a melanina, ao passo que, acima dos 1300 nm a absorção de luz pela água dos tecidos aumenta substancialmente pelo que o efeito clínico perde qualidade. Para além disso, luz com comprimento de onda superior a 800 nm não confere energia suficiente para gerar tripletos de composto fotossensível que sejam eficientes para transferir energia ao oxigénio molecular. Neste sentido, assume-se que a janela fototerapêutica de comprimentos de onda está situada entre os 600 e os 800 nm (apesar desta limitação, neste trabalho o PS não foi testado in vivo, pelo que foi possível recorrer a um laser de 532 nm para efetuar testes de atividade oxidante) ¹¹.

Por sua vez, os PSs são compostos que absorvem energia da luz a comprimentos de onda específicos e que, posteriormente, utilizam esta mesma energia para desencadear uma série de reações com a participação do oxigénio molecular, que resulta na morte das células cancerígenas. A principal característica dos PSs, e a mais atrativa no que toca à terapia fotodinâmica contra o cancro, é a capacidade destes, ao serem integrados em nanopartículas, se acumularem preferencialmente no tecido tumoral (através de EPR) e desencadearem aí a produção de agentes citotóxicos indutores da morte do tecido tumoral alvo ²³.

Dentre os diversos tipos de PSs utilizados destacam-se as classes das porfirinas, clorinas e ftalocianinas. As porfirinas apresentam elevada afinidade para lipoproteínas de

baixa densidade (LDL) que se encontram em maior quantidade nos tecidos tumorais sendo que esta propriedade melhora a seletividade e biodisponibilidade dos compostos porfirínicos para o tecido tumoral, acumulando-se nessas células e possibilitando uma ação mais localizada da terapia fotodinâmica²⁴. Para além disso, graças à produção de ácido láctico nas células tumorais (devido a uma alteração no mecanismo respiratório das células), os baixos valores de pH do fluido intersticial do tecido tumoral (6,0-7,0) relativamente ao tecido normal (7,2-7,4) podem também contribuir para um incremento da acumulação das porfirinas nas células, já que com o aumento da acidez, aumenta a ionização das porfirinas, tornando-as mais hidrossolúveis e podendo estas ser direcionadas para o tumor de forma seletiva^{24,25,26}.

Apesar de todas as vantagens enunciadas, as porfirinas que apresentam uma elevada lipossolubilidade têm maior tendência para a auto agregação em solução aquosa, sofrendo alterações cromofóricas e consequente diminuição da produção de singleto de oxigénio por irradiação. Podem também sofrer reações de fotobranqueamento, ou seja, fotodecomposição química induzida pela luz, transformando-se em espécies com características fotofísicas que condicionam o efeito terapêutico da terapia fotodinâmica²⁴.

A agregação consiste num fenómeno que ocorre em solução e que envolve o estabelecimento de interações entre moléculas de PS (auto agregação) ou entre o PS e o solvente. Apesar do processo de auto agregação nas porfirinas não estar bem esclarecido, sabe-se que as moléculas podem associar-se em forma de dímeros, trímeros, oligómeros e, dependendo da extensão da agregação, pode ocorrer precipitação. A formação de agregados é um processo reversível que geralmente se encontra em equilíbrio, no entanto deve ser prevenido ao máximo visto que pode causar a alteração do espetro eletrónico da porfirina, provocando o alargamento das bandas (Q e S) e o deslocamento do comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max})²⁷. Já o processo de fotobranqueamento ou fotodegradação de um composto fotossensível consiste na modificação da sua estrutura, provocada pelas espécies reativas de oxigénio (ROS) através de foto-oxidação ou foto-redução do PS, o que reduz a quantidade de composto inicial e de ROS, originando uma perda na eficiência do tratamento e uma incompleta destruição do tumor²⁶. Existem dois tipos de fotodegradação irreversível que levam a modificações permanentes na estrutura do PS, sendo eles a foto-modificação (modificação da estrutura do PS e consequente diminuição na intensidade de absorção e emissão de fluorescência em alguns comprimentos de onda) e o fotobranqueamento

verdadeiro (as mudanças químicas são profundas e resultam em fragmentos pequenos que não têm absorção apreciável na região do visível. O fragmento torna-se incolor e sem interesse para PDT ²⁶.

Sendo assim, para que um determinado composto possa ser usado na terapia fotodinâmica, este não deve sofrer fotobranqueamento ou fotodegradação durante o tratamento clínico. No entanto, se a velocidade do fotobranqueamento for lenta, e não interferir no tratamento, este passa a ter interesse clínico, já que a fase de eliminação do PS após a terapia é promovida, diminuindo o intervalo de tempo que o doente tem que ficar ao abrigo da luz solar por forma a evitar fotossensibilidade cutânea ²⁴.

Tendo em conta todas as questões acima abordadas, o PS ideal deve apresentar as propriedades presentes na Figura 4.

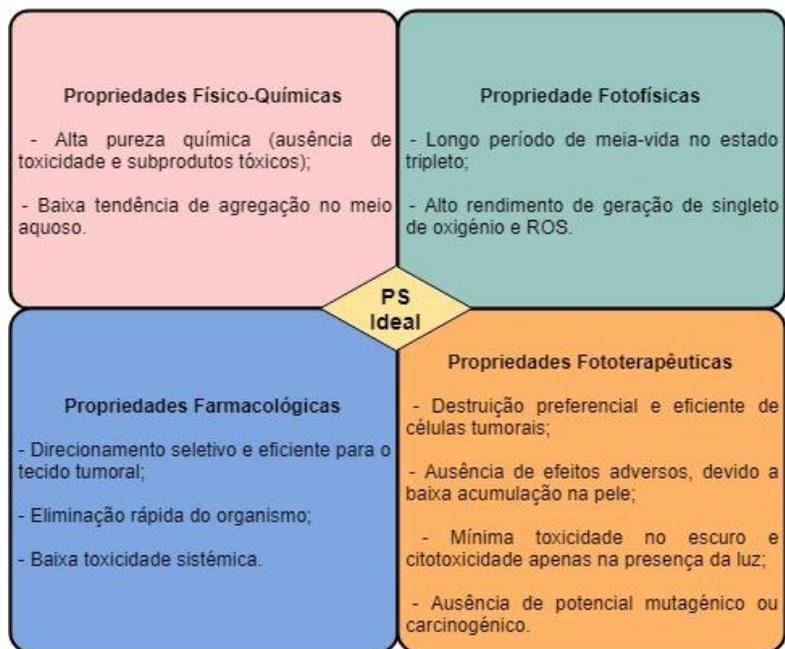


Figura 4 Propriedades do PS ideal. Adaptado da referência 24.

As primeiras gerações de PSs correspondem à Hematoporfirina (Hp) e ao Photofrin® (derivado da hematoporfirina, HpD), sendo este último o primeiro agente fotossensível de sempre a ser aprovado em 1993, no Canadá. Atualmente já foi aprovado por várias agências de saúde, sendo utilizado no tratamento de diversos tipos de neoplasias em diversos países, como por exemplo, a França, a Alemanha e o Japão, tendo sido considerado como terapia de

eleição contra diversos cancros, tais como o cancro do pulmão, esófago, bexiga, cérebro, mama e estados precoces de cancro cervical ¹¹.

Apesar da primeira geração de compostos fotossensíveis representar um progresso de importância incontestável a nível científico, esta geração está associada a compostos com baixa seletividade para lesões malignas e com fraca absorção no espectro do vermelho, o que os torna apenas moderadamente ativos em zonas de tecido mais profundas. A eliminação destes compostos é consideravelmente lenta, o que resulta numa fotossensibilidade prolongada do tecido irradiado (até 6 semanas após o tratamento) e são constituídos a partir de misturas complexas de derivados das hematoporfirinas, exigindo métodos de isolamento e purificação complexos e de custos elevados ¹. Neste sentido, surgiu a necessidade de se desenvolverem fármacos alternativos para serem usados como fotossensibilizadores mais eficazes o que culminou com o surgimento da segunda geração de compostos fotossensíveis ¹.

A segunda geração de PSs, constituída por derivados das porfirinas, ftalocianinas, texafirinas, purpurinas e clorinas, tem sido desenvolvida com o objetivo de melhorar o desempenho relativamente aos compostos da primeira geração. Face à primeira geração, têm a vantagem de apresentarem ausência de toxicidade e de formação de subprodutos tóxicos, são bem caracterizados, conseguindo gerar singletos de oxigénio eficazmente e têm gama de absorção máxima no espectro eletromagnético acima dos 630 nm, à qual a penetração da luz nos tecidos é amplificada. A sua seletividade para tecidos malignos e eliminação relativamente mais rápida do organismo reduz a fotossensibilidade da zona tratada (até duas semanas) ²⁸.

Tabela 2 PSs em desenvolvimento clínico para PDT aplicada ao tratamento do cancro. Adaptado das referências 11, 24 e 28.

PS	λ Excitação (nm)	Patologia(s) alvo de estudo	Fase clínica
Porfímero de sódio	630	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro de pele metastático derivado de cancro da mama • Carcinoma hepatocelular • Cancro do pâncreas • Cancro da bexiga • Cancro da cabeça e pescoço • Mesotelioma • Tumores do SNC • Colangiocarcinoma 	<p>I</p> <p>I</p> <p>I</p> <p>II</p> <p>II</p> <p>II</p> <p>II</p> <p>II/III</p>

Continuação da Tabela 2

Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)	635	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro da cabeça e pescoço • Neurofibroma dérmico benigno • Carcinoma das células basais • Cancro do colon • Cancro cervical 	I I II II II
Hexaminolevulinato (HAL)	635	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro cervical • Carcinoma de células basais 	II I/II
INN-Temoporfina	652	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro do pulmão de não pequenas células 	I
Chlorin e6	654	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro do pulmão de não pequenas células 	II
Talaporfina	664	<ul style="list-style-type: none"> • Glioma • Carcinoma Hepatocelular 	II III
HPPH	665	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro da cabeça e pescoço • Mesotelioma • Cancro do pulmão 	II I II
Ftalocianina de Silício (Pc4)	675	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro de pele não melanoma • Linfoma não Hodgkin cutâneo de células T 	I I
Verteoporfina	689	<ul style="list-style-type: none"> • Metástases vertebrais • Cancro do pâncreas • Sarcoma dos tecidos moles 	I I/II II
Padeliporfina	753	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro dos rins • Cancro da próstata 	II III
Luz11® (Redaporfina)	749	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro da cabeça e pescoço avançado 	I/II
Tookad®	753	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro da próstata 	III
Lutrin®	732	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro da próstata • Cancro da mama • Melanoma maligno 	I I I

Atualmente, os fármacos já aprovados pela FDA para a terapia fotodinâmica são o Photofrin® (porfímero de sódio), Visudyne® (verteporfina), Levulan® (5-ácido aminolevulínico, 5-ALA) e Metvixia® (ácido metil aminolevulínico). O Foscan® (temoporfina) já recebeu também aprovação para tratamento de tumores do pescoço e cabeça na União Europeia. Com exceção da 5-ALA (que é um pró-fármaco e pode ser convertido em protoporfirina IX), todos os restantes fármacos listados acima são moléculas baseadas em porfirinas que são hidrofóbicas e, conseqüentemente têm baixa solubilidade em água. Na composição destes compostos usam-se excipientes que favorecem a solubilização, tais como misturas lipídicas (como no Visudyne®) e etanol/poli(propilenoglicol) (como no Foscan®) e permitem a sua administração por injeção intravenosa¹¹. De entre os modos de aplicação de PS que se encontram já aprovados destacam-se os cremes de aplicação tópica, formulações lipossomais, injeções salinas e emulsões²⁹.

Existem também esforços focados no desenvolvimento de PSs de terceira geração. Neste caso o objetivo prende-se com a formulação de compostos fotossensíveis modificados

com conjugados biológicos, tais como péptidos ou anticorpos, cujo alvo são recetores expressos mais intensivamente em células tumorais. Teoricamente era expectável que esta prática aumentasse consideravelmente a seletividade e consequentemente a eficiência da PDT, no entanto, nas poucas aplicações clínicas já testadas verificou-se que a seletividade *in-vivo* não foi consideravelmente aumentada ³⁰.

Tabela 3 Principais PSs já aprovados para o uso na PDT, e respetivas neoplasia. Adaptado das referências 11, 24 e 28.

PS	λ Excitação (nm)	Nome comercial	Indicação aprovada
Porfímero de sódio	630	Photofrin ® (EUA)	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro esofágico • Cancro endobronquial • Esófago de Barret
Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)	635	Levulan ® (EUA)	<ul style="list-style-type: none"> • Queratose actínica
		Ameluz ® (EU)	<ul style="list-style-type: none"> • Queratose actínica
		Gliolan ® (EU)	<ul style="list-style-type: none"> • Glioma (agente de contraste em cirurgia)
Metil-aminolevulinato (MAL)	635	Metvixia ® (EUA)	<ul style="list-style-type: none"> • Queratose actínica
		Metvix ® (EU)	<ul style="list-style-type: none"> • Queratose actínica • Carcinoma de células basais • Carcinoma de células escamosas
Hexaminolevulinato (HAL)	635	Hexvix ® (EUA)	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro da bexiga (agente de contraste em diagnóstico)
Temporfinina	652	Foscan ® (EU)	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro da cabeça e pescoço
Al(III)Pcs Sulfonado	689	Photosense ® (Russia)	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro de pele • Cancro da mama • Cancro do pulmão • Carcinoma gastrointestinal
Verteoporfinina	689	Visudyne ®	<ul style="list-style-type: none"> • Degeneração macular relacionada com o envelhecimento
Talaporfinina	664	Laserphyrin ® (Japão)	<ul style="list-style-type: none"> • Cancro do pulmão em estágio precoce

Salienta-se aqui a Protoporfirina IX (Pp IX), que é um fármaco lipofílico que ocorre naturalmente no organismo e é produzido endogenamente a partir do Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), através da via biosintética do grupo HEME. É um composto de segunda geração que apresenta um comprimento de onda de absorção de intensidade forte por volta dos 400 nm, denominada banda Soret e quatro bandas de menor intensidade localizadas entre os 500-650 nm, denominadas bandas Q (Anexo A2). No que toca às suas propriedades fotoluminescentes, a Pp IX apresenta dois picos de emissão aos 620 e 670 nm (pertencem à janela fototerapêutica), sendo que a concentração experimental reconhecida como ótima, capaz de produzir luminescência mais intensa é de 25 $\mu\text{m}/\text{mL}$ ³¹. É reconhecida como um dos fármacos de eleição para terapia fotodinâmica, apresentando boa acumulação em células tumorais em detrimento das células saudáveis graças à diminuição da atividade

da enzima ferrolactase nas células malignas. Esta enzima é responsável pela conversão da Protoporfirina IX em HEME (Figura 5) e, embora esteja presente nas células ditas normais é muito menos abundante nas células tumorais (ou seja, as suas características fotossensíveis permanecem maioritariamente inalteradas quando alocada nas células tumorais). Para além disso, a Protoporfirina IX é completamente excretada em menos de 24h e, mesmo que após o tratamento fotodinâmico ainda exista Protoporfirina IX em excesso, esta é excretada aquando da sua passagem pelos intestinos ³².

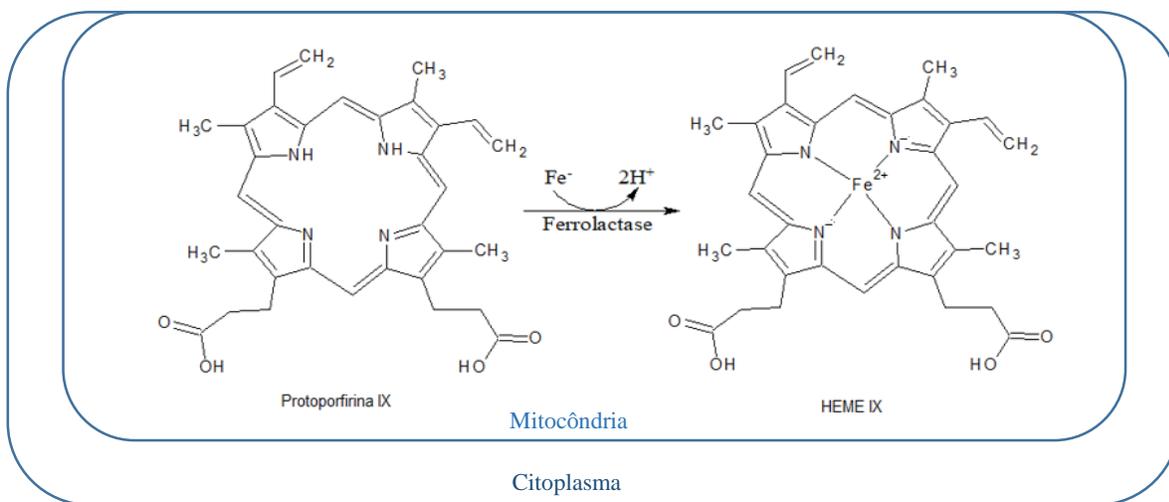


Figura 5 Representação esquemática da conversão da Protoporfirina IX no grupo HEME. A reação ocorre nas mitocôndrias celulares. Estruturas químicas baseadas na referência 33.

Alguns desafios prendem-se com o facto de esta molécula ser muito hidrofóbica e apresentar muito baixa solubilidade em água ($1,069 \times 10^{-1}$ g/L) ³⁴, o que provoca elevada acumulação deste composto na pele, podendo causar fotossensibilidade prolongada no indivíduo. Para além disto, a Pp IX tem um amplo núcleo hidrofóbico e duas cadeias laterais hidrofílicas que apresentam elevada tendência para formar ligações químicas a nível intramolecular, nomeadamente entre o grupo -NH do núcleo e o grupo -COOH. Este fenómeno é responsável pela fácil agregação em meio aquoso da molécula, o que provoca decréscimo na eficiência da produção de singlete de oxigénio e o reduz a eficácia do tratamento ^{24,31,32}. Mais à frente serão exploradas alternativas de direccionamento de fármaco, através de veículos que permitam melhorar o desempenho da molécula fotossensível em detrimento da sua administração na forma livre em solução.

2.4 Vantagens e limitações atuais da PDT

A terapia fotodinâmica apresenta várias vantagens relativamente às terapias convencionais para neoplasias. É um método minimamente invasivo que destrói as células alvo sem os riscos das cirurgias, danos severos ou complicações sistémicas ³. Os PSs são tipicamente inócuos quando mantidos afastados da luz logo, o tratamento local do tumor pode ser realizado seletivamente manipulando a fonte de luz para o alvo. Pode ser aplicada repetidas vezes sem que as células tumorais ganhem resistência ou que limitações de dose sejam excedidas (desvantagens associadas à radioterapia e quimioterapia) sendo que a quimiorresistência e a radiorresistência não afetam o desempenho da PDT ⁶. Pode ainda ser usada como terapia complementar em associação com a cirurgia, radioterapia ou quimioterapia para irradiar as zonas circundantes do tumor extraído aumentando a probabilidade de controlo de reincidência da doença a longo prazo, na medida em que não interfere com estas modalidades de tratamento, não acrescenta riscos e não compromete a sua função. Estão ainda a ser estudadas várias combinações de PDT com outros fármacos anti-cancro convencionais com o intuito de encontrar efeitos sinérgicos ^{3,5}. Apresenta ainda excelentes resultados visuais, caracterizados por uma cicatrização eficaz, sendo bastante vantajosa em doentes com cancros de pele. Quando utilizada em tumores sólidos internos, não destrói o tecido conjuntivo, o que conduz a fibrose mínima ou inexistente, preservando a integridade mecânica e funcional de órgãos com cavidades (como por exemplo o estômago) ³.

Ao nível da prática clínica, a terapia fotodinâmica pode ser extremamente eficaz apenas com um único tratamento em casos de tumores sólidos detetados em estágios precoces. No entanto, em casos avançados, em que os tumores são normalmente maiores, e/ou inoperáveis, a terapia fotodinâmica tem sido usada como tratamento paliativo permitindo aliviar sintomas, aumentar a esperança de vida e melhorar a sua qualidade ¹¹. O número reduzido de sessões requeridas combinado com o facto de muitos procedimentos poderem ser realizados topicamente ou em ambulatório diminui não só os custos capitais associados relativamente a outras técnicas como também o desconforto do doente ¹¹. Neste aspeto, o único efeito adverso relacionado com os efeitos da terapia fotodinâmica prende-se

com alguma sensação de desconforto durante a aplicação do tratamento e uma fotossensibilização da zona da pele que foi intervencionada pelo composto fotossensível.

Paradoxalmente, o caráter altamente localizado desta terapia constitui em si uma desvantagem, visto que dificulta o tratamento de lesões metastáticas, que são a causa mais frequente de morte em doentes com cancro. Para além disto, algumas limitações da terapia fotodinâmica estão associadas com o baixo poder de penetração da luz nos tecidos mais profundos criando uma necessidade de desenvolver estratégias para aplicação eficiente de luz a tumores internos ou volumosos ³.

Ao nível do desempenho dos PSs, algumas desvantagens dizem respeito ao facto de certos compostos sofrerem fotobranqueamento e apresentarem sensibilidade no escuro (*dark toxicity*) que, ainda que residual, pode influenciar negativamente a performance da terapia. A fraca estabilidade dos compostos pode também causar impacto negativo no desempenho da terapia ¹. Um outro aspeto, já anteriormente referido, é o facto dos agentes fotossensíveis atuais serem altamente hidrofóbicos, não sendo particularmente favoráveis para formulações terapêuticas aceitáveis para administração parenteral. Para além disso, a sua hidrofobicidade provoca agregação em meios aquosos, tais como o sangue, o que provoca alteração das propriedades físicas do PS (por pontes de hidrogénio, interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e interações não covalentes entre os anéis aromáticos – ligação π , que se estabelecem entre as moléculas de PS). Estas alterações provocam o decréscimo do rendimento de produção de ROS pois pode alterar a forma do espectro eletrónico da porfirina, deslocando o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção. Consequentemente, a pesquisa científica tem-se focado no desenvolvimento de sistemas de proteção e transporte, tais como o uso de lipossomas, micelas, nanoesferas e nanocápsulas de forma a combater assim a baixa biodisponibilidade e agregação dos PSs convencionais ^{1,26}.

Outros fatores, tais como baixos coeficientes de excreção do composto fotossensível e absorção a comprimentos de onda relativamente baixos atuam como limitantes da eficiência da terapia fotodinâmica no tratamento clínico do cancro ³. A disponibilidade de oxigénio molecular no tumor é outra condicionante a ter em conta e para a qual se devem encontrar soluções que permitam modelar e mitigar as condições de hipóxia.

Como forma de contornar estas condicionantes e otimizar a eficácia da PDT, os investigadores estão focados em desenvolver estratégias com vista ao aprimoramento da

eficácia da terapia fotodinâmica, mais concretamente na melhoria das propriedades dos agentes fotossensíveis através da sua incorporação em veículos adequados, melhorando a sua estabilidade e solubilidade em água ¹. Associada à inclusão dos PSs em veículos há ainda muitos esforços centrados na funcionalização dessas partículas, tendo em vista a melhoria da sua seletividade e eficácia de biodistribuição. No que toca ao melhoramento da perfusão do oxigénio, uma solução pode consistir na inclusão de líquidos com elevadas capacidades para absorver, reter e libertar oxigénio.

É ainda objetivo próximo a expansão do espetro de utilizações da terapia fotodinâmica para tratamento de outras patologias, como a artrite reumatoide, psoríase, verrugas e infeções virais ou microbianas ¹.

3 Nanosistemas para PDT

Face às limitações já identificadas referentes à PDT: probabilidade de agregação do composto fotossensível, rápida degradação e por vezes irreversível do mesmo em meio aquoso, baixo tempo de meia vida, riscos de fotobranqueamento (destruição fotoquímica do fluoróforo), problemas de seletividade do composto e hipóxia na zona de tratamento ³⁵, o principal desafio prende-se com o desenvolvimento de veículos seguros, estáveis e específicos para administração sistémica do PS. Com o objetivo de contornar as condicionantes acima citadas, a nanotecnologia tem contribuído com o desenvolvimento de nanossistemas biocompatíveis (orgânicos ou inorgânicos) para transporte de PSs, de entre os quais se destacam as micelas, os lipossomas, as nanoesferas e as nanocápsulas, entre outras nanopartículas, que constituem as alternativas mais vastamente exploradas (Figura 6) ^{2,36}. Tipicamente, as nanopartículas são definidas como partículas submicroscópicas cujo diâmetro varia entre 1 e 100 nm. São manufacturadas a partir de materiais naturais ou sintéticos e podem ser projetadas para carregar múltiplos agentes terapêuticos, de diagnóstico ou teranósticos. Geralmente as nanopartículas são categorizáveis em ativas ou passivas dependendo da presença ou não de moléculas funcionalizadoras na sua superfície ³⁷.

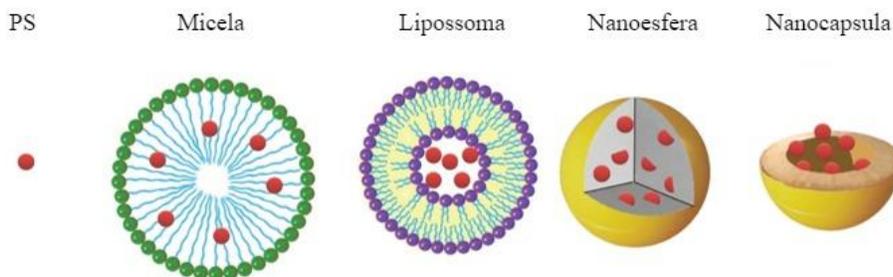


Figura 6 Representação esquemática de alguns veículos de administração de fármacos frequentemente usados em formulações para PDT. Adaptado da referência 38.

Os sistemas de administração indicados na figura acima estão a ser usados para formulação de veículos que oferecem numerosas vantagens relativamente às formulações convencionais já aprovadas para PDT, protegendo contra a degradação prematura do PS, aumentando a solubilidade do composto e o seu tempo de circulação na corrente sanguínea, melhorando a penetração intracelular e o direcionamento específico para células e tecidos de interesse tomando partido do já anteriormente citado efeito de EPR ⁷, que ocorre nos tecidos

neoplásicos ³⁶. Apresentam uma razão superfície/volume elevada o que significa que para garantir que o máximo de PS é direcionado às células eficazmente é importante o controlo das propriedades da superfície das partículas. Para minimizar o reconhecimento das mesmas por macrófagos, o módulo da carga à superfície não deve ser demasiado elevada (não deve ser muito superior a ± 30 mV). Para além disso, partículas com uma carga superficial ligeiramente positiva ou negativa tendem a ver minimizadas as suas interações partícula-partícula o que é vantajoso, na medida em que previne agregação ³⁹. A sua superfície pode ainda ser modificada com grupos funcionais ou sinalizadores, alterando as suas propriedades biológicas ou físicas e melhorando a sua biodistribuição, farmacocinética, tempo de circulação e *uptake* celular ⁴⁰. Adicionalmente estes sistemas podem ser projetados como plataformas multifuncionais incorporando múltiplos componentes, de entre os quais agentes para imagiologia, fármacos quimioterapêuticos, ligandos direcionadores e agentes de camuflagem (previnem interferência do sistema imunitário com as nanopartículas) ³⁷.

Neste sentido, a utilização de nanossistemas permite aumentar a eficácia do tratamento, reduzindo o número de administrações, melhorando o conforto para o doente e uma redução de custos do mesmo ³⁶.

3.1 Tipos de sistemas

3.1.1 Micelas

Emulsões aquosas são sistemas dispersos, constituídos por duas fases líquidas imiscíveis (óleo em água), onde a fase óleo é dispersa na fase aquosa (contínua). Por forma a promover a formação das emulsões e as estabilizar, são normalmente usados surfatantes, que são moléculas anfifílicas que minimizam a energia requerida para formação da emulsão, através da redução da tensão na interface água-óleo. Para que haja formação de micelas é necessário que os surfatantes e co-surfatantes (podem ser usados ou não dependendo das características pretendidas na emulsão) sejam adicionados à mistura em concentrações superiores à sua CMC (concentração micelar crítica), que corresponde à concentração de surfatantes a partir da qual a tensão superficial da solução deixa de variar, permanecendo constante. Após definir a CMC, a emulsão pode ser obtida através da aplicação energia sob a forma de ultrassons à mistura de fases. Os segmentos hidrofóbicos exibem baixa

compatibilidade com a fase aquosa e organizam-se rapidamente de forma a criarem um núcleo onde são incorporados os compostos hidrofóbicos (fase dispersa), enquanto a camada externa é formada pelos segmentos hidrofílicos que mantêm uma interface estável entre o compartimento hidrofóbico e o ambiente aquoso (fase contínua), permitindo assim a solubilização do PS hidrofóbico ^{6,36}.

De entre os PSs mais usados em emulsões para PDT destacam-se a hematoporfirina (HP), a mono aminoporfirina (APP), a meta-tetra-hidroxi-fenil porfirina (m-THPP), a protoporfirina IX (Pp IX) e o ácido aminolevulínico (ALA-5) ^{36,41}. Para dissolver estes compostos usam-se normalmente solventes hidrofóbicos dos quais são exemplos óleos minerais ou orgânicos como o Cremoforo-EL (CrEL), solventes orgânicos (etanol, polietilenoglicol, glicerol, DMSO, DMF), perfluoroalcanos (perfluorohexano, perfluorodecalina). Podem também ser usados sistemas de surfatantes, que podem ser anfotéricos (gelatina ou lecitina), surfatantes iónicos (palmitato de sódio), ou surfatantes não-iónicos (mais frequentemente usados) como o polisorbato 80 (Tween 80), o polisorbato 20 (Tween 20), perfluorosilanos, ou o cremóforo EL (CrEL), entre outros ⁴². Nas nanopartículas poliméricas são usados polímeros como o poli(etilenoglicol) (PEG), o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido lacticoglicólico) (PLGA), a poli(caprolactona) (PCL), entre outros ^{29,43,44}. Muitos PSs de segunda geração foram já testados em combinação com nanopartículas poliméricas, especialmente de PLGA que já foi aprovado para uso em humanos pela FDA. Com o objetivo de escaparem aos macrófagos do sistema fagocítico mononuclear muitas nanopartículas são adicionalmente modificadas com PEG ou óxido polietileno (PEO) que lhes conferem propriedades de “omissão”. Assim, partículas com diâmetros superiores a 100 nm, modificadas com PEG possuem meias vidas muito mais longas na circulação sanguínea ²⁹.

Graças à sua simplicidade de preparação e facilidade de incorporação de compostos sem alteração das suas características, as emulsões têm sido muito usadas para PDT. As micelas têm geralmente diâmetros inferiores a 100 nm, o que significa que beneficiam do efeito de EPR, possuindo assim longos tempos de circulação no sangue e boa seletividade tumoral, prevenindo assim a biodistribuição desfavorável do PS hidrofóbico e consequente redução dos efeitos adversos como fotossensibilidade cutânea (já que o PS é direcionado para o tumor, não permanecendo em outras zonas do corpo suscetíveis a irradiação) ⁶.

Em seguida enunciam-se alguns exemplos de emulsões para PDT identificados na literatura. Em 1988, Mogan et al. utilizaram uma emulsão de CrEL para administração de purpurina hidrofóbica em ratos previamente implantados com um tumor urotelial. O PS utilizado foi a di-hematoporfirina (di-HP), que foi dissolvida no CrEL. Estudos efetuados após irradiação dos tumores provaram que a PDT induziu a cura da massa cancerígena. Para efeitos comparativos foi também estudada por Morgan et al. uma formulação de lipossomas de DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) para desencadear a PDT, tendo-se concluído que tanto a emulsão como a formulação lipossomal eram eficientes para curar os tumores mas, que a emulsão de CrEL implicava a utilização de menor concentração de PS e não causava fototoxicidade nos tecidos adjacentes ao tumor quando irradiados após 24 horas, ao passo que, utilizando a formulação de lipossomas foi registada alguma fototoxicidade ⁴⁵.

Lowe et al. (1992) utilizou uma emulsão de perfluorodecalina (PFD) associada a um PS (m-THPP) para realizar PDT. Após administração da emulsão o efeito terapêutico da m-THPP foi ativado através irradiação com um laser de 648 nm, tendo-se verificado que a utilização da emulsão de PFD permitiu reduzir a inflamação aguda que se verifica normalmente nos tecidos adjacentes à terapia ⁴⁶.

Mais recentemente, Li et al. (2007) reportou uma formulação micelar de PEG-PCL em polietilenoglicol onde se incorporou Pp IX. As micelas demonstraram uma eficiência de carregamento de Pp IX de 82,4% e uma estreita gama de polidispersão de diâmetro micelar, cuja média foi de 52 nm. Em comparação com a utilização do fármaco (Pp IX) na sua forma livre, a inclusão do mesmo em micelas aumentou a acumulação intracelular total do agente e por conseguinte, melhorou a fototoxicidade da Pp IX. Consequentemente, a inclusão de Pp IX em micelas tem o potencial de permitir o efeito de terapia fotodinâmica desejado, rentabilizando a quantidade de fármaco usado e reduzindo a dose de luz radiante aplicada ao doente ⁴⁷.

Gong et al. (2014) utilizaram um sistema nanomicelar onde se conjugou clorina e6 (Ce6) com um polímero anfifílico (C18PMH) e cadeias de PEG sendo que esse composto (C18PMHPEG-Ce6) foi usado para encapsular um PS análogo à indocianina verde (ICG), tendo por objetivo combinar terapia fotodinâmica com técnicas de imagiologia já que, para além de ser um agente fluorescente de contraste, a Ce6 captura gadolínio II, permitindo

estender a sua aplicação para ressonância magnética. A sua administração intravenosa *in vivo* demonstrou efeitos de inibição do crescimento tumoral após apenas 12 horas ⁴⁸.

Neste trabalho foi formulada uma emulsão recorrendo a surfatantes e co-surfatantes para obter uma emulsão aquosa de um líquido iónico (LI) hidrofóbico. Esse LI foi utilizado para dissolver o composto fotossensível Pp IX. Apesar de na literatura não se encontrarem exemplos da utilização de líquidos iónicos para casos específicos de terapia fotodinâmica estes são muito utilizados em micro e submicro emulsões para aplicações médicas, já que possuem pontos de fusão abaixo dos 100 °C, não são voláteis e são excelentes solubilizadores de fármacos hidrofóbicos ⁴⁹. Um exemplo da utilização de um LI para formulação de uma microemulsão para administração de um fármaco para tratamento de cancro da pele foi reportado por Goindi et al. (2014) em que o 1-butil-3-metilimidazolio brometo (BMIMBr) foi usado para dissolver um fármaco (5-fluorouracil, 5-FU) cuja capacidade de penetração na pele é baixa. Com o objetivo de ultrapassar essa limitação, Goindi et al. prepararam uma emulsão recorrendo aos surfatantes Tween 20 e Tween 80, tendo-se registado uma permeação *in vivo* quatro vezes superior à que se obteve para a mesma substância em solução aquosa ⁴⁹.

As micelas são veículos indiscutivelmente atrativos para aumentar a solubilidade dos PSs, conduzindo a uma eficaz acumulação dos mesmos nas zonas alvo, mediada pelo efeito de retenção e permeabilidade. No entanto, as emulsões (sistemas micelares) usam surfatantes de baixo peso molecular (como o Tween 80 ou o cremoforo-EL) que despoletam reações de hipersensibilidade aguda (anafiláticas) *in vivo* ⁵⁰. Existem também algumas evidências que relacionam a utilização de compostos fotossensíveis em micelas com um risco de efeito de fotossensibilidade cutânea, o que pode danificar células endoteliais e/ou células de vasos sanguíneos vizinhos ⁶.

3.1.2 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas compostas por uma bicamada de fosfolípidos, em que as cabeças polares se encontram em contato com o meio externo (aquoso) e as caudas apolares se posicionam entre as duas camadas formadas pelas cabeças. Graças à sua arquitetura estrutural simples, de dimensões controláveis e procedimento de preparação conveniente, têm sido desenvolvidos muitos esforços de pesquisa com o objetivo de integrar PSs na sua

estrutura⁶. Os lipossomas possuem a característica única de possibilitarem a incorporação de agentes hidrofílicos no seu núcleo aquoso e agentes hidrofóbicos na bicamada hidrofóbica adjacente, o que lhes confere versatilidade e os torna excelentes veículos terapêuticos²⁹. Existem diversos métodos que permitem a obtenção de lipossomas e, simultaneamente o controle de características como o seu tamanho, sendo os ultrassons e o processamento por extrusão os mais utilizados atualmente⁴⁴. É de notar que a seleção do método está sempre dependente das propriedades do PS selecionado, da dimensão final desejada e da aplicação pretendida²⁹. PSs hidrofóbicos, tais como porfirinas e derivados de ftalocianinas, podem ser dissolvidos na região da bicamada fosfolipídica. Opostamente, as moléculas solúveis em água, tais como o pró-fármaco ácido aminolevulínico (5-ALA), podem ser encapsuladas no núcleo interno do lipossoma⁶. Adicionalmente, a membrana lipossomal providencia locais suficientes para conjugação de múltiplos ligandos funcionais, como por exemplo lipossomas de longa duração modificados com poli(etilenoglicol) (PEG)⁵¹, anticorpos⁵², péptidos⁵³, ácido fólico (FA)⁵⁴ ou glicoproteínas⁵⁵. Estas modificações têm como objetivo melhorar as características farmacocinéticas de biodistribuição dos lipossomas, bem como aumentar a sua eficácia terapêutica.

Estudos efetuados por Richter et al. (1993) em ratos portadores de rabdomiossarcoma (tumor muscular) demonstraram que a concentração máxima de acumulação de fármaco (monoácido derivado de benzoporfirina – BPD-MA) no tumor através de uma formulação de lipossomas (DPPC) foi obtida 15 minutos após a injeção ao passo que a concentração máxima desse mesmo fármaco, administrado numa formulação aquosa, foi obtida apenas após 3 horas. Sob iluminação, a formulação lipossomal exibiu eficácia terapêutica significativamente superior à formulação aquosa^{56,57}.

No ano 2000, uma formulação lipossomal de agente fotossensível, o *Visudine*, foi clinicamente aprovada para tratamento de doentes com degeneração macular. A formulação lipossomal era composta por DMPC zwitteriónico, fosfolípido (fosfatidilcolina, EPG) e um PS hidrofóbico de segunda geração, derivado da Pp IX (a benzoporfirina). A incorporação do PS em lipossomas permitiu uma segregação mais rápida do fármaco pelo plasma, garantindo a presença de níveis mais elevados de PS nos tecidos tumorais⁵⁸.

Liang et al. (2011) sintetizaram um outro tipo de veículo lipossomal multifuncional funcionalizado através do método sol-gel. A estrutura obtida é semelhante à de um lipossoma

mas tem como particularidade os lípidos da camada bi-lipídica serem conjugados com o precursor de sílica APTES (3-aminopropiltriétoxissilano) e com unidades de porfirina, originando um lipossoma porfirínico multifuncional (cerassoma). Esta formulação permitiu aumentar a carga eficaz de PS em 33.46% e verificou-se que a criação de uma ligação covalente entre as porfirinas e o cerassoma preveniu libertação do composto fotossensível durante a circulação sistémica, melhorando o desempenho da PDT ⁵⁹.

Apesar das aplicações identificadas, os lipossomas revelam frequentemente problemas relacionados com a sua estabilidade, podendo favorecer a agregação do composto fotossensível que incorporam (quer este esteja localizado no interior hidrofílicos, quer esteja na bicamada hidrofóbica). São ainda facilmente reconhecidos e removidos da corrente sanguínea por macrófagos, o que pode conduzir a um tempo de meia vida reduzido, o qual muitas vezes é insuficiente para que ocorra uma acumulação celular que garanta a eficácia do tratamento ⁶.

As suspensões de nanopartículas nanocápsulas e nanoesferas surgem como uma alternativa viável às micelas e lipossomas, uma vez que podem colmatar as desvantagens associadas a estes nanossistemas ⁶.

3.1.3 Nanoesferas e nanocápsulas

As nanoesferas são estruturas sólidas densas, nas quais as moléculas terapêuticas podem ser dispersas no seu interior ou adsorvidas na sua superfície (ou na superfície dos seus poros), de forma heterogénea ou homogénea ³⁶. Podem ser de carácter orgânico (constituídas à base de polímeros), inorgânico (ex.: sílica), ou compósito. A facilidade de manipulação e modificação das suas superfícies promovem a sua utilização para aplicações terapêutica, de diagnóstico ou teranóstica (imagem diagnóstica e tratamento). Um exemplo foi explorado por Lee et al. (2012), em que se sintetizaram nanopartículas poliméricas de PLGA modificadas na superfície com poli(etileno glicol)metoxilado (mPEG) e clorina e6 (Ce6) (como PS). O mPEG foi conjugado com o intuito de aumentar a estabilidade das nanoesferas em suspensão e a Ce6 foi conjugada para permitir a obtenção de imagens de fluorescência induzidas por irradiação *in vivo* e a realização simultânea de PDT, já que o Ce6 é um composto fotossensível que absorve e emite luminescência e gera ROS, na presença de O₂ ⁶⁰. Gupta et al. (2011) estudaram uma nova abordagem para obtenção de uma suspensão de

nanoesferas multifuncionais de poli(acrilamida) (PAA) para imagiologia e PDT. Esta formulação continha o PS HPPH (3-(1-hexiloxietil)pirofeoforbido-a) e cianina (composto que absorve e emite no comprimento de onda da luz visível, muito usado como marcador fluorescente para imagiologia) , numa razão que permitiu minimizar a transferência de energia de ressonância (FRET) entre as partículas. Esta suspensão demonstrou elevada qualidade para aplicação em imagiologia e PDT ⁶¹.

Outros sistemas muito usados como veículos de PSs são as nanopartículas de sílica mesoporosa. A sílica é um material não tóxico, biocompatível, reconhecido como seguro pela FDA (Food and Drug Administration), tem baixos custos de produção, é mecanicamente e quimicamente estável e é ópticamente transparente. A sua superfície é rica em grupos hidroxilo o que lhe confere hidrofiliabilidade e estabilidade coloidal favorável em meios aquosos ⁶². As nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) apresentam um elevado volume de poros, grande área superficial e tamanho uniforme de poros. Para além de altamente porosas, são ainda inertes, tanto química como estruturalmente, não sendo suscetíveis a intumescimento ou outro tipo de alterações quando expostas a meios com condições mutáveis de pH ³⁶. Estas partículas afirmam-se assim como candidatos ideais para suportar materiais para fins biomédicos e terapêuticos, já que combinam várias vantagens da sílica e das nanoestruturas.

Um exemplo consiste no trabalho desenvolvido por Teng et al. (2013), em que se desenvolveu um nanoveículo para terapia fotodinâmica constituído por MSNs carregadas com Protoporfirina IX, e conjugadas com fosfolípidos, ácido fólico (fa) e fluoresceína. Este nanosistema de carácter multifuncional, para além da faceta terapêutica, apresenta um potencial de diagnóstico, graças à conjugação de partículas de fluorescência sinalizadoras. Os estudos realizados permitiram demonstrar que este sistema apresentava uma seletividade aumentada pelas células tumorais, na medida em que estas expressam recetores de ácido fólico de forma acrescida ⁶³.

Por sua vez, as nanocápsulas são sistemas do tipo núcleo/invólucro, ou seja, uma cápsula disposta ao redor de um núcleo (hidrofílico ou lipofílico), podendo o fármaco ser dissolvido ou disperso no núcleo e/ou no próprio invólucro. As nanocápsulas ocas apresentam baixa densidade e um comportamento favorável em ambientes coloidais aquosos, sendo por conseguinte muito usadas para incorporar materiais de interesse para fins

terapêuticos, melhorando a sua estabilidade ⁶². Polímeros biodegradáveis, tais como o poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), e o seu copolímero (PLGA) têm sido muito utilizados no invólucro das nanocápsulas ⁶².

As dimensões das nanocápsulas são facilmente controláveis através da escolha dos polímeros e dos processos de obtenção adequados, sendo que estas são consideradas mais vantajosas que as micelas e os lipossomas devido à sua elevada estabilidade, diâmetro reduzido e baixa dispersividade de tamanho, fatores que contribuem para que ocorra direcionamento do fármaco às zonas malignas através do efeito de EPR (permeabilidade e retenção aumentada nos vasos sanguíneos dos tumores), prevenindo simultaneamente o seu reconhecimento por macrófagos e proteínas e aumentando o tempo de circulação na corrente sanguínea ³⁶. Substâncias biologicamente ativas podem ser dissolvidas ou dispersas, revestidas ou encapsuladas por uma matriz de carácter orgânico ou inorgânico, protegendo o composto ativo das condições envolventes, tais como o pH, luz e processos induzidos por enzimas ³⁶. Num trabalho recente, Kim et al (2014) desenvolveram uma técnica para encapsular o composto fotossensível Feoforbido-a (Ppa) dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido), conjugando-o com moléculas de m-PEG. A estrutura anfifílica autoarranjou-se (*self assembled*) para formar nanopartículas *core/Shell* em suspensão aquosa ⁶⁴.

As nanocápsulas podem também ser constituídas por material inorgânico, como por exemplo, a sílica. No que diz respeito à formação do invólucro (*shell*) de sílica, um dos métodos mais usados é à técnica de sol-gel, que envolve a hidrólise de um precursor de sílica (tipicamente um alcóxido), seguida pela policondensação dos grupos silanol ⁶². Invólucros de sílica preparados via sol-gel são de natureza amorfa e possuem poros cuja dimensão se estima que ronde a escala sub-nanométrica ⁶⁵.

Gary-Bobo et al. (2012) usaram nanocápsulas de sílica porosa funcionalizadas com manose para terapia fotodinâmica (PDT). Neste caso, o PS foi covalentemente encapsulado dentro das MSNs de diâmetro hidrodinâmico de 118 nm, tendo este estudo demonstrado que uma única injeção de fármaco era suficiente para induzir uma redução significativa do tamanho do tumor aquando de irradiação próxima do infravermelho (NIR). A manose promoveu uma internalização mais eficaz das nanocápsulas no tecido tumoral ⁶⁶. Tu et al.

(2009) conjugou Protoporfirina IX (Pp IX) em nanocápsulas se sílica para o estudo da PDT 67.

Na Tabela 4 encontram-se compilados alguns tipos de sistemas de administração de compostos fotossensíveis usados atualmente, bem como o método de obtenção eleito e alguns elementos da formulação.

Tabela 4 Compilação de sistemas de direcionamento de fármaco para PDT.

Sistema	Elementos da formulação	PS	λ excitação [nm]	Ref
Emulsão	¹⁾ Diclorometano ²⁾ Água DI; ³⁾ CrEL	Di-Hematoporfirina	590	45
Emulsão	¹⁾ PFD; ²⁾ Água DI; ³⁾ Tween 80	m-THPP	648	46
Emulsão	¹⁾ Polietilenoglicol; ²⁾ Água DI; ⁴⁾ PEG-PCL	Pp IX	405	47
Emulsão	¹⁾ Tetrahidrofurano, Dimetilformamida; ²⁾ Água DI; ⁴⁾ PEG, PLA	Pp IX	400	68
Suspensão lipossomal	¹⁾ DMSO; ²⁾ Água DI; ⁴⁾ Dimiristoilfosfatidilcolina, fosfatidilglicerol	BPD-MA (monoácido derivado da benzoporfirina)	690	57
Suspensão lipossomal (Visudine)	¹⁾ DMPC; ²⁾ Água DI; ⁴⁾ Fosfatidilglicerol (EPG)	Derivado da Pp IX (Benzoporfirina)	630	58
Suspensão de cerassomas	¹⁾ CHCl ₃ ; ²⁾ Água DI; ⁴⁾ DMAP; ⁵⁾ APTES	Pp IX	400-700	59
Suspensão de polimerossomas	¹⁾ DMSO; ²⁾ Água DI; ³⁾ CrEL; ⁴⁾ Pluronic123 (PEG-PPG-PEG)	Redaporfina	700-800	69
Suspensão de nanoesferas	¹⁾ DMSO ²⁾ Água DI; ⁴⁾ PLGA e mPEG	clorina e6	570	60
Suspensão de nanoesferas	²⁾ Água; ⁴⁾ Poli(acrilamida), ⁷⁾ cianina	HPPH [3-(1-hexiloxietil)pirofeoforbido-a]	532	61
Suspensão de nanoesferas de sílica	¹⁾ DMSO, DCC (dicilohexilcarbodiimida); ²⁾ Água DI; ⁵⁾ APTES, TEOS; ⁶⁾ Ácido Fólico (fa); ⁷⁾ fluoresceína	Pp IX	355	63
Suspensão de nanocápsulas	²⁾ Água DI; ³⁾ m-PEG	feoforbido a	683	64
Suspensão de nanocápsulas revestidas a sílica	¹⁾ DMSO; ²⁾ Água DI; ³⁾ CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio); ⁵⁾ TEOS; ⁶⁾ Manose	Fluoresceína	650	66

Nota: 1) Solvente do PS; 2) Meio Contínuo; 3) Surfatante(s); 4) Fosfolípido(s); 5) Precursor(es) de sílica; 6) Modificador(es) covalente(s); 7) Agente de contraste

Assim, tendo por base o estudo da literatura descrito e a informação previamente recolhida por outros alunos do grupo GSP (Green and Sustainable Processes) da Universidade de Coimbra, neste trabalho procurou-se desenvolver uma nova formulação para

obtenção de micro/nano cápsulas de sílica porosa através do método sol-gel, contendo líquidos com capacidade para dissolver PS e quantidades apreciáveis de oxigénio molecular.

3.1.4 Uso de líquidos com elevada capacidade para absorver, reter e libertar oxigénio

Para promover o tratamento, maximizar a sua eficiência e economizar a quantidade de PS usado há uma necessidade inerente de aumentar a concentração de oxigénio nas zonas a tratar pela PDT. Tendo em conta esse objetivo, propõe-se a solubilização do PS em líquidos que apresentem elevadas capacidades para absorver, reter e libertar oxigénio como é o caso dos perfluorcarbonos ou perfluoroalcanos (PFCs) e dos líquidos iónicos (LIs) ^{70,71}.

Os PFCs são compostos orgânicos que contêm apenas carbono e fluor na fórmula C_xF_y . São incolores, possuem densidade elevada e têm muito baixa solubilidade em água sendo muito frequentemente usados em emulsões aquosas para várias aplicações médicas, já que são biologicamente inertes. Possuem ainda a particularidade de terem elevada capacidade de dissolução de oxigénio (~40-50 vol%), em comparação com a da água que é de apenas 2,5 vol% ^{72,73}. Já a sua capacidade de dissolver dióxido de carbono é muito superior, situando-se entre os 140 a 240 vol% ⁷³.

Dentro das suas aplicações, destacam-se as suas potencialidades na área da medicina. Um dos ramos de investigação foca-se atualmente no desenvolvimento de substitutos sanguíneos que possam servir de alternativa segura às transfusões de sangue. Neste caso, propõe-se que uma emulsão de PFCs possa tirar vantagem da sua elevada capacidade de dissolução de gases respiratórios e servir como um transportador artificial de oxigénio seguro e não tóxico ⁷⁴. Uma outra aplicação consiste no seu uso na PDT, onde os PFCs são já usados com a dupla finalidade de dissolverem o PS e otimizarem a perfusão de oxigénio nas zonas a tratar ⁴⁶. Graças à sua elevada capacidade de dissolver oxigénio, os PFCs conseguem conter uma maior quantidade de oxigénio que a que está presente na matriz tumoral a uma determinada pressão parcial de oxigénio. Desta forma, embora o oxigénio na zona do tumor esteja limitado durante a aplicação da PDT, os veículos de administração à base de PFCs conseguem manter concentrações de oxigénio suficientes para serem consumidas pelo PS dissolvido, conduzindo assim a uma formação sustentada de ROS e tratamento mais eficaz. Esta otimização é possível, independentemente de pré existência de hipóxia no tumor ou de

danos vasculares na matriz ⁷⁵. Para além disso, tem sido reportado que o tempo de meia vida do ¹O₂ nos PFCs é muito mais longo do que no ambiente celular ou na água, o que resulta num efeito fotodinâmico mais duradouro ⁷⁶.

Por sua vez, os LIs são constituídos por sais iónicos, mais especificamente, por um catião orgânico (do tipo imidazólio, piridínio, pirrolidínio, fosfónio ou amónio) e um anião inorgânico (do tipo tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, cloreto) ou orgânico (do tipo trifluorometilsulfonato ou bis[(trifluorometil)sulfonil]imida^{77,78}). Estes compostos têm a particularidade de estarem no estado líquido a temperaturas inferiores a 100 °C, e podem ser solúveis ou insolúveis em água, dependendo da hidrofobicidade dos iões que os constituem ⁷⁹. A maior parte dos LIs já é líquida a temperaturas iguais ou abaixo da ambiente, integrando o grupo dos RTILs (do inglês Room Temperature Ionic Liquids). Graças a estas características, são substitutos potenciais para muitos solventes orgânicos, e são já muito usados para separação de gases, tais como dióxido de carbono, oxigénio, etileno, propileno, butano, metano e azoto, já que conseguem dissolver quantidades assinaláveis destes gases. Podem ainda ser usados como meios de reação para vários tipos de reações ou processos eletroquímicos ⁷⁹.

A boa estabilidade térmica e pressão de vapor quase nula que os caracterizam, contribuem ainda para a sua aplicabilidade em processos onde seriam expostos a elevadas temperaturas, como é o caso da separação do CO₂ de outros gases de queima na indústria petroquímica ^{77,78}. Uma outra característica bastante vantajosa e que destaca estes compostos de outros, é a possibilidade em ajustar algumas das suas propriedades (viscosidade, hidrofobicidade, ou solubilidade noutros materiais) através da manipulação dos iões e contra iões que os constituem.

No que toca às aplicações médicas, destaca-se a utilização recente de LIs como fármacos anticâncer, pois a sua versatilidade e capacidade de modificação confere-lhes seletividade e possuem também atividade elevada contra várias linhas celulares malignas. Foram já também usados como fase óleo em formulações de fármacos ⁸⁰. Apesar de ainda não estarem a ser usados para aplicações específicas em PDT, as suas potencialidades como componentes para esta terapia são notórias, pois podem combinar a capacidade de dissolução de agentes ativos (hidrofóbicos ou hidrofílicos), com uma elevada eficácia de dissolução de gases, neste caso do oxigénio molecular. Na Tabela 5 podem ser consultados os valores

experimentais da solubilidade e difusibilidade do O₂ em diversos LIs. Os valores foram obtidos pelo método de eletroredução⁸¹⁻⁸⁷. Apesar da sua atratividade, algumas limitações dos LIs prendem-se com a sua citotoxicidade, exibindo uma tendência para serem incorporados nas bicamadas fosfolipídicas de membranas biológicas, podendo alterar as suas propriedades físicas.

Tabela 5 Solubilidade (mM) e difusibilidade (10⁻⁶ cm²s⁻¹) de O₂ em diversos LIs e na PFD.

LI	Solubilidade (mM)	Difusibilidade (10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹)	T °C	Ref
[EMIM][BF ₄] – 1-etil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato	1,1 ± 0,2	17 ± 2	25	81
[PMIM][PF ₄] – 1-pentil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato	0,97 ± 0,05	13 ± 2	25	81
[BMIM][BF ₄] – 1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato	1,1 ± 0,1	12 ± 1	25	81
[BMP][NTf ₂] – butilmetilpirrolidínio bis(trifluorometilsulfonyl)imida	13,6 ± 0,8	1,8 ± 0,2	25	81
[HMP][NTf ₂] – N-hexil-N-metil-pirrolidínio bis(trifluorometilsulfonyl)imida	14,5	2,5	25	82
[EMIM][NTf ₂] – 1-etil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonyl)imida	3,9	7,3	20	83
[BMIM][NTf ₂] – 1-butil-3-metilimidazolio bis(trifluorometanosulfonyl)imida	3,1	8,76	25	84
[BMMIM][NTf ₂] – 1-butil-2,3-dimetilimidazolio bis(trifluorometanosulfonyl)imida	3,6	5,1	25	84
[BMIM][PF ₆] – 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato	3,0	2,5	25	84
[PP ₁₃][NTf ₂] – N-metil-N-propilpiperidínio bis(trifluorometilsulfonyl)imida	4,6	3,0	25	85
[PP ₁₁ O ₂][NTf ₂] – N-metil-N-propilpiperidínio bis(trifluorometilsulfonyl)imida	4,4	5,0	25	85
[DEME][NTf ₂] – N,N-dietil-N-metil-N-(2-metoxietil)amonio	4,4	5,1	25	85
[P ₁₄][NTf ₂] – N-butil-N-metilpiperidínio bis(trifluorometilsulfonyl)imida	8,48 ± 0,09	1,82 ± 0,02	25	86
[Aze ₁₄][NTf ₂] – 1-butil-1-metilazepanio bis(trifluorometilsulfonyl)imida	7,98 ± 0,20	1,50 ± 0,04	25	86
[P _{6,6,6,14}][NTf ₂] – trihexal(tetradecil)fosfónio bis(trifluorometilsulfonyl)amida *	6,0 ± 0,5	7,5 ± 0,6	35	87
[P _{6,6,6,14}][FAP] – trihexil(tetradecil)fosfónio tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato	7,8 ± 1,5	6,1 ± 1,1	35	87
C ₁₀ F ₁₈ - Perfluorodecalina	40 (vol %)	-	25	73

* Líquido iónico usado neste trabalho. Para além da boa capacidade para dissolver oxigénio é muito hidrofóbico (máxima capacidade de absorção de água de 0,7%)⁷⁰. Apesar deste líquido iónico apresentar alguma atividade oxidante na presença de oxigénio, quando comparado com outros líquidos iónicos de características semelhantes o é aquele que apresenta menor reatividade⁸⁸.

4 Materiais e métodos

Nesta secção serão descritos todos os passos que levaram ao desenvolvimento da nova formulação para obtenção de micro/nano cápsulas para uso na PDT aplicada ao tratamento do cancro, apresentando-se de seguida todos os materiais, bem como os métodos de síntese, processamento e caracterização que foram utilizados.

4.1 Materiais

A Protoporfirina IX (Pp IX, $\geq 95\%$), o tetraetilortosilicato (TEOS, 99%), o hidróxido de sódio (NaOH, $\geq 99.99\%$), a Perfluorodecalina (PFD, 95%), o 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, 95%) e a sílica mesoestruturada, MCM-41 (hexagonal), foram adquiridos à Sigma Aldrich. O 1,3-difenilisobenzofuran (DPBF $> 95\%$) foi adquirido à TCI Co., Ltd.

O trihexal(tetradecil)fosfónio bis(trifluorometilsulfonyl)amida (CYPHOS IL 109[®], [P_{6,6,6,14}][NTf₂], 98,6%) foi adquirido à Cytec. O ácido clorídrico (HCl, 37%) e o etanol p.a ($\geq 99,8\%$) foram fornecidos pela Panreac Química. As membranas de diálise semipermeáveis (12-14 kD MWCO, Spectra/Por 4[®]) usadas tinham dimensões de 45 mm de largura por 29 mm de diâmetro e foram adquiridas à Spectrum Labs.

Como fontes de irradiação usaram-se dois lasers distintos, sendo o primeiro um laser pulsado de 406 nm (IBH NanoLED7) que fornece uma energia de 20pJ por impulso. A sua potência de pico (por impulso) é de 200 mW, tendo cada impulso uma duração de 100 ps. Como se usou uma taxa de impulsos de 1 MHz a energia transferida durante um segundo foi de 20 μ J e a potência média do mesmo é 20 μ W. O outro laser, de 532 nm (PW00960), tem emissão contínua e a voltagem a que se operou o mesmo foi de 5V, sendo a sua potência de 10,5 W.

Foram ainda utilizadas botijas de O₂ (Praxair, 99,999%) e de N₂ (Praxair, 99,998%) para oxigenação e degaseificação, respetivamente.

Por motivos de propriedade industrial, certos produtos químicos usados, nomeadamente os surfatantes S1, S2, S3 e o sal orgânico, não podem ser divulgados neste trabalho. Outros aspetos experimentais serão igualmente omitidos.

4.2 Métodos de preparação e processamento

A formulação foi desenvolvida, otimizada e caracterizada em três fases fulcrais esquematizadas na Figura 7.

Em primeiro lugar e com objetivo de desenvolver uma emulsão estável, foram realizados testes para definição da composição de surfatantes da mesma, tendo-se estudado duas formulações possíveis: [S1:S2:S3] e [S1:S2:0]. A determinação da concentração micelar crítica das duas formulações testadas foi feita através de testes realizados numa balança de tensão superficial. Ambas as composições de surfatantes se revelaram adequadas (com baixa concentração micelar crítica e conduziram a resultados reprodutíveis). As solubilidades da Pp IX em PFD e em [P_{6,6,6,14}][NTf₂] foram depois testadas. Nesta fase, chegou-se à conclusão que a solubilização da Pp IX em PFD era muito baixa. Pelo contrário, a Pp IX dissolveu-se completamente no [P_{6,6,6,14}][NTf₂] (até uma concentração de 0,5 mg/mL) em menos de 24 horas. Sendo assim, e sendo este o agente solubilizador mais adequado para a obtenção de cápsulas contendo Pp IX, optou-se por utilizar o sistema [P_{6,6,6,14}][NTf₂]+Pp IX emulsificado em água com uma mistura usando os surfatantes S1 e S2.

Após determinar experimentalmente a cinética de formação e degradação das emulsões e a inclusão do composto fotossensível nas mesmas, seguiu-se para a segunda fase, onde se prepararam micro/nanocápsulas através de um método sol-gel em meio aquoso. Nesta etapa fulcral de trabalho foram otimizadas as condições experimentais de obtenção, processamento, lavagem e recuperação das nanocápsulas. O diâmetro das partículas foi determinado através do método de DLS (Dynamic Light Scattering).

A terceira e última etapa deste trabalho consistiu na caracterização físico-química das amostras obtidas. Foram utilizados métodos de microscopia (microscopia ótica – MO, microscopia de varrimento eletrónico – SEM, microscopia de transmissão eletrónica – TEM), e outros métodos como análise termogravimétrica (TGA), espectroscopia de infravermelhos (FTIR) e espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-VIS). Foram ainda determinadas a capacidade de absorção e libertação de oxigénio para as emulsões/cápsulas preparadas, bem como a avaliação preliminar da capacidade oxidante e de produção de ROS em cápsulas com e sem Pp IX (para diferentes condições de oxigenação).

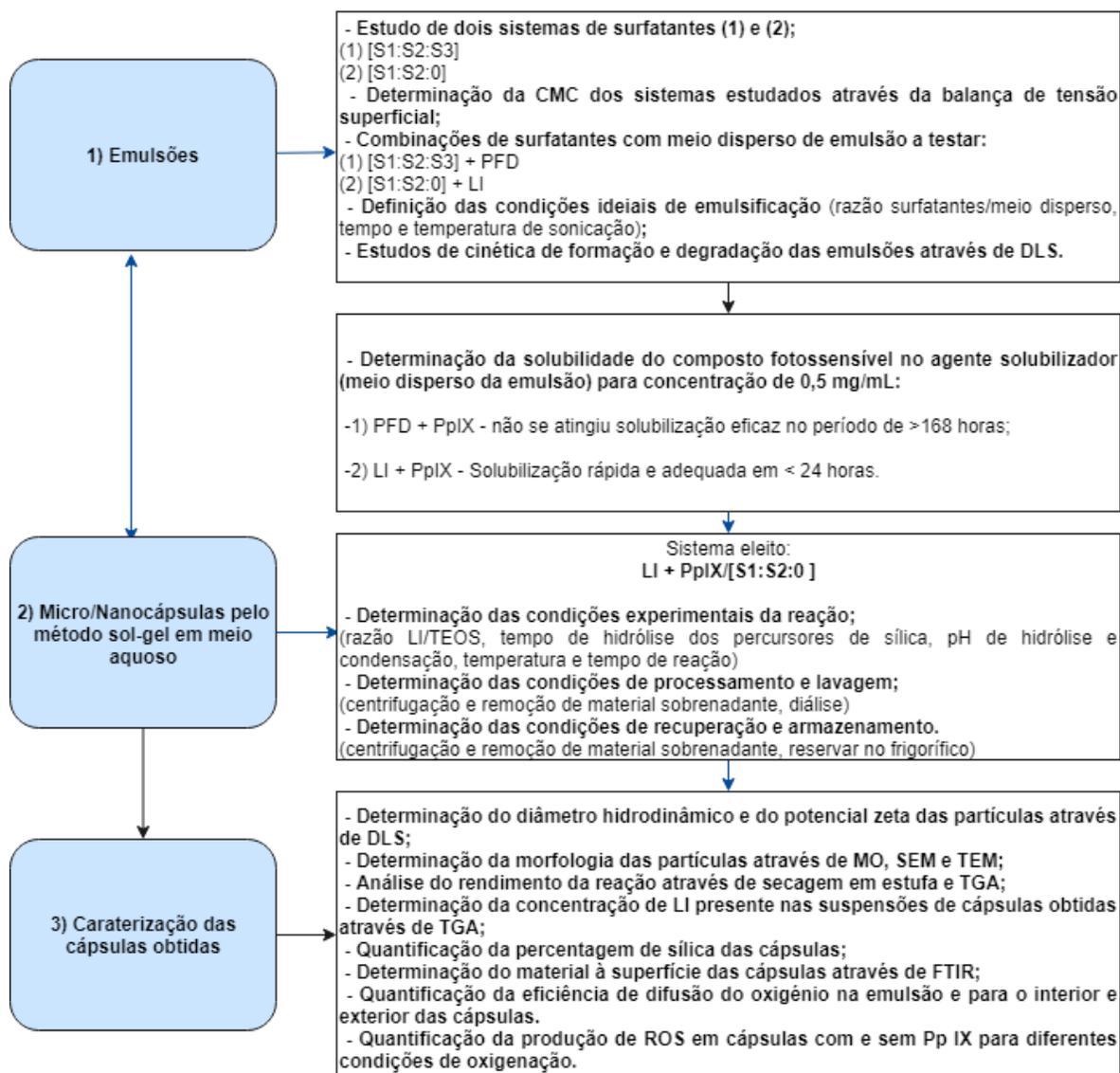


Figura 7 Representação esquemática dos procedimentos efetuados.

4.2.1 Concentração micelar crítica (CMC) para dois sistemas de surfatantes distintos

A CMC foi calculada através do método do anel de du Noüy, na balança de tensão superficial (Sigma70, KSV Instruments). Para este trabalho foram estudadas duas composições relativas de surfatantes em solução aquosa: uma que incluía S3: (1) [S1:S2:S3] e outra sem S3: (2) [S1:S2:0]. A CMC para o sistema 1 foi medida pela aluna de mestrado do MIEQ Sylvia Sousa ⁸⁹.

Para cada um dos sistemas foram preparadas várias amostras em que a proporção entre surfatantes foi mantida, mas a sua concentração molar na solução foi progressivamente diluída a partir de uma solução-mãe mais concentrada. Foram assim preparadas amostras de concentração variável entre os 6 e 0,5 mM que permitiram obter uma curva representativa da tensão superficial em função da concentração molar para um espectro alargado de concentrações e, em função dos resultados obtidos, foram determinados os valores de CMC, com base em diferentes metodologias descritas na literatura.

A calibração foi realizada com água bi-destilada e as medidas de tensão superficial realizadas ao longo do tempo (entre 2 a 9 horas) até se atingir um valor estável de tensão superficial (variação entre os 10 últimos valores medidos inferior a $\pm 1\%$). Com o objetivo de evitar ao máximo a presença de impurezas que pudessem influenciar estas medições, toda a água bi-destilada utilizada na preparação das soluções foi filtrada por um filtro de poli/tetrafluoroetileno (PTFE, 0.45 μm).

No anexo B encontram-se os dados obtidos para vários sistemas de surfatantes diferentes testados por elementos do grupo GSP (do inglês Green and Sustainable Processes) da Universidade de Coimbra.

4.2.2 Cinética de formação e de estabilidade das emulsões

Foram criados dois tipos de emulsões O/W (oil-in-water) para estudo. Para o primeiro tipo de emulsão foi preparada a solução aquosa de surfatantes (1), de composição [S1:S2:S3], e onde o meio disperso foi a PFD. Para o segundo tipo de emulsão a solução aquosa de surfatantes foi a (2), de composição [S1:S2:0], e onde o meio disperso foi o LI ([P_{6,6,6,14}][NTf₂]).

As soluções de surfatantes foram preparadas com as composições descritas na primeira linha da Tabela 6, à temperatura ambiente de 20-25 °C e com agitação de 800 rpm. Para garantir a completa dissolução dos surfatantes a solução foi deixada a agitar durante 24 horas. Em seguida, adicionou-se o meio disperso da emulsão (LI) nas características especificadas na Tabela 6 e, sem agitação adicional a mistura foi emulsificada através da aplicação de ultrassons, sendo simultaneamente arrefecida através de um banho de gelo, por forma a evitar o sobreaquecimento do sistema durante a sonicação.

Tabela 6 Especificações dos procedimentos realizados para emulsificação dos sistemas estudados e para estudo das cinéticas de formação e de estabilidade das mesmas. (Nota: por motivos de propriedade industrial não são indicados os valores precisos estudados).

	(1) (PFD/[S1+S2+S3])	(2) (LI/[S1+S2])
Concentração molar de surfatantes (mM)	Valor entre 1 e 10	Valor entre 1 e 10
Razão meio disperso/surfatantes (mol/mol)	Valor entre 2 e 50	Valor entre 2 e 50
Volume de meio contínuo adicionado pré-emulsificação (mL)	Valor entre 0,1 e 2	Valor entre 0,1 e 2
Caraterísticas da sonda de ultra sons	<ul style="list-style-type: none"> • 500 W, 20 kHz, Sonics Vibra-cell, sonda microtip (6.35 mm diâmetro), pulsada, amplitude 10-40%. 	<ul style="list-style-type: none"> • 500 W, 20 kHz, Sonics Vibra-cell, sonda microtip (6.35 mm diâmetro), pulsada, amplitude 10-40%; • 750 W, 20 kHz, Sonics Vibra-cell, sonda macrotip (12.7 mm diâmetro), pulsada, amplitude 10-40%.
Cinética de formação	<ul style="list-style-type: none"> • Análise DLS de amostras recolhidas de 5 em 5 minutos entre os 5 e 30 minutos de sonicação; • Temperatura de câmara 25 °C, tempo de estabilização de 60 segundos, 5 repetições por medição, modelo de análise: GENERAL PURPOSE. 	<ul style="list-style-type: none"> • Análise DLS de amostras recolhidas de 5 em 5 minutos entre os 5 e 30 minutos de sonicação; • Temperatura de câmara 25 °C, tempo de estabilização de 60 segundos, 5 repetições por medição, modelo de análise: CONTIN.
Cinética de estabilidade	<ul style="list-style-type: none"> • Análise DLS após 24 e 48 horas; • Temperatura de câmara 25 °C, tempo de estabilização de 60 segundos, 5 repetições por medição, modelo de análise: GENERAL PURPOSE. 	<ul style="list-style-type: none"> • Análise DLS após 24, 48 e 72 horas; • Temperatura de câmara 25 °C, tempo de estabilização de 60 segundos, 5 repetições por medição, modelo de análise: CONTIN.

O tempo de exposição aos ultrassons mais adequado para emulsificação completa da emulsão foi determinado através da realização de estudos cinéticos respeitantes à formação e degradação da emulsão através da recolha e análise de 6 amostras de 1,5 mL, com um intervalo de 5 minutos de exposição aos ultrassons entre cada extração, ao longo de 30 minutos, tendo cada uma dessas alíquotas sido prontamente analisada através de DLS, ou método de difusão de luz dinâmica (Zetasizer Nano Range, Malvern). A cinética de estabilidade foi posteriormente estudada por análise das mesmas alíquotas no DLS após 24 e 48 horas para o caso do sistema com PFD (1) e após 24, 48 e 72 horas para o sistema com LI (2). Este prolongamento na análise do sistema (2) deve-se ao facto do LI ter um carácter

menos estável que a PFD o que nos motivou a prolongar o seu estudo no tempo ⁸⁹. A distribuição de diâmetro verificou-se consistentemente unimodal, sendo que o índice de polidispersividade (PDI) variou entre 0,1 e 0,3, permitindo que o algoritmo de análise selecionado no software *Zetasizer* fosse o *General Purpose* (adequado para amostras de baixa PDI). Para o caso das micelas de LI, para se garantir que o seu comportamento era estável ao longo do tempo, a análise da emulsão foi até 72 horas e, como o comportamento das micelas era menos consistente em termos de diâmetro hidrodinâmico (dH), observando-se uma variação de índice de PDI entre 0,3 e 0,6. Neste caso o algoritmo de análise utilizado foi o *Contin*, mais adequado para amostras mais heterogêneas a nível de dH, permitindo obter uma representação mais segura dos resultados ^{90,91}.

Ambos os modelos citados anteriormente são usados para análise de dispersão do dH das micelas e considerados métodos “conservadores” visto que traduzem o valor médio real do dH das micelas medido pelo aparelho, tendo em conta o desvio padrão associado durante a medição ^{92,93}.

Para efeitos de análise comparativa, inicialmente os testes foram todos realizados para as mesmas condições, recorrendo à sonda *microtip*. Após se optar pela formulação LI / [S1:S2:0] voltou-se a repetir esta análise, exclusivamente para esta mistura, com a sonda de ultrassons de maior diâmetro e maior energia associada (*macrotip*), mantendo-se todas as outras condições de emulsificação e análise. Quando se utilizou a *macrotip*, a PDI da emulsão passou a variar apenas entre 0,3 e 0,4 associando-se esta diminuição ao facto da sonda conferir mais energia ao sistema, proporcionando uma emulsificação mais eficaz (homogénea em menos tempo).

Por cada grupo de medições foram analisados os dados e eliminados os ensaios com grandes erros. Para além disso, por cada medição, o software *Zetasizer* apresenta-nos dois resultados distintos que provém de duas análises efetuadas pelo software: a análise de dispersão (valor do pico médio) e a análise de cumulantes (valor de Z-average), sendo que para este trabalho foram apenas considerados os provenientes da análise de dispersão pois estes eram mais representativos da realidade da nossa amostra. No anexo C encontra-se discriminado o método de seleção de resultados utilizado bem como os resultados obtidos pelos membros do grupo GSP para diferentes formulações de emulsões através das duas metodologias de análise do *Zetasizer* ⁹⁰⁻⁹³.

4.2.3 Testes de solubilidade da Pp IX em PFD e em LI

Foram também realizados testes para averiguar qual dos sistemas melhor se adequava para inclusão do composto fotossensível na emulsão. Para isso uma quantidade conhecida de Pp IX foi adicionada ao meio disperso (PFD ou LI) e sujeita a agitação durante algumas horas. Para a concentração de 0,5 mg/mL a solubilização da Pp IX em LI verificou-se eficaz e rápida (< 24 horas), sendo favorável para a produção de cápsulas. Contrariamente, a Pp IX não se dissolveu na PFD, já que ao fim de 168 horas de agitação a fase sólida permanecia imiscível na PFD (mesmo a baixas concentrações). Concluiu-se assim que o sistema LI+Pp IX / [S1:S2:0] era o mais adequado para produção de cápsulas graças à capacidade de solubilização do PS no LI.

4.2.4 Cápsulas de sílica porosa usando o método sol-gel em meio aquoso

As nanocápsulas de sílica porosa contendo LI e Pp IX (nc/Si-LI+Pp IX) foram preparadas através de um método de sol-gel, por reações de hidrólise e condensação ocorridas entre o precursor de sílica usado (TEOS). O procedimento efetuado encontra-se esquematizado na Figura 8.

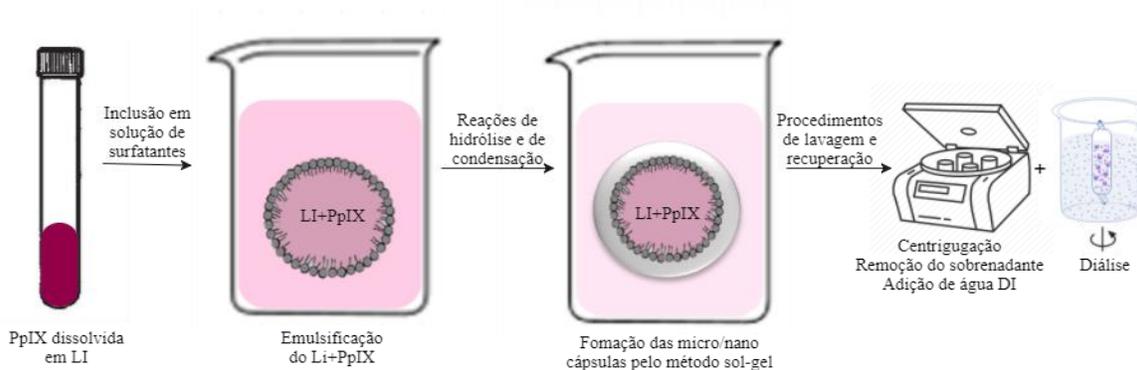


Figura 8 Metodologia para obtenção de nanocápsulas de sílica porosa.

Tendo em conta as conclusões obtidas nos pontos anteriores, referentes à mistura de surfatantes selecionada, ao meio descontínuo a usar (LI) e ainda ao tempo de sonicação, o sistema LI+Pp IX / [S1:S2:0] foi emulsificado nas condições pré determinadas. Em seguida procedeu-se à adição controlada de um catalisador ácido (HCl, 0.5 M), até se atingir um valor

de pH adequado. Simultaneamente, foi preparada uma solução de TEOS (de concentração pré-estabelecida) que foi pré-hidrolisada em condições ácidas. Deixou-se reagir ambos os sistemas durante 50-60 minutos e, após este tempo, esta solução aquosa foi adicionada à emulsão. Antes de se iniciar a reação de condensação foi adicionada uma determinada quantidade de um sal orgânico que, para além de reduzir a velocidade da reação de condensação, o que permite originar partículas mais uniformes, também ajuda a evitar a agregação das partículas formadas, ajudando ainda a estabilizar o potencial zeta da amostra 89,94.

Finalmente, foi ajustado o pH da reação (com NaOH, 0.5 M), até se obter um valor pré-definido para promover a reação de condensação. A reação decorreu durante 168 horas sob agitação de 1200 rpm. As variáveis temperatura e pH foram controladas em todos os passos acima descritos com o objetivo de reproduzir sempre este processo. Algumas reações foram também efetuadas ao longo de um tempo de reação 29 horas, no entanto, após se iniciar a caracterização das cápsulas obtidas houve a necessidade de testar um tempo de reação mais longo, passando a reação a decorrer sempre durante 168 horas.

Após o término da reação de condensação procedeu-se à lavagem das nc/Si-LI+Pp IX, a qual permitiu remover o excesso de surfatantes e de TEOS que possivelmente tenha ficado por reagir. Esta etapa iniciou-se com a centrifugação (HERMLE Z366, Labortechnik) a 5000 rpm por 5 minutos da suspensão obtida, seguida da remoção e recolha do sobrenadante e adição de água bi-destilada. Este passo foi repetido nas mesmas condições tendo o líquido sobrenadante sido novamente recolhido e armazenado e o volume de líquido extraído sido substituído por água bi-destilada. Esta etapa permitiu remover inicialmente já uma boa fração de surfatantes. A suspensão resultante foi delicadamente agitada e posteriormente introduzida em membranas de diálise imersas num banho de água destilada, trocada a cada 2 horas e sujeita a agitação magnética suave para promover a lavagem, que decorreu por 48 horas. Por fim a suspensão foi transferida para dois tubos de *falcon* e centrifugada uma última vez a 5000 rpm por 5 minutos. O líquido sobrenadante foi recolhido e adicionou-se água mili-Q a cada um dos *falcons* até fazer 15 mL de volume em cada um. As suspensões de nc/Si-LI+Pp IX foram então devidamente identificadas e armazenadas no refrigerador. Esta síntese foi repetida um total de 24 vezes para que a técnica fosse devidamente aperfeiçoada e se obtivesse quantidade suficiente para posterior caracterização.

4.3 Métodos de caracterização

4.3.1 Caracterização das nanocápsulas de sílica porosa

O diâmetro hidrodinâmico das nanocápsulas e o potencial zeta das mesmas foram avaliados através de DLS. O potencial zeta corresponde ao potencial elétrico desenvolvido na superfície das partículas, numa zona de fronteira conhecida como a dupla camada elétrica, composta por uma camada mais interna, onde os iões estão fortemente anexados e uma zona externa, mais difusa, onde os iões não estão tão firmemente ligados. Esta última camada é mutável e responsável por manter o equilíbrio entre a partícula e o meio. Como o fator que influencia mais criticamente o potencial zeta da suspensão é o pH foi realizada uma análise comparativa entre estes dois parâmetros. Em meio ácido, devido ao aumento de cargas positivas ($-H^+$), uma suspensão de partículas tenderá a ver o seu potencial zeta aumentado, ao passo que, em meio básico registrar-se-á uma diminuição do potencial. Para além disso, a magnitude do potencial zeta funciona ainda como indicador da estabilidade do sistema coloidal, assim sendo, se todas as partículas em suspensão possuírem um valor de zeta elevado (quer seja este negativo, quer positivo), isto significa que as partículas tendem a repelir-se umas às outras, o que previne a sua floculação. Normalmente consideram-se como estáveis suspensões de potencial zeta superior a +30 mV ou inferior a -30 mV ^{91,95}.

Nesta secção, as partículas foram estudadas em vários momentos importantes decorridos ao longo do processo de obtenção das nc/Si-LI+Pp IX nomeadamente: 1) Imediatamente após a emulsificação do LI; 2) Após hidrólise do co-precursor de sílica S2; 3) Após adição do TEOS hidrolisado à mistura; 4) Após adição do sal orgânico; 5) Após início da reação de condensação; 6) 29 horas após início da reação de condensação / 168 horas após início da reação de condensação; 7) Após diálise. À semelhança das condições de análise usadas para medição do diâmetro hidrodinâmico das partículas da emulsão (Tabela 6), a caracterização decorreu à temperatura de câmara de 25 °C, com tempo de estabilização de 60 segundos, efetuando-se 5 repetições por medição e usando o modelo de análise CONTIN. A medição do potencial zeta das partículas foi efetuada à temperatura de câmara de 25 °C, com tempo de estabilização de 60 segundos, efetuando-se 5 repetições por medição e o método de análise eleito foi o *Auto mode*.

4.3.2 Composição, morfologia e rendimento de massa da reação de formação de micro/nano cápsulas de sílica porosa

Nesta secção procurou-se analisar a composição, morfologia e o rendimento da reação através de secagem e liofilização das suspensões de nanocápsulas. Como esta análise implicava a recuperação das cápsulas foi também avaliada a sua morfologia por microscopia ótica, SEM (Gemini2, ZEISS e Vega3, Tescan) e TEM (Grids 200 mesh). O SEM foi efetuado para as voltagens de 2 e 5 kV, taxa de aquisição de 0,96 nm/s e revestimento de ouro de <5nm, tendo sido analisadas cápsulas em suspensão aquosa evaporadas às condições PTN e amostras de cápsulas calcinadas na mufla, sujeitas a suave desagregação nas ampliações de 10k, 50k e 100k. Foram sujeitas a análise TEM amostras de cápsulas em suspensão aquosa, secas por evaporação às condições normais de pressão e temperatura para diferentes diluições (1:1, 1:2, 1:4).

Tentou-se posteriormente recuperar as cápsulas por secagem/liofilização, sujeitando-se em seguida a massa de cápsulas obtida a análise termogravimétrica (TGA, Q600 TA Instruments), num intervalo de temperatura entre os 25 e os 600 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e sobre uma atmosfera de azoto à taxa de 100 ml/min, para quantificação relativa dos elementos das cápsulas (LI e sílica).

As cápsulas de tempo de reação de 29 horas demonstraram não ser eficientemente recuperadas através de liofilização, tendo-se assistido à desincorporação do líquido iónico para o exterior da estrutura das cápsulas. Neste sentido, atendendo a que não foi possível extrair a água da suspensão de cápsulas obtidas através de liofilização, o rendimento de massa foi calculado recorrendo a uma secagem lenta e à P_{atm} na estufa programada a 50° C. A suspensão de cápsulas foi transferida para duas placas de Teflon e deixou-se a água a evaporar ao longo de 5 dias. Após a secagem, as placas foram pesadas e avaliou-se a massa final de cápsulas produzidas, tendo o rendimento sido calculado relativamente à massa total de elementos incorporados na reação.

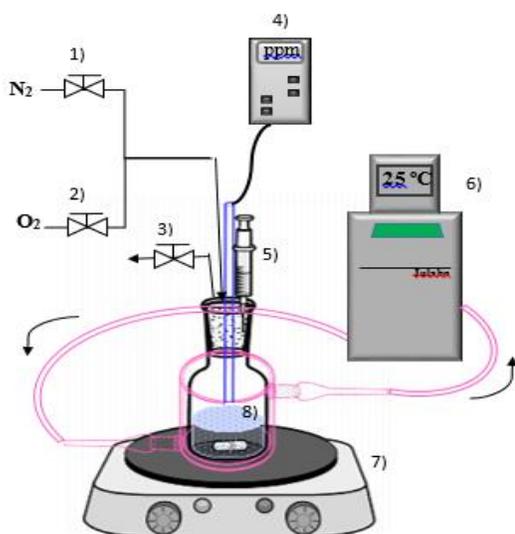
As cápsulas cujo tempo de reação foi incrementado para 1 semana (168 horas) demonstraram ser mais estáveis a nível estrutural, permitindo a sua recuperação através de liofilização em tubos de *falcon*. A massa final foi pesada e o rendimento de massa calculado à semelhança do descrito acima.

O resíduo final obtido após análise TGA foi estudado através de FTIR (FT-NIR/MIR, PerkinElmer), tendo a análise sido realizada recorrendo ao sistema de refletância (ATR) com uma resolução de 4 cm^{-1} e 128 acumulações entre $4000 - 500\text{ cm}^{-1}$. Este teste permitiu tirar conclusões acerca da presença de material inorgânico (sílica) na composição da superfície das cápsulas testadas. Foram ainda analisadas através de FTIR amostras de líquido iónico, Pp IX e cápsulas liofilizadas e secas em estufa com o intuito de avaliar se o material à superfície das cápsulas sujeitas a secagem era de facto líquido iónico. Estas últimas análises foram efetuadas no FTIR (FT/IR, Jasco) tendo a análise sido realizada recorrendo a pastilhas de KBr com uma resolução de 4 cm^{-1} e 128 acumulações entre $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$.

Adicionalmente, com o objetivo de conhecer a concentração efetiva de cápsulas em cada suspensão realizaram-se análises termogravimétricas nas mesmas condições citadas anteriormente, a alíquotas das suspensões de cápsulas usadas nos ensaios de oxigenação e de oxidação, enunciados nos pontos seguintes. Para este efeito, o volume de todas as amostras foi acertado (para o mesmo volume final de 31 mL) e foi recolhida uma alíquota de 1 mL de cada amostra, sob agitação.

4.3.3 Quantificação da absorção/libertação de oxigénio pelas micro/nano cápsulas de sílica porosa

A absorção/libertação de oxigénio pela emulsão de LI e pelas nc/Si-LI+Pp IX foi avaliada através de dois ensaios de monitorização da evolução de concentração de oxigénio (ppm) no meio aquoso onde as amostras a estudar foram integradas. Na Figura 9 apresenta-se a representação esquemática do sistema de incorporação e medida de O_2 .



- 1) Válvula de entrada de azoto;
- 2) Válvula de entrada de oxigênio;
- 3) Válvula de alívio de pressão;
- 4) Medidor de oxigênio acoplado ao sensor;
- 5) Seringa para injetar amostra a testar;
- 6) Banho e fluxo de líquido refrigerador a 25 °C;
- 7) Placa de agitação magnética;
- 8) Frasco com mistura experimental.

Figura 9 Representação esquemática do sistema experimental para os ensaios de quantificação da absorção/libertação de oxigênio e respetiva legenda.

As experiências decorreram a 25° C com temperatura controlada e com agitação constante de 300 rpm. Foi utilizado um medidor de oxigênio (Consort Z621) tendo-se efetuado uma calibração prévia de um ponto.

O primeiro ensaio teve como objetivo quantificar a absorção de oxigênio, proveniente de água saturada com oxigênio, por cada um dos componentes em estudo (emulsão de LI e nc/Si-LI+Pp IX), tendo sido avaliadas duas concentrações distintas de amostra em água para analisar paralelamente o efeito de diluição ($V_{\text{inicial água}} = 35 \text{ mL}$; $V_{\text{amostra}} = 5 \text{ mL}$ e $V_{\text{inicial água}} = 30 \text{ mL}$; $V_{\text{amostra}} = 10 \text{ mL}$). Para analisar os resultados de forma comparativa, foram realizados três ensaios distintos para cada concentração recorrendo 1) a uma amostra de água desgaseificada (referência); 2) a uma amostra de emulsão de LI desgaseificada (concentração de LI: 11,09 mg/mL); 3) a uma amostra de cápsulas em suspensão desgaseificada (concentração de LI: $12,34 \pm 0,832 \text{ mg/mL}$). Para cada ensaio foram realizadas medidas de concentração de oxigênio (ppm) recorrendo ao sistema da Figura 9. O procedimento foi repetido de igual forma para todas as amostras em estudo. O volume inicial de água foi desgaseificado durante 20 minutos através dum fluxo contínuo de N_2 a 3 bar. Após garantir que o volume inicial de água estava desgaseificado (0 ppm) a válvula de N_2 foi fechada e abriu-se a válvula de O_2 . O fluxo contínuo de O_2 foi adicionado, por sua vez, durante 20 minutos à pressão de 2 bar, saturando a água. Finalmente, a amostra a estudar (água, emulsão,

ou cápsulas) foi previamente desgaseificada através de fluxo de N₂ a 3 bar durante 30 minutos e em seguida adicionada à água saturada em O₂, por via de uma seringa, avaliando-se de seguida a evolução de concentração de O₂ no meio. Partindo do pressuposto que tanto a emulsão como as cápsulas são capazes de absorver oxigénio deverá ser observável um decréscimo de concentração de O₂ disponível presente no sistema.

O segundo ensaio teve por objetivo avaliar a difusão do oxigénio do interior das amostras em estudo (emulsão de LI e nc/Si-LI+Pp IX gaseificadas) para o meio envolvente (água desgaseificada). Recorreu-se 1) a uma amostra de água gaseificada (referência); 2) a uma amostra de emulsão de LI gaseificada (concentração de LI: 11,09 mg/mL); 3) a uma amostra de cápsulas em suspensão gaseificada (concentração de LI: 14,58 ± 0,608 mg/mL). Nesta fase avaliámos apenas amostras numa proporção ($V_{\text{inicial água}} = 30 \text{ mL}$ e $V_{\text{amostra}} = 10 \text{ mL}$) pois o efeito de diluição foi estudado com sucesso no ensaio anterior. Em primeiro lugar, os 30 mL de água adicionados ao sistema foram desgaseificados recorrendo ao fluxo de N₂ a 3 bar durante 20 minutos. Seguidamente, a amostra em estudo foi saturada através da adição de um fluxo de O₂ a 2 bar, durante 30 minutos. Por fim, os 10 mL de amostra gaseificada foram imediatamente adicionados à água desgaseificada, esperando-se um aumento da concentração de O₂ disponível no sistema, resultante da difusão deste gás da amostra (emulsão de LI/nanocápsulas) para o meio envolvente.

Com base nos resultados obtidos, a difusão de oxigénio pelo líquido iónico foi quantificada através do estudo do coeficiente de transferência de oxigénio ($K_L a$). Com esse objetivo baseámo-nos no método de desgaseificação estático que postula que o aumento da concentração de oxigénio dissolvido é dado por ⁹⁶:

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C^* - C_L) \quad (i)$$

Integrando a equação (i) obtém-se:

$$\int_0^{C_L} \frac{dC_L}{C^* - C_L} = K_L a \int_0^t dt \Leftrightarrow \ln(C^* - C_L) = -K_L a \cdot t \quad (ii)$$

Onde: C_L é a concentração de oxigénio dissolvido no meio em estudo;

C^* é a concentração de saturação de oxigénio dissolvido no meio;

$K_L a$ é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigénio.

Sabendo que o valor de saturação de oxigénio dissolvido na água (C^*) a 25 °C é 8,3 ppm, foi possível calcular o $K_L a$ para as diferentes situações em estudo, através da equação (ii) ⁹⁷. Representando graficamente $\ln(C^* - C_L)$ em função do tempo (t) obtém-se um perfil que pode ser dividido em três retas cujos declives correspondem respetivamente ao $-K_{LA1}$ (zona inicial de transferência de oxigénio mais intensa), ao $-K_{LA2}$ (zona de transição intermédia caracterizada por outros fenómenos de transferência) e ao $-K_{LA3}$ (zona de equilíbrio de declive ~ 0). O K_{LA} corresponde portanto ao inverso do declive das retas e pode apresentar valores positivos ou negativos consoante o tipo de fenómeno difusivo, como se pode observar pela representação esquemática da Figura 10.

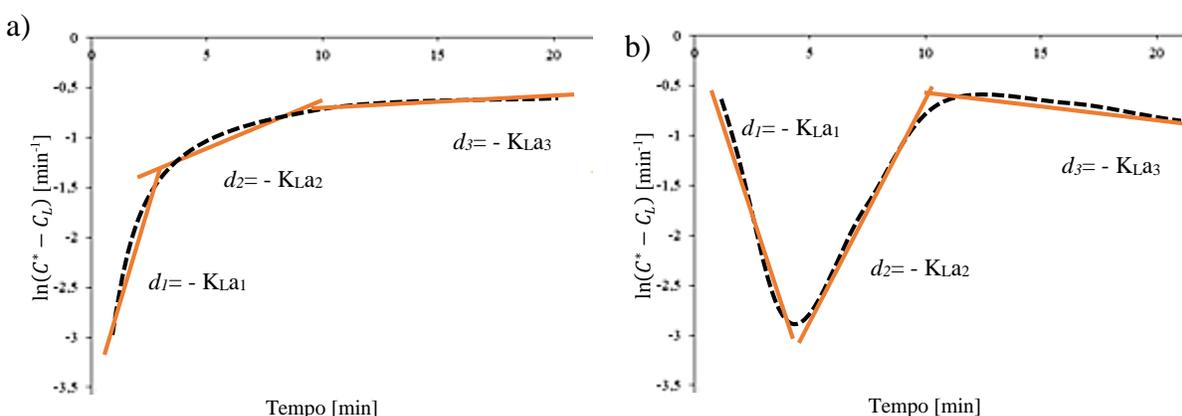


Figura 10 Representação genérica do cálculo das constantes K_{LA1} , K_{LA2} e K_{LA3} para o ensaio de consumo de O_2 do meio (a) e para o ensaio de difusão de O_2 para o meio (b).

4.3.4 Quantificação da produção de ROS pelas nanocápsulas de sílica porosa

A produção de ROS pelas nc/Si-LI+Pp IX foi confirmada e quantificada através da realização de ensaios de eficiência de oxidação do DPPH. O DPPH é um composto estável que possui na sua composição um radical. Devido à presença de um eletrão desemparelhado na sua geometria este apresenta um pico de absorção acentuado aos 517 nm. Como se encontra representado na Figura 11, o átomo radical do DPPH reage com agentes redutores (ROS), produzindo uma nova ligação o que provoca uma alteração na cor da solução. Este reagente funciona como um bom quantificador de ROS, já que a solução perde a sua cor característica à medida que a concentração de antioxidantes aumenta no meio e estes se vão

emparelhando com o radical do DPPH. A redução dos radicais de DPPH pode portanto ser monitorizada espectrofotometricamente através do decréscimo da absorção aos 517 nm ⁹⁸.

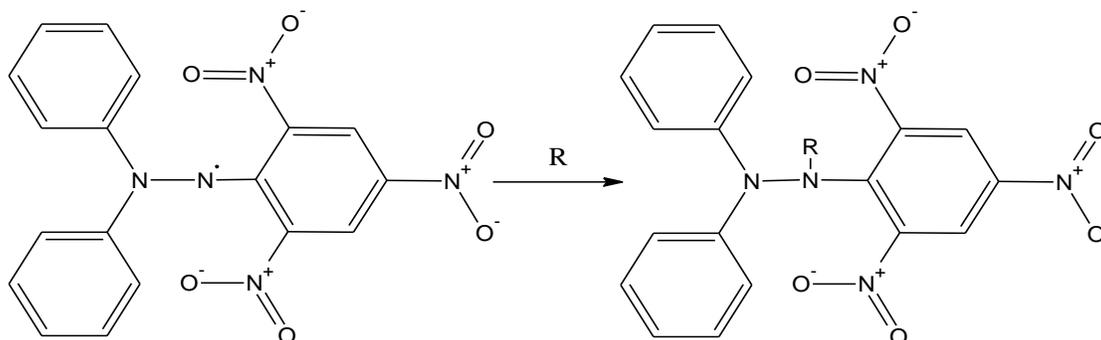
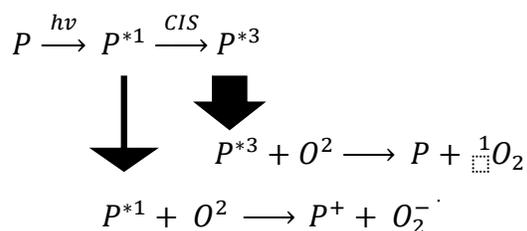


Figura 11 Esquemática da reação do DPPH com ROS ($\text{DPPH}^{\bullet} \rightarrow \text{DPPHR}$) baseada na referência 98.

O pico correspondente à absorção da Pp IX foi também monitorizado na sua absorção característica aos 402 nm. A Pp IX, já descrita acima como um precursor do HEME que ocorre naturalmente no organismo. À semelhança do já previamente descrito na introdução, a Pp IX fotossensível ao receber energia sob a forma de luz visível passa a um estado singlete excitado (P^{*1}) por cedência de um eletrão. Na via mais comum e eficiente de reação da Pp IX, o estado excitado pode converter-se, através de reações de conversão intersistema (CIS), num estado tripleto excitado (P^{*3}), sendo esse o estado responsável por reagir com o O_2 e converte-lo em singlete de oxigénio ($^1\text{O}_2$). Após o término da reação, a Pp IX desexcita e retorna ao seu estado base, podendo voltar a desencadear o ciclo descrito. Outras vias menos recorrentes permitem obter o ião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a partir do estado singlete excitado (P^{*1}) ⁹⁹.



No sentido de estabelecer as variáveis segundo as quais os testes às cápsulas deviam decorrer foram realizados estudos preliminares em que se estudou diretamente o desempenho da Pp IX. Os estudos efetuados encontram-se descritos na Tabela 7 (i, ii, iii, iv, v).

Tabela 7 Condições experimentais dos testes de DPPH preliminares

	Amostra a estudo	O ₂	Irradiação	Adição de DPPH	Análise	Duração	
I	Etanol+Pp IX [25 µg/mL]	Ausência (desgaseificada por 15 min)	- 532 nm por 5 min; - 406 nm por 5 min	Após irradiação	360 – 800nm	60 min (intervalos de 10 min)	
ii		Saturada pelo ar	- 532 nm por 0, 5, 10 e 20 min;				
iii							
iv	50% H ₂ O/ 50% Etanol+Pp IX	Saturada c/ O ₂ a 1 bar por 15 min	- 532 nm por 5 min	Antes da adição do O ₂	517 nm	60 minutos (intervalos de 5 min)	
v	Suspensão aquosa de cápsulas			Saturada pelo ar			Antes da irradiação
vi							
vii							

Para este efeito diluiu-se uma concentração pré determinada deste composto em etanol p.a. e, realizaram-se diversos testes em que se foram variando as condições experimentais (concentração de O₂ na amostra, comprimento de onda de irradiação, momento de adição do DPPH e análise do comprimento de onda de absorção), usando sempre uma amostra de concentração conhecida de Pp IX nos sistemas sujeitos a teste

Tendo-se definido os parâmetros experimentais iniciais prosseguiu-se para uma análise específica para os 517 nm. Neste caso foi adicionada às amostras água (50% H₂O / 50% Etanol+Pp IX [25 µg/mL]) com o objetivo de aumentar a solubilidade de O₂. Posto isto, as amostras foram saturadas com O₂ num fluxo contínuo de 2 bar. Nestas condições foram testadas duas amostras em que se alterou a ordem de adição do DPPH (iv e v da Tabela 7). Uma última análise preliminar foi ainda efetuada, desta vez recorrendo a uma alíquota de cápsulas (de quantidade desconhecida). Nesta fase uma das amostras foi borbuhada com O₂ enquanto a outra não (vii e viii respetivamente).

Após definir o comprimento de onda de irradiação, o tempo de irradiação, o método de saturação da amostra com O₂ e a concentração da suspensão de cápsulas a usar, passou-se para o ensaio de avaliação da produção de ROS cujas condições foram as seguintes:

- 1) Cápsulas com Pp IX (12,70 ± 0,719 mg/mL) → Saturadas por fluxo de O₂ a 2 bar por 30 minutos → Adição de DPPH → Irradiação a 532 nm durante 10 minutos;
- 2) Cápsulas com Pp IX (12,70 ± 0,719 mg/mL) → O₂ ambiental → Adição de DPPH → Irradiação a 532 nm durante 10 minutos;

- 3) Cápsulas sem Pp IX ($14,58 \pm 0,608$ mg/mL) → Saturadas por fluxo de O₂ a 2 bar por 30 minutos → Adição de DPPH → Irradiação a 532 nm durante 10 minutos;
- 4) Cápsulas sem Pp IX ($14,58 \pm 0,608$ mg/mL) → O₂ ambiental → Adição de DPPH → Irradiação a 532 nm durante 10 minutos;

Para obter a atividade efetiva da Pp IX nas nc/Si-LI+Pp IX o efeito do líquido iônico foi removido subtraindo o espectro obtido na alínea 3) ao da alínea 1) e o espectro obtido na alínea 4) ao da alínea 2). Com este ensaio espera-se quantificar não só a eficiência de produção de ROS pelas cápsulas com Pp IX como também avaliar se a saturação forçada de O₂ provoca alterações significativas na produção de ROS, usando os ensaios realizados às cápsulas sem Pp IX como referências. Adicionalmente foi ainda obtido o espectro de atividade oxidante da Pp IX dissolvida em etanol por forma a avaliar se a inclusão da mesma em nc/Si-LI+Pp IX potenciava a sua atividade oxidante. Foi também medido o espectro de absorção da sílica porosa em suspensão aquosa para confirmar que esta não influenciava a interação da Pp IX com o DPPH. Estes ensaios foram realizados ao longo de 820 minutos, permitindo determinar mais extensivamente a evolução da atividade da Pp IX.

Foram posteriormente realizados testes recorrendo a outro composto de deteção de ROS, o 1,3-difenilisobezofuran (DPBF) na concentração de 8 mM. Para estes ensaios as amostras a estudo foram sujeitas ao mesmo tempo de irradiação pelo laser de 532 nm (10 minutos) e a absorção do DPBF foi monitorizada aos 412 nm (λ_{max} de absorção do composto) durante 20 minutos. Foram estudadas amostras de cápsulas com Pp IX e sem Pp IX, tendo-se previamente desgaseificado as amostras aplicando um fluxo de N₂ a 3 bar por 20 minutos e, gaseificando-as de seguida com O₂ aplicado num fluxo a 2 bar por 20 minutos.

5 Resultados experimentais e discussão

5.1 Concentração micelar crítica para dois sistemas de surfatantes

Para garantir a formação de emulsões em meio aquoso, a concentração micelar crítica (CMC) teve que ser determinada para os dois sistemas de surfatantes usados. Como não existiam na literatura informações relativas à CMC das misturas de surfatantes em estudo, estas tiveram que ser determinadas por nós. Como já foi referido acima, a CMC do sistema (1) foi calculada para este trabalho, ao passo que a CMC para o sistema (2) já tinha sido previamente determinada por uma aluna de mestrado MIEQ, num trabalho anterior.

Nas figuras seguintes (Figura 12 e Figura 13) encontram-se os resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfatantes C (mM). As curvas obtidas são caracterizáveis pela presença de uma fase descendente de declive acentuado, seguida de um ponto transitório bem definido até se atingir uma zona linear horizontal de declive próximo de zero. Esta zona linear corresponde ao estado de saturação da superfície em que, por mais que se aumente a concentração surfatantes no meio, o decréscimo da tensão superficial é insignificante – zona de estabilidade atingida após o valor da CMC. Estes resultados encontram-se concordantes com o que é frequentemente reportado na literatura 100,101.

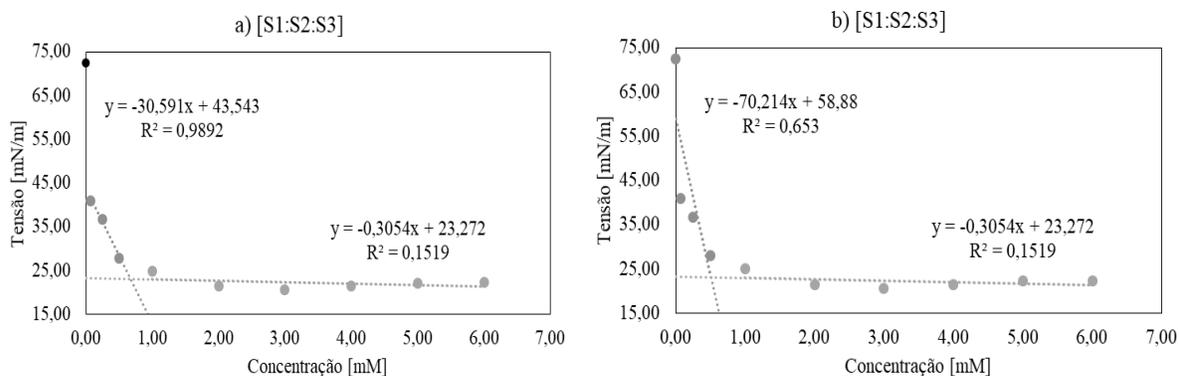


Figura 12 Representação dos resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfatantes para o sistema (1) excluindo o valor de tensão superficial da água (a) e incluindo o valor da tensão superficial da água no ajuste linear (b).

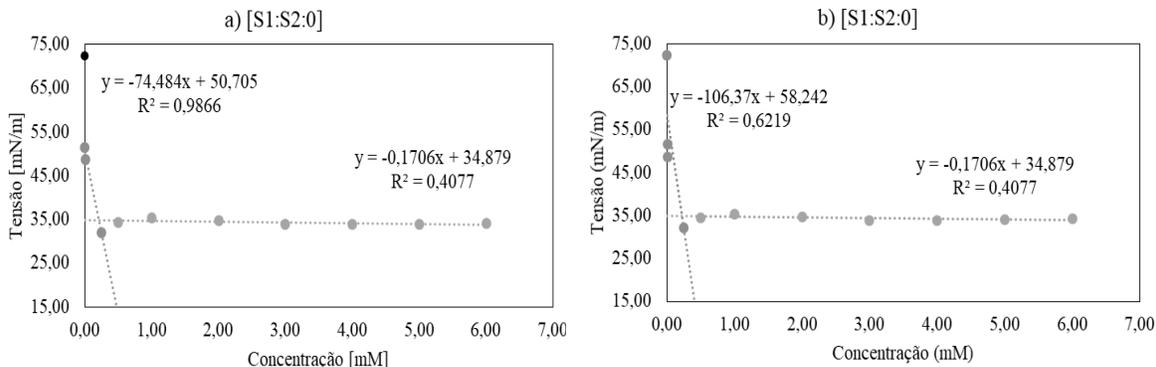


Figura 13 Representação dos resultados da tensão superficial γ (mN/m) em função da concentração total de surfatantes para o sistema (2) excluindo o valor de tensão superficial da água (a) e incluindo o valor da tensão superficial da água no ajuste linear (b).

Através dos gráficos criados acima foram extrapolados valores experimentais de CMC para os sistemas estudados, que podem ser consultados na Tabela B1 do anexo. Nesta tabela encontram-se os valores obtidos para todos os sistemas estudados pelo grupo GSP. Para obtenção dos resultados A e B da Tabela B1, a CMC foi calculada a partir da interseção das duas retas representadas nos gráficos, segundo a metodologia mais reportada na literatura. Na análise A o valor da tensão superficial medido para a água bi-distilada não foi considerado, tendo sido incluído na análise B, num esforço de aumentar a amostragem e consequentemente o valor de R^2 (quadrado do coeficiente de correlação) da regressão linear aplicada. Contudo, a maioria dos autores trabalha com um intervalo de concentrações muito alargado, isto é, a tensão superficial é determinada para pelo menos cinco concentrações abaixo do ponto de transição, permitindo-lhes traçar retas de regressão com um valor de R^2 superior ao obtido por nós. Assim sendo, e como para este trabalho não se reuniram as condições para determinar o número de pontos suficiente abaixo do ponto de transição, decidiu-se estipular um valor C, resultante diretamente de uma análise visual do gráfico e correspondente a uma concentração indubitavelmente acima da CMC que tomámos como referência para formulação das emulsões.

Com base nestes resultados estipulou-se para os estudos cinéticos se deveria usar uma concentração molar de surfatantes entre 1 e 10 mM, para ambos os sistemas estudados. Registou-se ainda um maior abaixamento de tensão superficial no sistema que incluía o surfatantes S₃, o que corrobora a conclusão já anteriormente obtida por Sylvia et al. (2017) e confirmada pela informação existente na literatura de que os surfatantes de cauda fluorada

possuem maior caráter tensoativo, no entanto, necessitam de maior concentração de surfatantes para atingirem a CMC ^{89,100-102}.

5.2 Cinética de formação e de estabilidade de emulsões PFD em água e LI em água usando dois sistemas de surfatantes

Como já foi previamente referido, para execução das nanocápsulas, optou-se para utilização do sistema [P_{6,6,6,14}][NTf₂] / [S1:S2:0], não obstante, foram realizados estudos cinéticos com resultados conclusivos para ambos os sistemas descritos acima, pelo que nesta secção se apresentam os resultados obtidos para ambos.

Foi estudada a cinética de formação e estabilidade das micelas para os diferentes sistemas, tendo sido possível perceber a influência do tempo de sonicação na emulsificação dos dois compostos a estudo e respetivo tamanho de micelas obtidas.

Usando a *microtip* (500 W, 6,35 mm) para emulsificar a PFD foram obtidos os seguintes resultados:

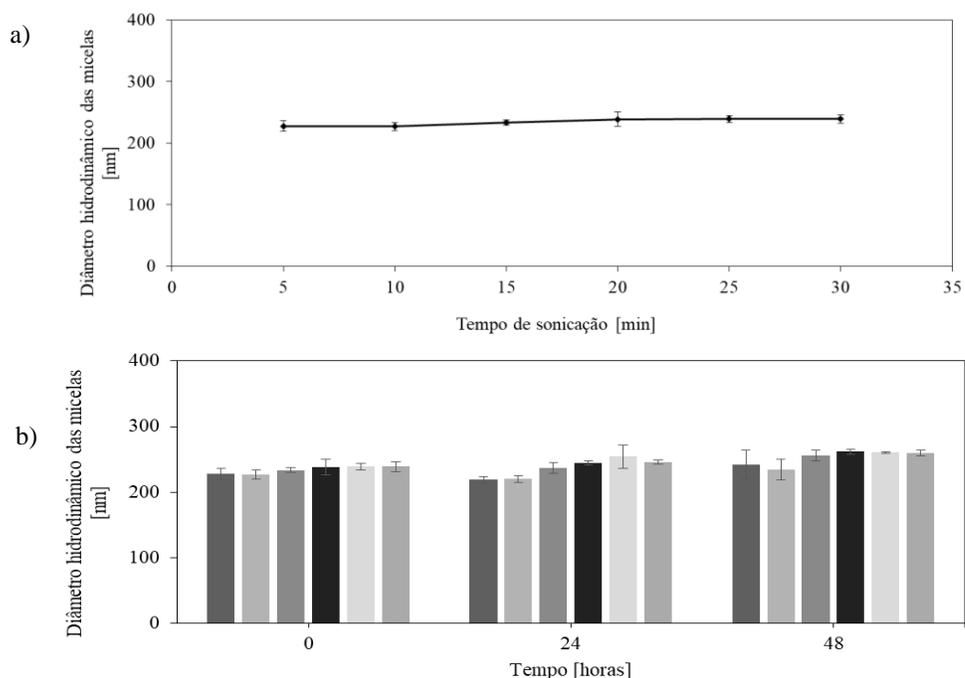


Figura 14 a) Cinética de formação para o sistema PFD/[S1:S2:S3]; b) Cinética de estabilidade para o sistema PFD/[S1:S2:S3]. (Legenda: ■ – 5 minutos; ■ – 10 minutos; ■ – 15 minutos; ■ – 20 minutos; ■ – 25 minutos; ■ – 30 minutos).

Para o caso da cinética de formação (Figura 14a) entre os 5 e os 30 minutos de sonicação o dH variou apenas 4,8%, sendo no entanto perceptível um ligeiro aumento de dH entre os 5 e os 20 minutos de sonicação, seguido de um patamar praticamente horizontal em termos de declive. Esta evolução deve-se, provavelmente, à emulsificação incompleta da PFD para os minutos iniciais do processo, sendo claro que a partir dos 20 minutos a emulsificação total foi atingida. Ao analisar os gráficos da cinética de estabilidade (Figura 14b) é notório um comportamento particularmente distintivo na evolução de dH entre as micelas obtidas antes e depois dos 10 minutos, registando-se uma estabilização no dH para as micelas obtidas entre os 15 e os 30 minutos de sonicação. Aos 48 minutos, este último grupo de micelas (15-30 minutos de sonicação) encontrava-se bastante próximo em termos de dH, sendo o coeficiente de variação (σ) associado a estes valores de apenas 2%.

Face aos resultados obtidos por investigadores do grupo GSP para formulações de PFD emulsificada usando diferentes concentrações relativas de surfatantes S1, S2 e S3 (Anexo C1), verificou-se que, na sua generalidade estas formulações permitiam obter micelas de baixo dH (entre 150 e 400 nm) sendo que os sistemas com maior fração de S3 permitiam obter micelas mais pequenas do que os com maior fração de S1. Quanto maior a quantidade de S3 maior era a tendência para diminuição do dH ao longo do tempo de sonicação. Para além disso, foi possível concluir que a presença de S2 também favorecia a diminuição do diâmetro das micelas, mas não tão drasticamente como o S3.

A formulação anteriormente analisada permitiu obter micelas de baixo dH, com reduzida polidispersividade, elevada estabilidade e baixo desvio padrão associado, funcionando assim como uma alternativa eficiente. Foi ainda possível concluir que, em comparação com os resultados obtidos por Sousa et al. (2017) onde foi usado o líquido iónico [OMIM][NTf₂]⁸⁹, esta formulação com PFD verificou-se mais estável e de dH inferior (Anexo C).

Ao usar o sistema (2) para emulsificar o [P_{6,6,6,14}][NTf₂], a emulsificação completa verificou-se mais demorada, sendo que os dados obtidos revelam isso mesmo. Durante a emulsificação do LI, a mistura adquire uma cor branca baça que dificulta a avaliação visual da emulsificação, apesar disso, foi possível verificar a existência deste líquido no fundo do frasco até pelo menos aos 25 minutos, no caso da emulsificação com a sonda *microtip* e até pelo menos aos 15 minutos, com a sonda *macrotip* (de maiores dimensões e mais energética).

Na Figura 15a, respeitante à cinética de formação obtida para a emulsificação com a *microtip*, pode observar-se que o dH das micelas aumenta consideravelmente ao longo dos 30 minutos, sendo notável também o aumento do desvio padrão associado aos resultados recolhidos (comparativamente aos desvios obtidos anteriormente para o sistema com PFD). Este resultado pode dever-se a uma maior dispersividade associada aos valores de dH das micelas para cada um dos tempos de sonicação. Para este caso, o coeficiente de variação (σ) registado entre os 5 e os 30 minutos foi de 13,6%, sendo óbvio um crescimento muito acentuado até aos 15 minutos. Esta observação, e o facto do valor de desvio previamente citado se situar acima do aceitável (<10 %), compeliu-nos a calcular o coeficiente de variação apenas entre os 15 e os 30 minutos de sonicação, obtendo-se para este caso um coeficiente de variação (σ) de 9%. Na Figura 15b, encontram-se os dados referentes à cinética de formação obtida através da emulsificação do sistema (2) com a *macrotip*. Neste caso o crescimento das partículas foi mais acentuado entre os 5 e os 10 minutos, continuando a crescer mais suavemente até aos 20 minutos. Este comportamento sugere uma emulsificação mais rápida e eficaz, relativamente à obtida usando a *microtip*. Os desvios padrão associados às medições são também inferiores, o que nos leva concluir que esta sonda permite obter micelas de dH mais homogéneo. Entre os 5 e os 30 minutos de sonicação o coeficiente de variação (σ) foi 14,6%, tendo-se observado um pico para os 20 minutos, seguido de um decréscimo até aos 30 minutos. Esta diminuição de tamanho de partículas pode dever-se à aplicação de energia mais elevada, durante um longo período de tempo, o que potencia a fragmentação de micelas de diâmetro mais elevado em diâmetros mais reduzidos. Entre os 15 e os 30 minutos o coeficiente de variação desceu para apenas 5,9%, o que revela uma maior coerência de resultados obtidos quando se recorre à *macrotip* em detrimento da *microtip*.

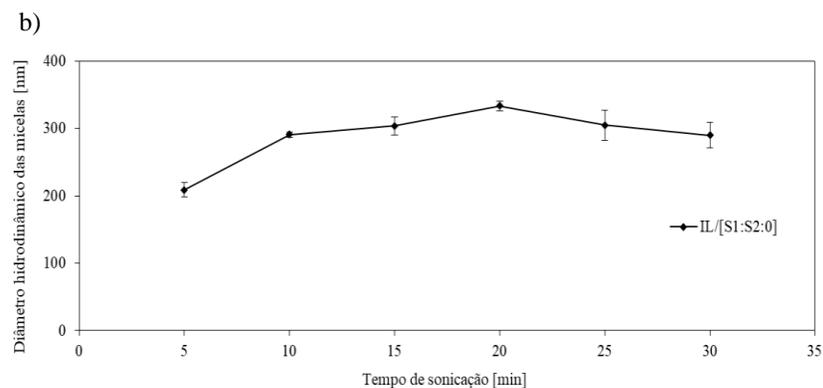
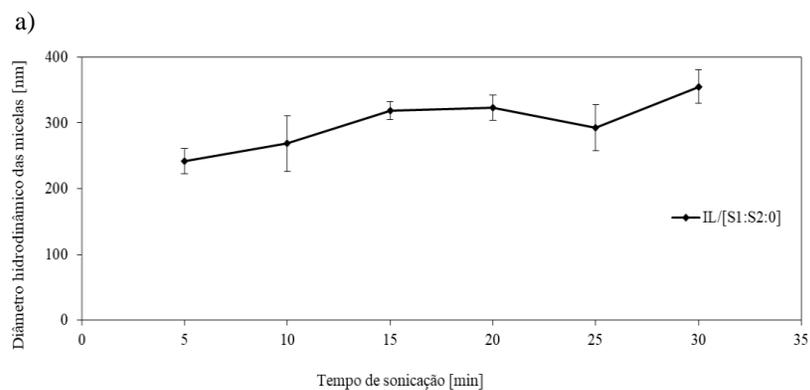


Figura 15 a) Cinética de formação para o sistema LI/[S1:S2:0] obtida recorrendo à sonda microtip; b) Cinética de formação para o sistema LI/[S1:S2:0] obtida com a sonda macrotip.

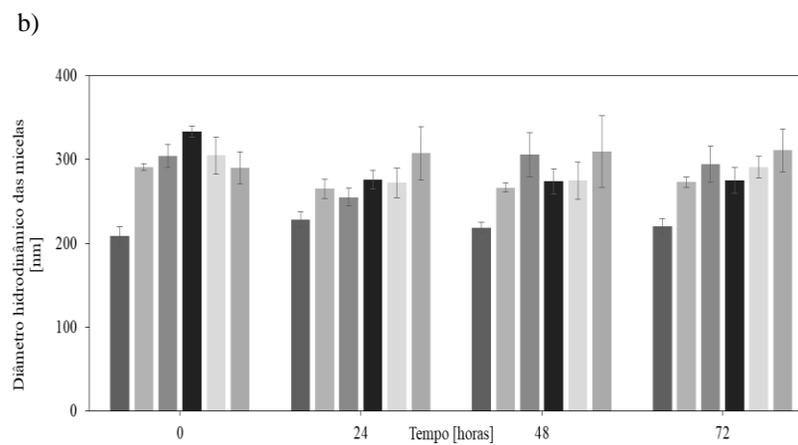
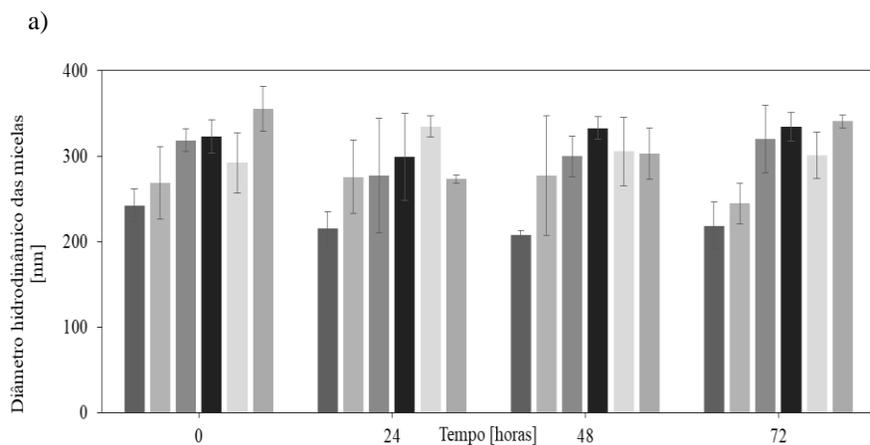


Figura 16 a) Cinética de estabilidade para o sistema LI/[S1:S2:0] obtido com a sonda microtip; b) Cinética de estabilidade para o sistema LI/[S1:S2:0] obtido com a sonda macrotip. (Legenda: ■ – 5 minutos; ■ – 10 minutos; ■ – 15 minutos; ■ – 20 minutos; ■ – 25 minutos; ■ – 30 minutos).

Focando agora atenção na cinética de estabilidade obtida recorrendo à *microtip* (Figura 16 a), mais uma vez podemos distinguir que para os 5 e 10 minutos de sonicação os valores de dH permaneceram consideravelmente abaixo dos restantes, sendo que para o cálculo do coeficiente de variação final optou-se por excluir os valores dos 5 e 10 minutos de sonicação por ser evidente, tanto pela análise da cinética de formação como pela de estabilidade, que a emulsificação do LI era ainda muito incompleta. Nestas condições, o coeficiente de variação registado foi de 5,4%.

Comparando os dados da Figura 16a com os da 16b observa-se não só que os desvios padrão diminuem no geral, como o dH médio final das micelas é também inferior, verificando-se assim que ultrassons mais energéticos e aplicados em maior área de superfície (*macrotip*) asseguram partículas mais pequenas, úteis para a aplicação que temos em vista. É possível também identificar que usando a *macrotip* as partículas passam a ter um comportamento semelhante em termos de dH logo a partir dos 10 minutos, em oposição às obtidas com a *microtip*. O coeficiente de variação entre os 15 e os 30 minutos de sonicação para as 72h foi de 4,9%. Tendo em conta estes resultados e atendendo a que as variações registadas ao longo das cinéticas não são muito significativas, optou-se por seleccionar a sonda *macrotip* aliada a um tempo de sonicação de 25 minutos para a formação das emulsões usadas para a síntese das nc/Si-LI+Pp IX. Este intervalo de tempo foi escolhido tendo em conta não só os dados recolhidos acima, que situavam os 25 minutos como um tempo de cinética na zona estável, como também a observação direta do aspeto da emulsão ao longo do processo. Espera-se assim obter partículas com um diâmetro médio de $291,2 \pm 12,9$ nm. Comparativamente aos resultados para as formulações estudadas por Sousa, S. et al. (2017) para o líquido iónico [OMIM][NTf₂] (Anexo C2) pôde ainda concluir-se que a nossa formulação permitiu obter partículas de dH inferior (com o [OMIM][NTf₂] o diâmetro máximo das micelas variou entre 400 e 480 nm) no entanto, os dados para a formulação (2) apresentavam maiores desvios padrão associados, o que pode significar que o [P_{6,6,6,14}][NTf₂], usado neste trabalho, apresenta maior instabilidade quando integrado em emulsão do que o [OMIM][NTf₂].

5.3 Nanocápsulas de sílica porosa usando o método sol-gel em meio aquoso

5.3.1 Evolução da dimensão e do potencial zeta das nc/Si-LI+Pp IX

Ao longo do procedimento de obtenção de cápsulas o pH da reação foi estritamente controlado, tendo os dados relativos ao diâmetro das nanocápsulas e o seu potencial zeta sido recolhidos em sete fases distintas da reação para melhor controlo e compreensão deste processo. As fases em estudo foram: 1) Imediatamente após emulsificação do sistema $[P_{6,6,6,14}][NTf_2] / [S1:S2:0]$; 2) Após reação de hidrólise do surfatante S2 da emulsão; 3) Após adição do TEOS hidrolisado à emulsão pré hidrolisada; 4) Após adição do sal orgânico à reação; 5) Após aumento do pH da emulsão, catalisando o início da condensação; 6) Após a reação de condensação; 7) Após dois dias de diálise. Como foram produzidas cápsulas com diferentes tempos de reação de condensação, 29 horas e 128 horas, esta análise foi efetuada a amostras provenientes de ambos os grupos (Figura 17).

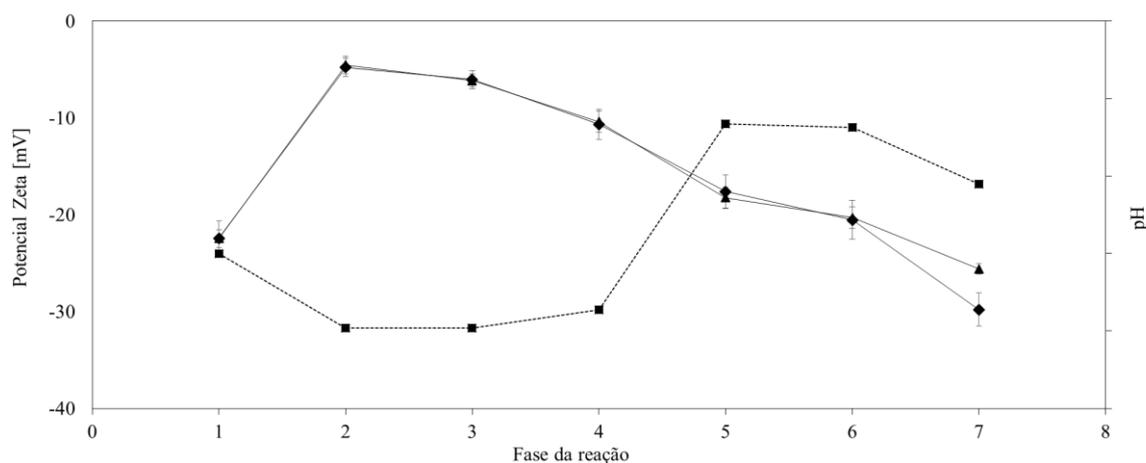


Figura 17 Evolução dos valores de potencial zeta e pH da mistura reacional ao longo das sucessivas fases do processo de formação de cápsulas. Foram usadas para esta análise amostras de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 29 horas e de 168 horas. (Legenda: \blacklozenge – Potencial zeta para reação de 29 horas; \blacktriangle – Potencial zeta para reação de 168 horas; \blacksquare – pH). Nota: por motivos de propriedade industrial, os valores de pH são omitidos.

Pela Figura 17 pode verificar-se que o potencial zeta não foi afetado pelo tempo de reação, já que a evolução registada foi praticamente igual para a reação de 29 (\blacklozenge) como para a reação de 168 horas (\blacktriangle), sendo que a maior discrepância de valores ocorreu para o ponto 7) Após diálise. O potencial zeta vai acompanhando as variações de pH, aumentando de $-22,44 \pm 0,03$ mV para $-4,65 \pm 0,17$ mV após hidrólise da emulsão (ponto 2). Essa variação é também indicativa de uma maior instabilidade da mistura aquando do início do procedimento sol-gel. No ponto 3 (adição do TEOS hidrolisado), em que o pH se mantém, o potencial zeta manteve-se sensivelmente igual. No ponto 4, que corresponde à adição do

sal orgânico e a um ligeiro aumento de pH, o potencial zeta sofreu uma diminuição considerável que pode ser associada a um aumento da estabilização do sistema causada pela adição do sal orgânico. Com o aumento do pH para valores ligeiramente básicos, cujo intuito é catalisar a reação de condensação, o potencial zeta continua a diminuir, sendo que após a diálise (ponto 7) os valores estabilizam entre os -25,6 mV e os -29,8 mV o que nos indica que no final da sua formulação as nossas cápsulas são estáveis ⁹¹, tanto para o caso das 29 horas de reação como para o das 128 horas de reação (o que não exclui a possibilidade de ter ocorrido alguma agregação/floculação nos passos anteriores).

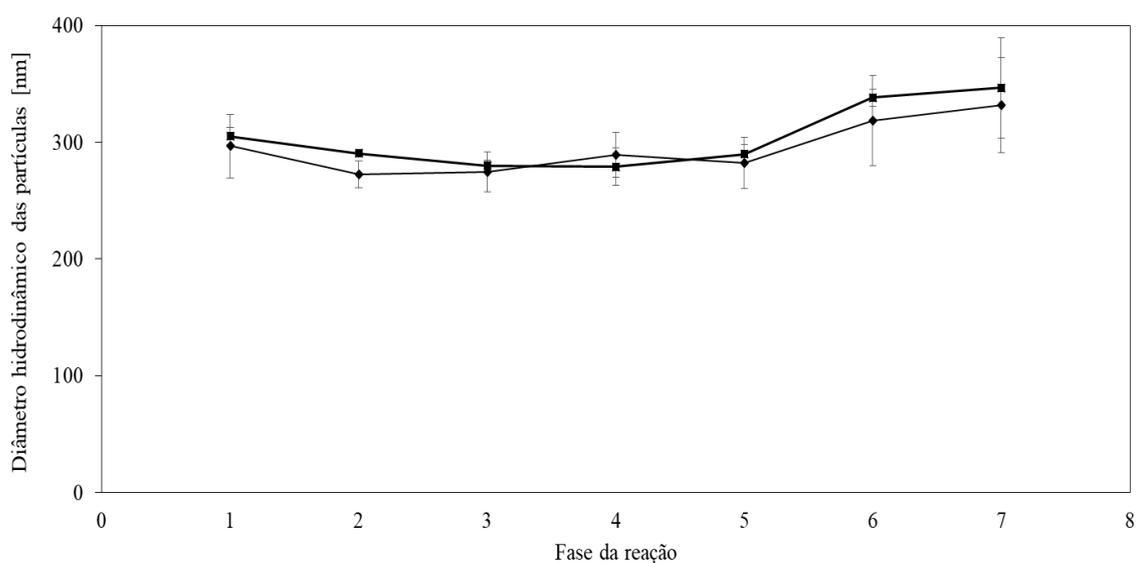


Figura 18 Evolução do diâmetro hidrodinâmico das partículas [nm] ao longo das progressivas fases da reação sol-gel. Foram usadas para esta análise amostras de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 29 horas e de 168 horas. (Legenda: ♦ – Evolução do dH das partículas ao longo da reação de 29 horas; ■ – Evolução do dH das partículas ao longo da reação de 168 horas).

Os dados recolhidos para o diâmetro das partículas (Figura 18), revelaram que após o início da hidrólise (ponto 2) o dH das partículas diminuiu ligeiramente e manteve-se até após o início da condensação (ponto 5), aumentando visivelmente após as 29/168 horas de reação de condensação definidas. Esta diminuição está provavelmente relacionada com a diminuição do pH e conseqüente aumento do potencial zeta da mistura, o que poderá ter causado uma aproximação das partículas, motivada por uma menor repulsão eletrostática entre elas.

Entre o final da reação (ponto 6) e o fim do procedimento de diálise (ponto 7) constatou-se que o dH das partículas continua a aumentar o que pode indicar que estas continuam a reagir até que toda a presença de TEOS seja eficientemente removida da mistura reacional, dotando-nos de uma suspensão de nanocápsulas (ou agregados de cápsulas) estável, mas polidispersa a nível de dH como se pode verificar pelo desvio padrão

associado a este ponto. Confirmou-se ainda que o prolongamento do tempo de reação de condensação das 29 horas (dH final de partículas: $331,7 \pm 40,8$ nm) para as 168 horas (dH final de partículas: $346,4 \pm 42,7$ nm) permitiu obter partículas de diâmetro ligeiramente superior, o que indica que o aumento do tempo de reação promove a formação de uma cápsula de sílica de espessura superior.

5.3.2 Caracterização, morfologia e rendimento da reação de formação de nanocápsulas de sílica porosa

O aspeto das partículas foi monitorizado através de diferentes técnicas. A análise das imagens recolhidas por microscopia ótica (MO) permitiu notar uma diferença considerável entre o aspeto geral das amostras antes e depois da diálise, o que nos permitiu concluir que o material excedente (sal orgânico e surfatantes e TEOS por reagir) foi eficazmente removido ao longo do período de tempo de diálise. É ainda notável que algumas partículas pré diálise (Figura 19a) apresentam uma orientação radial e tamanho superior. Estas partículas correspondem possivelmente ao sal orgânico e a surfatantes que não reagiram e ainda se encontram em suspensão, enquanto após a diálise essas partículas orientadas deixam de existir e o aspeto geral da amostra é mais homogêneo (Figura 19b).

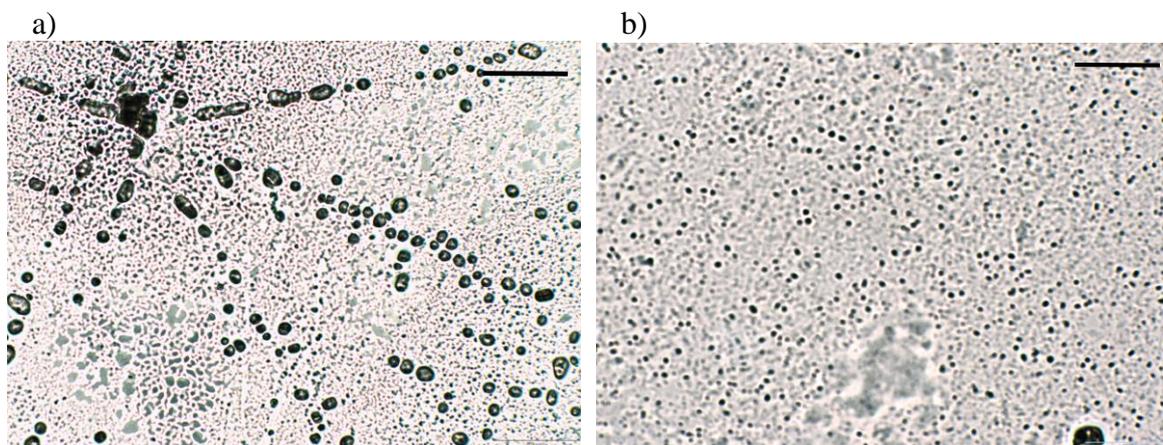


Figura 19 a) Imagem MO recolhida após 29 horas de reação de condensação de uma amostra seca ao ar (pré-diálise) A=50 μ m; b) Imagem MO recolhida após procedimento de diálise para amostra seca em N₂ e imersa em óleo (após diálise) A= 50 μ m. Foram usadas para esta análise amostras de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 29 horas.

Como as cápsulas se encontravam em suspensão e, com o intuito de quantificar massa total formada a cada reação, tentou-se secar as mesmas através de liofilização. Verificou-se que as nanocápsulas obtidas através de reação de 29 horas perdiam a sua estrutura, observando-se a extravasão do líquido iónico. Este facto impulsionou-nos a secar as cápsulas na estufa em placas de teflon (Figura 20 a). As nanocápsulas sujeitas a reação de 168 horas foram liofilizadas e, apesar do líquido iónico não ter extravasado visivelmente, o seu aspeto e consistência eram gelatinosos (Figura 20 b). Após secagem das nanocápsulas a sua massa final foi calculada e confrontada com a massa inicial de reagentes incorporados, estimando-se que o rendimento da reação de 29 horas tenha sido de $60,31 \pm 1,84 \%$ e o rendimento da reação de 128 horas de $63,42 \pm 2,20 \%$ o que representa um aumento de cerca de 3% de rendimento de massa para a reação de formação mais longa.

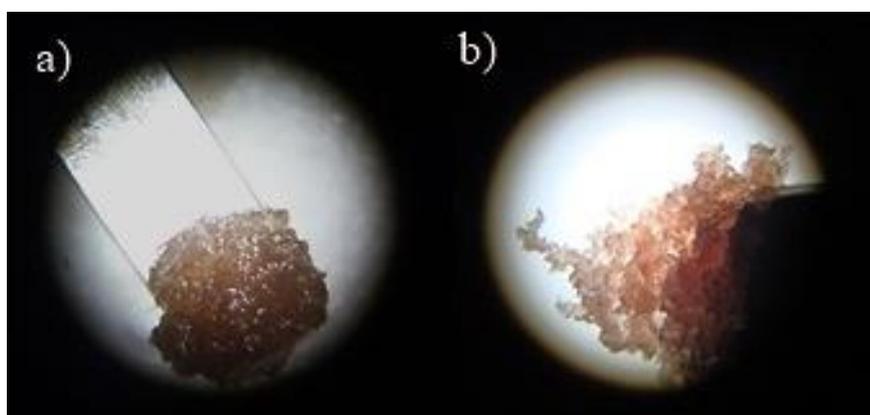
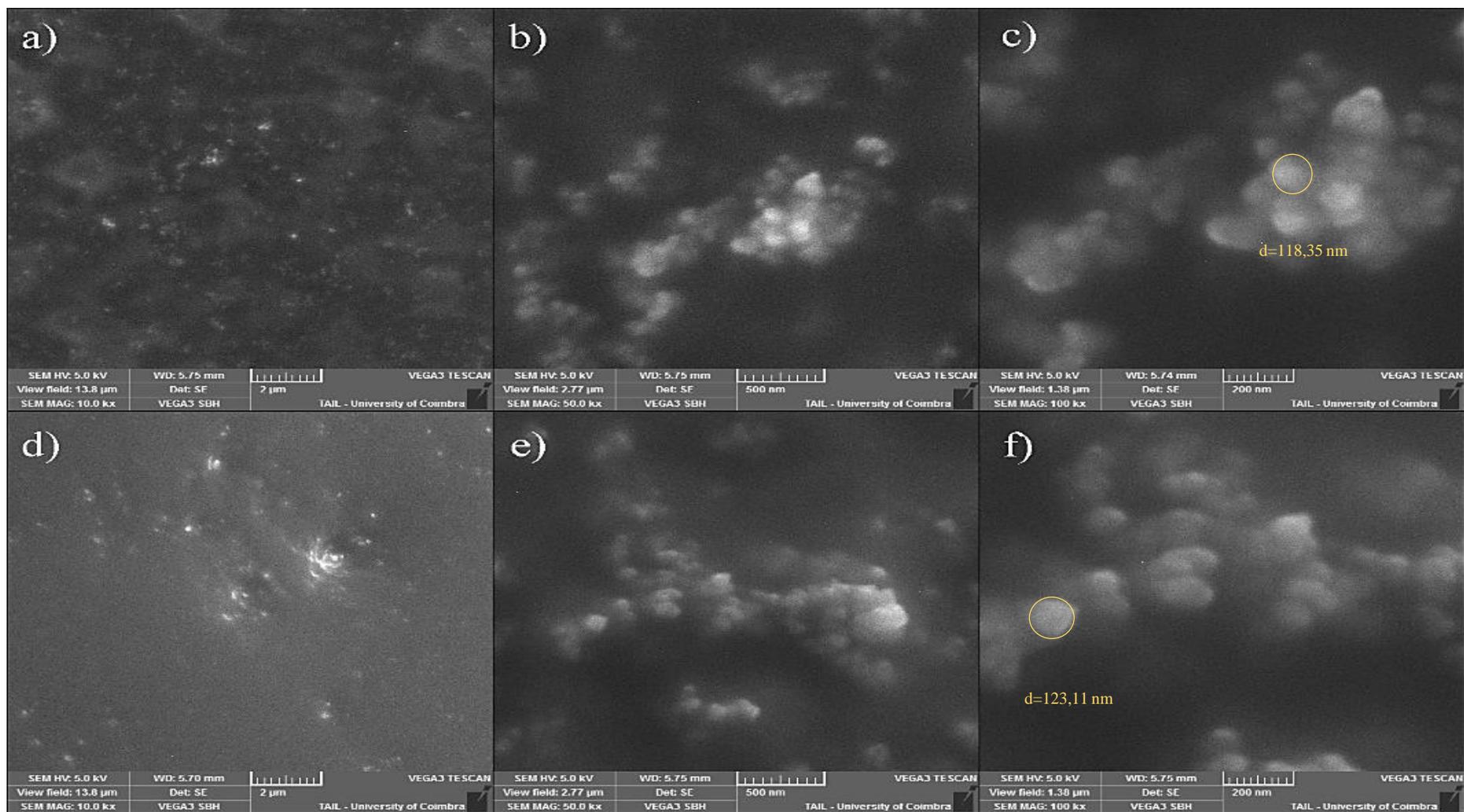


Figura 20 Imagens obtidas através de lupa. a) Nanocápsulas após secagem na estufa em placas de Teflon (amostra de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 29 horas). b) Nanocápsulas liofilizadas (amostra de cápsulas conjugadas com Pp IX de reação de 168 horas).

Como se concluiu que as nanocápsulas de reação de 168 horas eram morfologicamente e estruturalmente mais resistentes efetuou-se microscopia de SEM e TEM às mesmas.

Na Figura 21 encontram-se algumas imagens de microscopia de SEM efetuadas a amostras de cápsulas, onde se consegue distinguir as dimensões e morfologia do material obtido. As amostras foram diluídas na razão de 1:3 para evitar que ocorresse sobreposição de material e a microscopia fosse prejudicada. Alíquotas das amostras húmidas diluídas foram colocadas sobre os suportes metálicos para SEM e deixou-se a água evaporar à temperatura ambiente.



Pela Figura 21 conclui-se que o aspeto morfológico das cápsulas é semelhante quer elas tenham Pp IX integrada (alíneas a, b, c) ou não (alíneas d, e, f). As partículas visualizadas parecem ser formadas por aglomerados de cápsulas de menores dimensões (< 150 nm). Este resultado é contrastante com o obtido através de DLS onde foram registados diâmetros entre os 300 e os 350 nm. Isto leva a crer que as medições de DLS efetuadas dizem respeito a aglomerados de nanocápsulas de menores dimensões, como os visíveis na microscopia de SEM ou que a amostragem analisada em SEM não é representativa de toda a amostra.

Foi também efetuado SEM a uma amostra de cápsulas (de reação de 168 horas com Pp IX integrada) calcinada na mufla a 700 °C (Figura 22b).

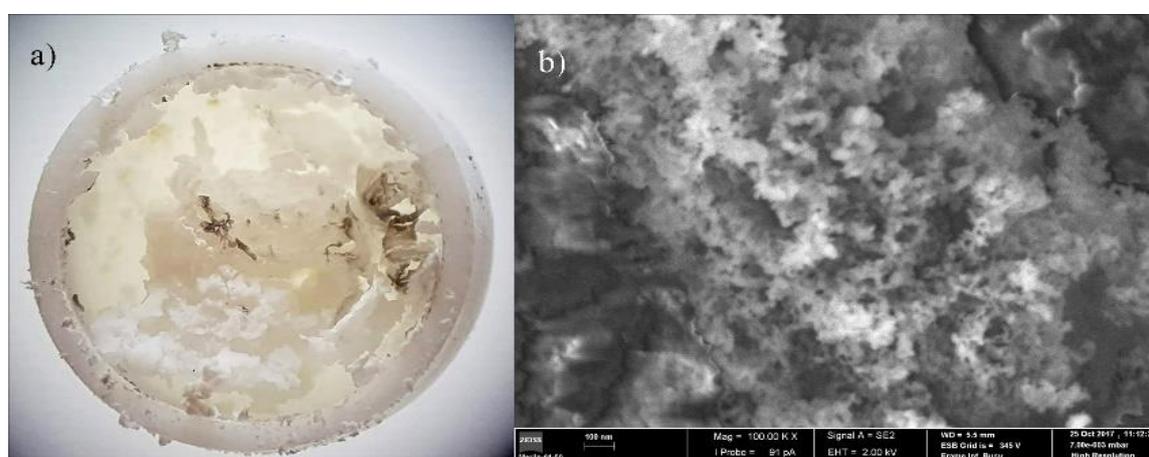


Figura 22 a) Amostra de cápsulas (de reação de 168 horas, com Pp IX) calcinada na mufla observada na lupa. b) microscopia de SEM de cápsulas calcinadas na mufla (escala: 200 nm).

Na Figura 22a encontra-se uma imagem adquirida através de lupa do material resultante da calcinação das cápsulas. O resultado é um material inorgânico muito leve e de aspeto alveolar correspondente à sílica das cápsulas. Esse material foi analisado através de microscopia de SEM, cuja imagem se encontra na Figura 22b. Não foi, no entanto possível identificar a estrutura das cápsulas que perfaziam o material, possivelmente devido a ocorrência de sinterização que terá provocado a perda das estruturas morfológicas.

Foram ainda observadas, através de TEM, amostras húmidas de cápsulas de reação de 168 horas, com Pp IX (Figura 23).

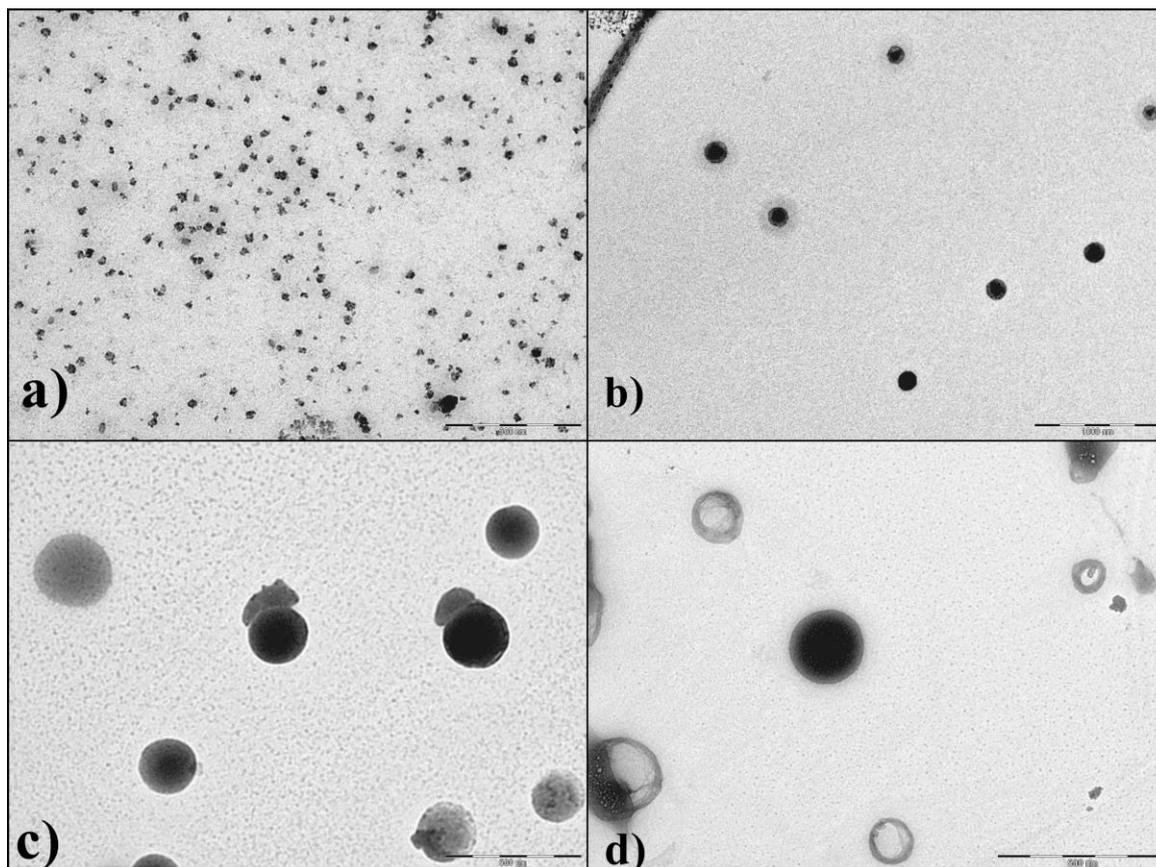


Figura 23 Microscopia de TEM para amostra húmida de cápsulas de 168 horas de reação com Pp IX. a) e b) escala de 1000 nm (segmentada de 200 em 200 nm); c) e d) escala de 500 nm (segmentada de 100 em 100 nm).

Pela Figura 23 é possível confirmar a natureza aparentemente esférica das partículas obtidas e verificar que o seu diâmetro ronda os 200 nm. A figura da alínea a) e a figura da alínea b), apesar de se encontrarem na mesma ampliação, têm aspeto díspar, o que pode indicar heterogeneidade da amostra. Na figura da alínea d) conseguem visualizar-se algumas partículas que aparentam estar segmentadas no plano, podendo distinguir-se uma zona periférica circular, correspondente à cápsula formada em redor da partícula.

A disparidade de diâmetros de nanocápsulas obtidos pelas diferentes técnicas de caracterização pode ser justificada pelo facto da amostragem utilizada para os testes nunca ser representativa da totalidade da amostra, pelo que se estima que o diâmetro das cápsulas produzidas varie entre os 100 e os 350 nm.

A presença de $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$ e Pp IX no interior das nanocápsulas foi confirmada a partir dos resultados obtidos através da análise termogravimétrica (TGA). Antes de mais, foi necessário analisar os perfis de TGA por forma a identificar a temperatura de degradação de cada um dos componentes envolvidos na formação das nc/Si-LI+Pp IX (Tabela 8). Os perfis obtidos para a percentagem de degradação em massa dos compostos puros presentes nas cápsulas e respetiva derivada (indicadora dos picos de degradação) podem ser consultados no Anexo E.

Tabela 8 Temperatura de degradação característica para os componentes usados na formulação das cápsulas

Composto usado	Temperatura de degradação 1 (°C)	Temperatura de degradação 2 (°C)
S1	-	420.8
S2	106.3	268.5
Solução de sal orgânico	145.1	304.2
LI	-	454.1
Pp IX	322.3	438

Para quantificar relativamente a presença de LI e de sílica, e confirmar que os restantes reagentes (S1, S2 e sal orgânico) tinham sido removidos através da diálise, as amostras secas em estufa (reação de 29 horas) e liofilizadas (reação de 168 horas) foram submetidas a TGA.

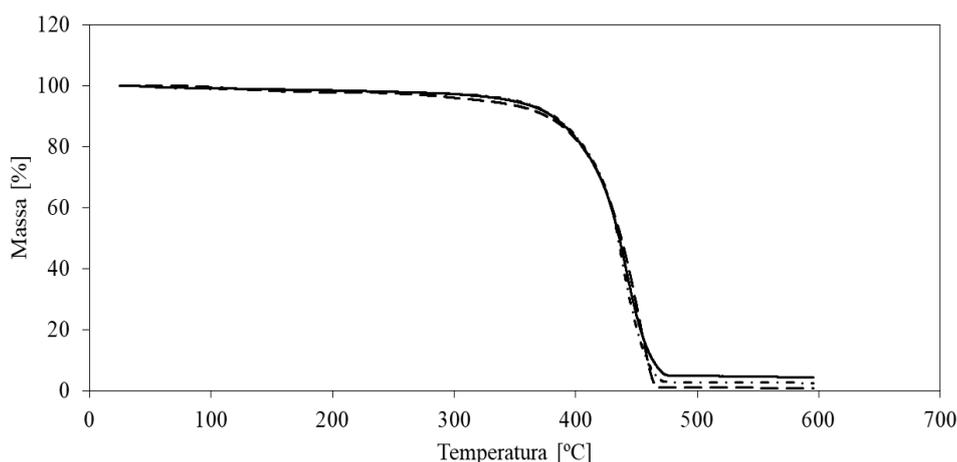


Figura 24 Perfis de TGA obtidos para 2 amostras de cápsulas LI-Pp IX e para uma amostra de LI puro. (Legenda: — Reação de 29 horas; - . Reação de 168 horas; -- LI).

Pela análise da Figura 24 concluímos que ocorre degradação de material apenas uma vez, sendo que essa degradação decorre entre os 354 e os 475 °C. Cruzando essa

informação com a da Tabela 8 e com o perfil de degradação do LI puro representada, podemos admitir que essa degradação é consistente com a perda de massa do LI com a Pp IX dissolvida (0,5 mg/mL). Verificou-se ainda que as cápsulas obtidas através de reação de 168 horas possuíam maior percentagem de material por degradar na zona entre os 500 e os 600 °C (correspondente à sílica).

Foram analisadas 6 amostras de cápsulas LI-Pp IX distintas (2 de 29 horas de reação e 4 de 168 horas de reação). Compilando toda a informação extraída das respetivas análises de TGA, foi possível estimar a percentagem de LI-Pp IX presente nas mesmas tendo-se obtido o valor de $(96,81 \pm 0,457)$ % para a reação de 29 horas e de $(95,24 \pm 0,754)$ % para a reação de 168 horas. Em todas as amostras foi possível identificar a fração de material por degradar no final da medição correspondente à sílica (material inorgânico) presente nas nanocápsulas. O valor estimado para sílica presente situou-se nos $(3,18 \pm 0,428)$ % para as cápsulas de 29 horas de reação e nos $(4,75 \pm 0,737)$ % para as cápsulas de 168 horas de reação (variação visível na Figura 24). A razão de LI para Si (LI:Si) no caso das 29 horas de reação situa-se no 30:1 e para o caso das 168 horas de reação é de 20:1 (aumento na quantidade de sílica formada). As percentagens identificadas como sendo de sílica ficaram aquém das nossas expectativas, já que em trabalhos anteriores a relação Sílica/ Material orgânico obtida foi superior ⁶⁶. A razão desta diferença pode estar simplesmente relacionada com as diferentes características físicas dos dois líquidos iónicos usados nestes trabalhos ($[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$ e $[OMIM][NTf_2]$). Pode ainda dever-se a uma necessidade de prolongar o período de reação a que as cápsulas estão sujeitas, aumentar a temperatura de reação e/ou aumentar a concentração de TEOS adicionado à reação.

No seguimento desta conclusão, e aliada à nossa necessidade de quantificar efetivamente a massa de líquido iónico presente nas nossas suspensões de cápsulas foram efetuadas novas medidas de TGA, mas desta vez diretamente às suspensões de cápsulas (sem remoção de água por secagem/liofilização).

Para isso, foram usadas alíquotas homogêneas de aproximadamente 60 µL de cada uma das receitas completas cápsulas em uso (apenas amostras obtidas através de reação de 168 horas), permitindo assim inferir a concentração de LI presente em cada uma delas. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 9, em que as amostras se encontram identificadas segundo uma nomenclatura do tipo $X_{i,j}$, em que X é o tipo de amostra (A corresponde a amostras de cápsulas de LI (sem Pp IX) e B corresponde a amostras de cápsulas LI+Pp IX), i é o identificador da amostra e j diz respeito a uma fração da amostra.

Tabela 9 Dados obtidos através de TGA para as receitas de cápsulas completas.

	Massa de orgânicos (LI+S1+S2) (g)	Massa de inorgânicos (Si) (g)	LI presente relativamente ao adicionado (m/m %)	Si formada relativamente à expectada (m/m %)	Fração de LI (m/m %)	Fração de Si (m/m %)	Rendimento de sólidos reação (m/m %)	Concentração LI (mg/mL)
A1_1	0,36	0,013	68,28	41,08	96,29	3,71	66,65	12,12
A1_2	(± 0,001)	(± 0,001)	(± 0,270)	(± 1,625)	(± 0,458)	(± 0,158)	(± 0,156)	(± 0,047)
A2_1								
A2_2	0,37	0,014	69,51	45,16	96,02	3,98	68,05	12,34
A2_3	(± 0,025)	(± 0,004)	(± 4,686)	(± 5,850)	(± 1,308)	(± 0,470)	(± 5,486)	(± 0,832)
A2_4								
A3_1	0,43	0,014	79,11	39,84	95,97	4,03	79,57	14,58
A3_2	(± 0,016)	(± 0,002)	(± 3,427)	(± 4,807)	(± 1,843)	(± 0,541)	(± 2,932)	(± 0,608)
A4_1	0,31	0,021	61,15	55,98	94,42	5,58	58,67	12,70
A4_2	(± 0,044)	(± 0,003)	(± 4,439)	(± 2,108)	(± 0,341)	(± 0,341)	(± 6,241)	(± 0,718)
B1_1	0,38	0,017	71,52	48,88	95,79	4,20	70,16	11,81
B1_2	(± 0,022)	(± 0,002)	(± 4,048)	(± 4,902)	(± 0,631)	(± 0,631)	(± 3,509)	(± 2,153)
B2_1	0,35	0,021	70,25	76,39	93,89	6,10	67,23	10,18
B2_2	(± 0,064)	(± 0,004)	(± 9,757)	(± 8,355)	(± 0,205)	(± 0,205)	(± 9,403)	(± 1,496)

Esta metodologia, para além de nos ter permitido extrair as concentrações de líquido iónico presente nas diferentes suspensões de cápsulas foi útil para nos elucidar melhor relativamente às percentagens de sílica e líquido iónico efetivamente incorporadas no material final, relativamente à quantidade total de cada um dos compostos, envolvida no início da reação. Os valores de sílica formada (relativamente à expectada) variaram entre 39,84% e 76,39 % e a percentagem de LI integrado variou entre os 68,28% e 79,57 %. Foram também calculadas as razões (LI:Si) para cada uma das amostras, tendo-se para estes casos obtido razões entre 15:1 e 26:1, verificando-se que existe uma variabilidade assinalável entre amostras, que pode advir da amostragem. Esta análise relativa evidencia que o componente presente em maior quantidade nas partículas é o LI. Apesar da relação inicial de LI/Precursor de sílica (TEOS) ser de 1,23 (mol/mol) o facto da massa molar do LI (764,01 g/mol) ser muito superior à da sílica (60,08 g/mol) explica a discrepância relativa (LI:Si) presente na formulação final.

Adicionalmente, foi calculado o rendimento de sólidos totais da reação (rendimento de massa) registando-se valores percentuais entre os 58,67% e os 79,57%. À exceção do

rendimento obtido para a amostra A4, os valores de rendimento registados foram superiores aos obtidos anteriormente através da secagem em estufa e liofilização. Conclui-se assim que este método permite obter resultados mais completos e fidedignos no que diz respeito à quantificação de material das cápsulas visto que, ao utilizar uma suspensão de cápsulas (ao invés de cápsulas previamente secas) garantimos que a sua morfologia permanece intacta e que o líquido iónico não extravasou das cápsulas. Após quantificar a quantidade de líquido iónico em cada uma das amostras estas foram usadas nos ensaios de caracterização das cápsulas. A amostra A2 foi usada no ensaio 1 da difusão de O₂, a amostra A3 foi usada no ensaio 2 da difusão de O₂ (alínea 5.3.2) e as amostras A3, A4, B1 e B2 foram usadas nos ensaios de quantificação de ROS (alínea 5.3.3).

Adicionalmente, análises de FTIR (Figura 25) permitiram elucidar-nos relativamente ao material efetivamente presente na superfície das cápsulas nas diferentes condições testadas.

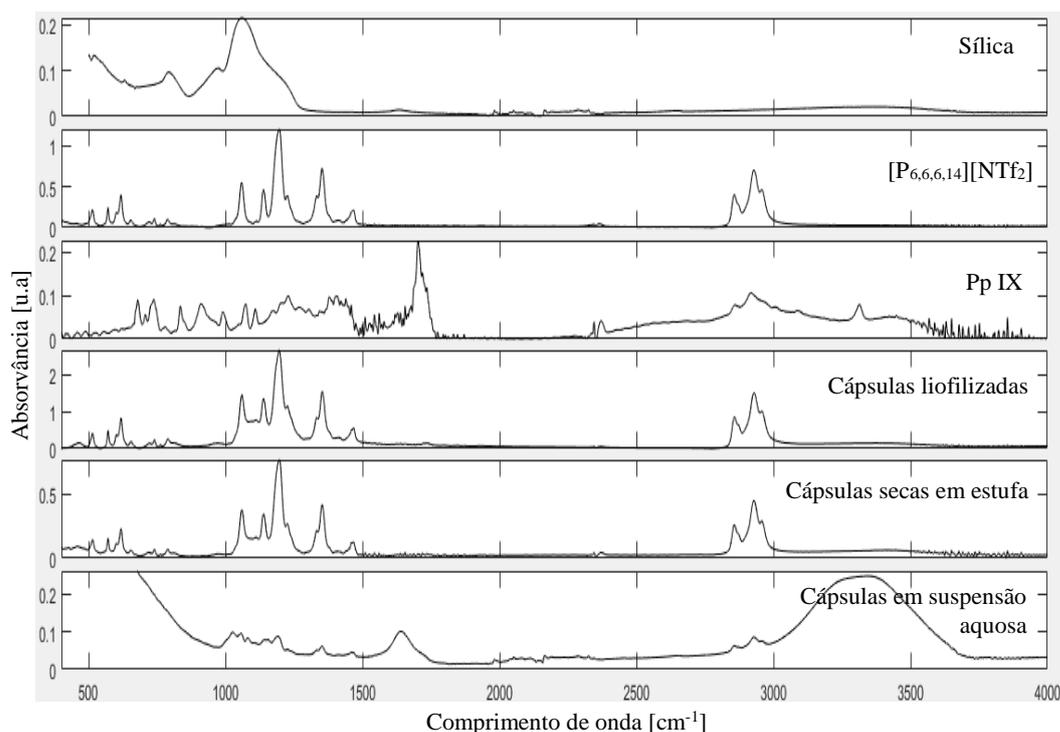


Figura 25 Espectro obtidos através de FTIR do resíduo de sílica, do [P_{6,6,6,14}][NTf₂], da Pp IX, de amostra de cápsulas liofilizadas, de amostra de cápsulas secas em estufa e de amostra de cápsulas em suspensão.

Foram realizadas análises FTIR ao LI e à Pp IX puros e ao resíduo de sílica recolhido no final das sucessivas análises de TGA, confirmando-se indubitavelmente que esse material inorgânico era sílica. Na análise FTIR da sílica observa-se um pico aos 800 cm⁻¹ e a banda de maior absorvância encontra-se registada entre os 1000 e os 1200 cm⁻¹, o

que corresponde à vibração do grupo ($\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \equiv$), característico da obtenção de sílica a partir do precursor TEOS pelo método sol-gel ¹⁰³. A amostra do $[\text{P}_{6,6,6,14}][\text{NTf}_2]$ exibiu picos característicos intensos entre os 1000 e os 1500 cm^{-1} e na zona correspondente às ligações (C–H) situada entre os 2850-3000 cm^{-1} . Por sua vez a amostra de Pp IX revelou as bandas de estiramento simétricas e assimétricas características dos anéis pirrólicos ($\nu(\text{C-H})$, $\nu(\text{C=C})$, e $\nu(\text{C=N})$) situadas entre os 1200–1500 cm^{-1} . Para além disso, exibiu um pronunciado pico de estiramento aos 1693 cm^{-1} , característico da ligação $\nu(\text{C=O})$ ¹⁰⁴. Por comparação é facilmente perceptível que à superfície das amostras de cápsulas liofilizadas e secas em estufa encontra-se maioritariamente LI o que corrobora a teoria de que a extração da água das cápsulas (quer por secagem quer por liofilização) provoca a saída do LI do interior das partículas para a sua superfície. Isto pode advir do facto da razão LI/TEOS utilizada na reação de formação das cápsulas (1,23 mol/mol) ser demasiado elevada, podendo ser necessário aumentar a quantidade de TEOS adicionado à reação por forma a garantir o completo e eficaz revestimento das partículas. Seria ainda necessário averiguar se o aumento na concentração de TEOS inicial não afetaria negativamente a utilização das cápsulas para PDT.

No caso do perfil obtido para a amostra de cápsulas em suspensão aquosa visualiza-se um pico aos 1600 cm^{-1} (vibração H–O–H) e uma banda entre os 3000 e os 3700 cm^{-1} (vibração O–H). Estes picos são bastante pronunciados e dizem respeito à água presente na suspensão. Entre os 1000 e os 1200 cm^{-1} está presente uma banda que pode indicar a presença de sílica à superfície do material (vibração do grupo Si-O-Si). É ainda possível identificar picos na zona correspondente às ligações (C–H) (entre os 2850-3000 cm^{-1}) que podem indicar a presença de Pp IX. É assim perceptível que quando em suspensão as partículas apresentam uma conformação superficial distinta daquela que se observa nas cápsulas sujeitas a secagem e liofilização. Como o LI é muito hidrofóbico verifica-se que este permanece no interior das cápsulas quando estas se encontram suspensas em água.

5.3.2 Quantificação da absorção/libertação de oxigénio pelas nanocápsulas de sílica porosa

Neste ponto foi estudada a evolução da presença de oxigénio no meio quando nele eram adicionadas quantidades conhecidas de emulsão de LI/[S1:S2] e de nc/Si-LI+Pp IX. O ensaio de absorção (saturação prévia da água com O_2 e adição de amostra desgaseificada) permitiu concluir que tanto a emulsão como as nanocápsulas previamente desgaseificadas eram capazes de consumir oxigénio do meio quando este estava saturado em O_2 , graças ao

gradiente de difusão gasoso provocado no sistema em estudo (Figura 26). Deu-se início ao ensaio desgaseificando a água e gaseificando-a em seguida para garantir que, aquando da adição da amostra, o meio se encontrava saturado em O_2 (8,3 ppm). Na Figura 26 confirma-se a desgaseificação prévia (para valores <1 ppm) seguida de gaseificação ($\sim 8,3$ ppm). Estes valores são coerentes com os obtidos para desgaseificação e gaseificação de amostras aquosas arejadas. Desta forma confirma-se que a válvula de alívio de pressão adicionada ao sistema proporcionou arejamento suficiente ao longo da fase de oxigenação^{105,106}. Apesar de ser observável alguma sobressaturação inicial ao longo dos 5 minutos iniciais da fase de gaseificação os valores estabilizam entre os 8 e os 8,3 ppm nos minutos seguintes.

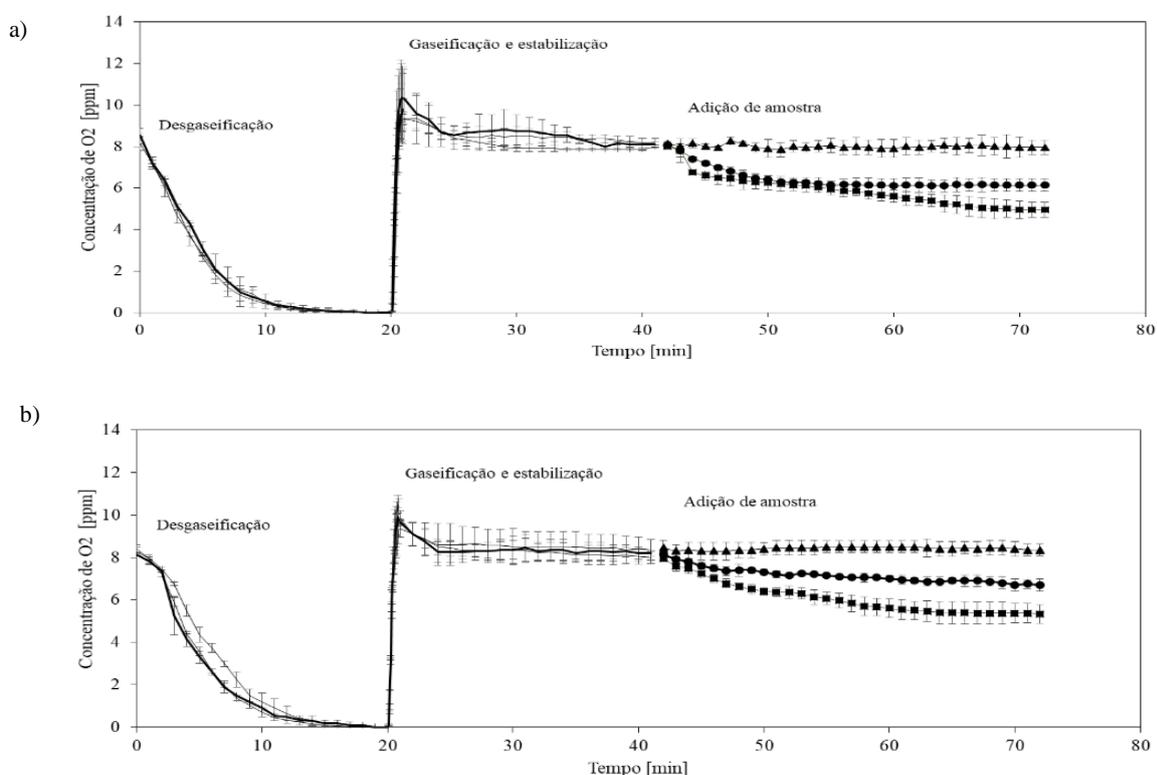


Figura 26 Ensaio de absorção de O_2 : a) Com saturação prévia da água e adição de 5 mL de amostra (1:8 (v/v)); b) Com saturação prévia da água e adição de 10 mL de amostra (1:4 (v/v)). (Legenda: ▲ – Adição de água desgaseificada; ● – Adição de suspensão de nanocápsulas desgaseificada; ■ – Adição de emulsão de LI desgaseificada). Foram usadas cápsulas de reação de 168 horas sem Pp IX.

Foram estudadas duas concentrações diferentes de amostra adicionada, tendo as combinações mais concentradas absorvido mais eficazmente (Figura 26b). Foi também estudado o efeito da adição de amostra de água desgaseificada, que terá funcionado como referência no meio (H_2O), tendo-se verificado que para ambas as concentrações a adição de água não provocou variação significativa da concentração de O_2 na amostra em estudo.

Contrariamente, quando se adicionou o volume pré-determinado de emulsão ou de suspensão de nanocápsulas desgaseificadas observou-se uma diminuição na concentração de O_2 disponível no meio, verificada para ambas as concentrações em estudo (1:8 (v/v) e 1:4 (v/v)), mas mais acentuada para o caso de concentração mais elevada 1:4 (v/v). Essa diminuição verificou-se ainda superior quando a amostra adicionada era a emulsão, o que se deve ao facto desta conter o líquido iónico disperso diretamente na emulsão, sem qualquer barreira presente entre o LI e o meio em estudo (apenas a interface água/LI), ao passo que na suspensão de nanocápsulas o LI, apesar de estar presente numa concentração ligeiramente superior (previamente quantificada através dos dados recolhidos pelo TGA e apresentada na Tabela 9), se encontra encapsulado, provocando uma maior resistência à difusão do oxigénio do interior da nanocápsula para o meio em estudo.

Para comprovar que o gradiente de difusão também se verificava no sentido inverso, foi realizado o ensaio de libertação de O_2 . Neste ensaio, estudou-se apenas uma concentração (0,25 (V/V)).

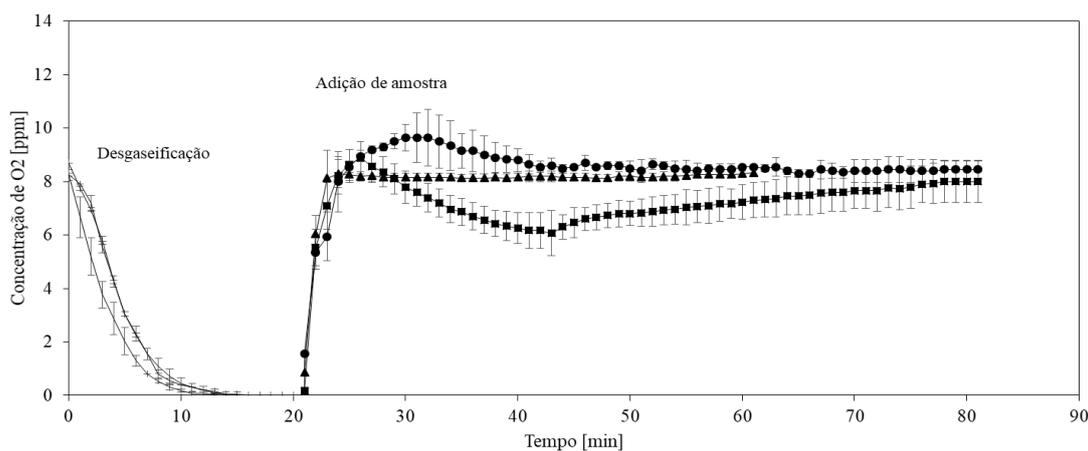


Figura 27 Ensaio de libertação de O_2 com saturação prévia da água e adição de 10 mL de amostra (1:4 (v/v)). (Legenda: ▲ – Adição de água gaseificada; ● – Adição de suspensão de nanocápsulas gaseificadas; ■ – Adição de emulsão de LI gaseificada). Foram usadas nanocápsulas de reação de 168 horas sem Pp IX.

Para este ensaio foi novamente realizada uma referência adicionando-se 10 mL de água gaseificada ao meio com água desgaseificada. Neste caso os valores de concentração de O_2 subiram rapidamente para o valor de saturação de 8,3, mantendo-se constantes ao longo do tempo, como evidenciado na Figura 27. Por sua vez, a adição de 10 mL suspensão de nanocápsulas gaseificadas provocou um aumento na concentração de O_2 superior ao registado quando se adicionou apenas água, entre os 20 e os 35 minutos. Isto verifica-se atendendo a que não só há uma rápida difusão de oxigénio proveniente da água da suspensão, como também há difusão simultânea de oxigénio proveniente das nanocápsulas

de LI. Após os 20 minutos iniciais do ensaio registou-se uma tendência para estabilização dos valores de concentração de oxigénio no valor de saturação de 8,3.

Por sua vez, a adição de 10 mL de emulsão de LI provocou um comportamento distinto, caracterizado por um aumento rápido de presença de O₂ no meio durante os primeiros 5 minutos, contrariado de seguida por uma diminuição que se prolongou pelos 20 minutos seguintes (zona de transição). Esta diminuição pode ter sido causada pela difusão de oxigénio predominante se estar a realizar no sentido do consumo do O₂ pelo líquido iónico, provocado pela diluição da emulsão. Após os 25 minutos de estudo iniciais, a concentração de O₂ registou uma tendência de estabilização para valores próximos do valor de saturação de O₂ em água a 25 °C.

Este ensaio comprovou que a difusão de oxigénio se pode dar no sentido nanocápsulas/emulsão gasificada(s) → meio aquoso desgaseificado, verificando-se uma estabilização dos valores de concentração de O₂ próximos do valor teórico de saturação de oxigénio em água a 25°C.

O cálculo dos K_{La} (coeficiente de difusão de oxigénio) associados a estas medições permitiu quantificar comparativamente a eficiência de difusão de oxigénio para os diferentes casos estudados (Tabela 10). O K_{La1}, que apresenta valores de maior módulo, diz respeito à fase mais crítica da difusão de oxigénio, caracterizada por uma rápida variação motivada pelo gradiente de pressão de oxigénio que se estabelece entre a amostra adicionada e o meio aquoso inicial. O K_{La2} corresponde à fase de transição entre a fase inicial e a fase final de estabilização, por sua vez caracterizada pelo K_{La3}, que tende a apresentar valores próximos de zero. No Anexo E encontra-se o cálculo dos K_{La}'s para dois casos experimentais específicos.

Tabela 10 Quantificação comparativa da eficiência de difusão de oxigénio para os diferentes casos estudados, através dos K_{La}.

	Amostra testada	V de água inicial [mL]	V amostra adicionado [mL]	LI [mg/mL]	K _{La_1} [min ⁻¹]	K _{La_2} [min ⁻¹]	K _{La_3} [min ⁻¹]
	Água	35	5	0	0,04	–	–
	Água	30	10	0	0,02	–	–
Ensaio de absorção de O ₂	Emulsão	35	5	1,39	-0,32	-0,04	-0,003
	Emulsão	30	10	2,77	-1,10	-0,03	-0,064
	Cápsulas	35	5	1,54	-0,34	-0,03	-0,017
	Cápsulas	30	10	3,09	-0,59	-0,08	-0,002

Continuação da Tabela 10

Ensaio de libertação de O₂	Água	30	10	0	1,90	-0,09	0,006
	Emulsão	30	10	2,77	1,52	-0,13	0,046
	Cápsulas	30	10	3,61	0,53	-0,23	0,006

No ensaio de absorção os K_{La} 's tomam valores negativos, em consequência da difusão de oxigénio se dar no sentido do seu consumo do meio em estudo. Inversamente, no ensaio de libertação o K_{La1} toma valores positivos, visto que a difusão do oxigénio se dá no sentido do seu aumento no meio em estudo. Por sua vez, o K_{La2} toma valores negativos já que para este ensaio a zona de transição é caracterizada por uma diminuição na presença de oxigénio que é depois contrariada, assistindo-se a um aumento que tende para a concentração de saturação do O₂ no meio (~8,3 ppm). Na Figura 28 encontra-se a representação esquemática dos valores obtidos para o K_{La1} (coeficiente de variação mais crítico e de módulo mais significativo) para efeitos comparativos.

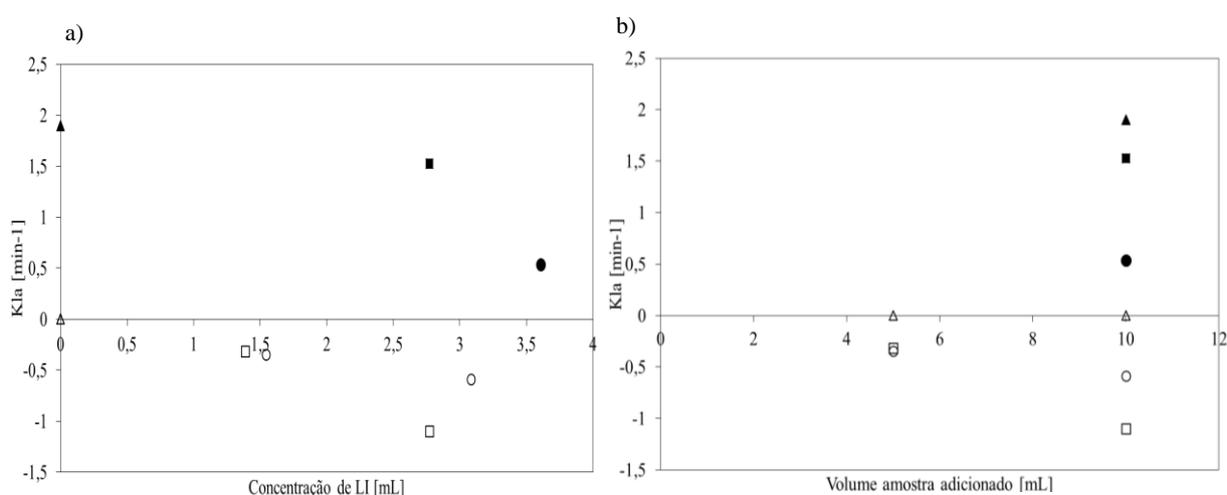


Figura 28 Representação comparativa dos valores de K_{La1} obtidos para os diversos ensaios. a) K_{La1} em função da concentração de LI no ensaio; b) K_{La1} em função do volume de amostra adicionado; (Legenda: Δ - Adição de água degaseificada; \circ - Adição de suspensão de nanocápsulas degaseificada; \square - Adição de emulsão de LI degaseificada; \blacktriangle - Adição de água gaseificada; \bullet - Adição de suspensão de nanocápsulas gaseificada; \blacksquare - Adição de emulsão de LI gaseificada).

No ensaio de adição de amostras degaseificadas (ícones vazios) quando se adicionou apenas 5 mL de amostra a constante difusiva apresentou valores muito próximos, tanto para o caso da emulsão (\square) como das nanocápsulas (\circ). Quando se aumentou o volume de amostra a teste, a constante de difusão aumentou para ambos os casos, tendo a emulsão sido aproximadamente duas vezes mais eficaz a consumir O₂ do meio. No ensaio inverso, de adição de amostras gaseificadas ao meio degaseificado (ícones preenchidos), a amostra de água foi a que mais rapidamente difundiu oxigénio para o meio. Já entre as

nanocápsulas e a emulsão verificou-se que nos momentos iniciais a emulsão difundia o oxigénio para o meio cerca de três vezes mais rápido. Isto pode dever-se ao facto das cápsulas possuírem o revestimento poroso de sílica e este ser responsável por dificultar a difusão de oxigénio.

É importante salientar que este método requer material muito preciso e para maior controlo das condições experimentais deviam ser adicionados à montagem experimental caudalímetros e medidores de pressão. A precisão do método está ainda intimamente dependente do tempo de resposta da sonda de oxigénio dissolvido ¹⁰⁷.

5.3.2 Quantificação da atividade oxidante das nanocápsulas de sílica porosa

Pelo esquematizado na Tabela 7 da secção de materiais e métodos, foram inicialmente realizados estudos para determinar a atividade antioxidante da Pp IX dissolvida em etanol desgaseificado, quando excitada a 532 nm e 406 nm por 5 minutos. Foi adicionado DPPH à mistura e foram efetuadas medições no espetro UV-VIS de 10 em 10 minutos ao longo de 60 minutos. Constatou-se que não houve variações consideráveis no pico de absorção do DPPH nem da Pp IX para este caso, confirmando-se a necessidade de existência de O₂ no meio para despoletar a atividade antioxidante da Pp IX (Anexo E 1 e 2).

Face a estes resultados, realizou-se novamente a análise para 5 minutos de irradiação, mas desta vez a amostra não foi desgaseificada. A variação nos perfis de absorção do DPPH para este caso foi evidente (Figura F 3 e 4), tendo o laser de 532 nm sido mais eficiente na produção de ROS, causando o maior decréscimo de absorção aos 517 nm. Antes de se proceder à fase seguinte realizaram-se ainda testes usando o laser de 532 nm irradiando durante 5, 10 e 20 minutos e ainda um teste sem irradiação prévia para comparação (Figura F 5, 6, 7 e 8). Estes testes não revelaram variação significativa entre eles, tendo-se selecionado os 10 minutos como intervalo de tempo de irradiação para os futuros ensaios. Inversamente ao que ocorre com o pico de absorção do DPPH, em todos os estudos descritos anteriormente foi possível distinguir um aumento gradual no pico de absorção da Pp IX aos 402 nm ao longo dos 60 minutos de análise. Este resultado, para além de comprovar que a Pp IX não degradou na presença de ROS permite concluir que esta continua a ser excitável ao longo de sucessivos momentos de irradiação com luz visível.

Após a seleção do laser de 532 nm e do intervalo de tempo de irradiação de 10 minutos foram realizados testes cinéticos, exclusivamente para a absorção aos 517 nm, com o objetivo de decidir se a adição do DPPH deveria ser feita antes ou depois da irradiação com o laser de 532 nm. Verificou-se que o perfil de absorção era mais linear e o estudo era mais eficaz quando o DPPH era adicionado antes da irradiação tendo sido essa a ordem experimental utilizada nos testes com as suspensões de cápsulas.

Após estes testes iniciais, passou-se para os testes com as suspensões de nanocápsulas, especificamente para o comprimento de onda de absorção do DPPH (517 nm). Decidiu-se alargar o tempo de ensaio para 820 minutos, para assim verificar se ao fim desse intervalo de tempo a Pp IX ainda estava em atividade.

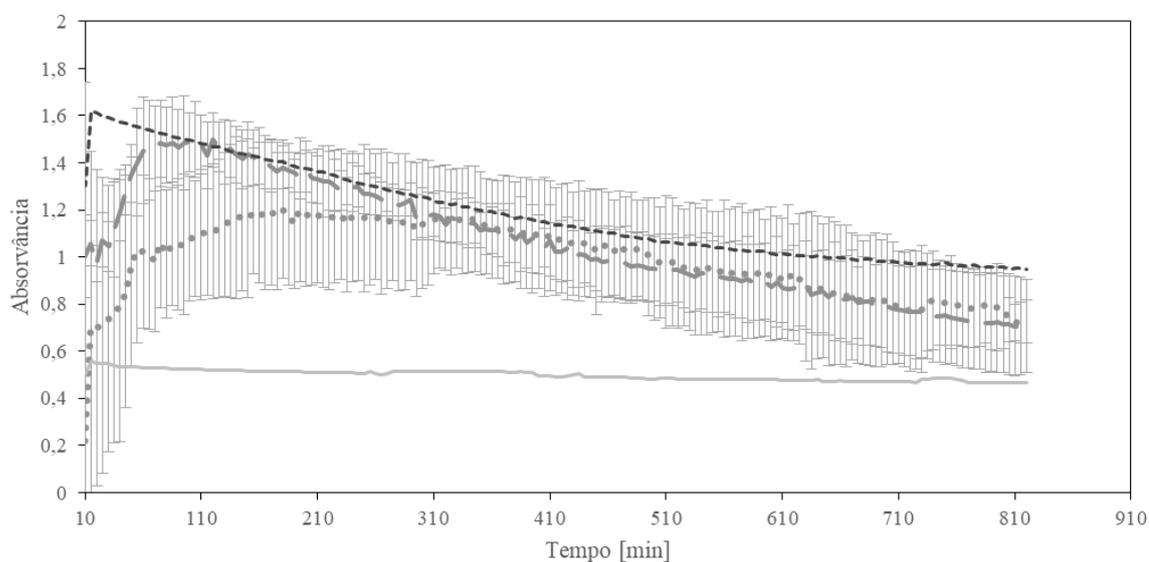


Figura 29 Representação dos dados obtidos através do espectro UV-VIS e devidamente tratados para o ensaio com DPPH. (Legenda: (--) Pp IX em etanol; (- -) Suspensão de nanocápsulas sem O₂ adicional; (•) Suspensão de nanocápsulas saturada com O₂; (—) Suspensão de partículas de sílica.

Na Figura 29 estão exibidos os resultados obtidos relativamente à produção de ROS pelas nanocápsulas em suspensão aquosa. Os 10 primeiros minutos não se encontram representados no gráfico pois dizem respeito ao tempo de irradiação com o laser. Da análise do gráfico extraem-se os seguintes valores (Tabela 11).

Tabela 11 Variação dos valores de absorvância registados para os testes efetuados com DPPH.

	Valor máximo de absorvância (Abs)	Valor final de absorvância (Abs)	Diferença percentual (%)
Pp IX encapsulada sem O ₂ adicional	1,49 ± 0,161	0,71 ± 0,206	52,70
Pp IX encapsulada com O ₂ adicional	1,20 ± 0,299	0,73 ± 0,09	39,46
Pp IX livre (dissolvida em etanol)	1,62	0,95	41,54
Sílica MCM em suspensão	0,55	0,46	15,22

Como o LI das nanocápsulas também apresenta alguma absorção no comprimento de onda de 517 nm, para obter a absorção efetivamente causada pela reação do DPPH com o singlete de oxigénio, produzido pela excitação da Pp IX (atividade oxidante da Pp IX), os gráficos de absorção respeitantes às suspensões de nanocápsulas de LI (nc/Si-LI) foram subtraídos aos gráficos de absorção das nanocápsulas de LI-Pp IX (nc/Si-LI+Pp IX) através do software do espectrofotómetro UV-VIS.

Para efeitos comparativos, mediu-se o espectro de absorção após excitação de uma amostra de Pp IX pura, diluída em etanol na concentração tipicamente encontrada nas nanocápsulas em estudo (0,5 mg/mL). Verificou-se que o material encapsulado (nc/Si-LI+Pp IX com e sem O₂ adicional) provoca uma atividade oxidante mais intensa do que a Pp IX em estado livre, tendo-se assistido a uma maior diminuição da absorvância ao longo dos 820 nm para os casos das experiências com Pp IX encapsulada (valores finais de absorção muito próximos e inferiores ao da Pp IX em estado livre), o que pode estar relacionado com a presença aumentada de O₂ nas nc/Si-LI+Pp IX (graças à capacidade do LI de reter oxigénio molecular). Comparando o desempenho das nanocápsulas com e sem O₂ adicional podemos ainda concluir que durante os 300 minutos iniciais de reação as nanocápsulas com O₂ adicional registaram uma absorvância inferior, o que revela uma atividade oxidante mais pronunciada (durante os primeiros 300 minutos). Após os 300 minutos a atividade oxidante permaneceu bastante semelhante para ambas as amostras de nanocápsulas em estudo (com e sem O₂ adicional). Apesar de tudo, era esperado que as nanocápsulas com O₂ adicional tivessem apresentado uma variação percentual maior do que as nanocápsulas sem O₂ adicional, o que não se verificou. Isto pode ter sucedido porque os valores registados não representam a variação durante a fase inicial de irradiação com o laser (os primeiros 10 minutos). Assim, durante esta fase é possível que o DPPH esteja a reagir com os ROS formados, causando uma diminuição na sua disponibilidade para reação, mas os valores de absorvância só estão a ser monitorizados a partir dos 10 minutos.

Adicionalmente, foi ainda medido o espectro de absorção de uma amostra de sílica MCM (partículas de sílica mesoporosa $c=0,5$ mg/mL) que permitiu concluir que a sílica praticamente não reage com o DPPH, já que o seu espectro registou poucas alterações ao longo do decorrer da experiência (diferença percentual de apenas 15,22 % ao longo dos 820 minutos).

Os dados recolhidos para esta experiência apresentam desvios padrão associados de módulo bastante elevado, o que nos leva a concluir que o seu procedimento deve ainda ser otimizado para que os resultados sejam mais conclusivos. O facto das nanocápsulas se encontrarem em suspensão durante as medições no UV-VIS é um fator limitante deste método, já que é possível que o feixe emitido pelo aparelho esteja a interagir com partículas em movimento na amostra, resultando assim em medições incorretas ao longo do ensaio. Para além disso é possível que o DPPH esteja a adsorver na superfície de sílica das nanocápsulas, não reagindo devidamente com os ROS presentes na amostra.

Foi ainda realizado um ensaio recorrendo a um outro composto muito usado na literatura, o DPBF. Neste caso, verificou-se que as nanocápsulas com Pp IX (nc/Si-LI+Pp IX) provocavam uma tendência superior de decréscimo na absorvância do DPBF, motivada pela presença de radicais provocados pela irradiação da Pp IX a 532 nm (Figura 30). No entanto, uma vez que foram usadas nanocápsulas em suspensão, as limitações apontadas no ensaio anterior continuam a verificar-se para este teste, havendo necessidade de se estabelecer um protocolo em que a amostra a estudo não apresente partículas em suspensão.

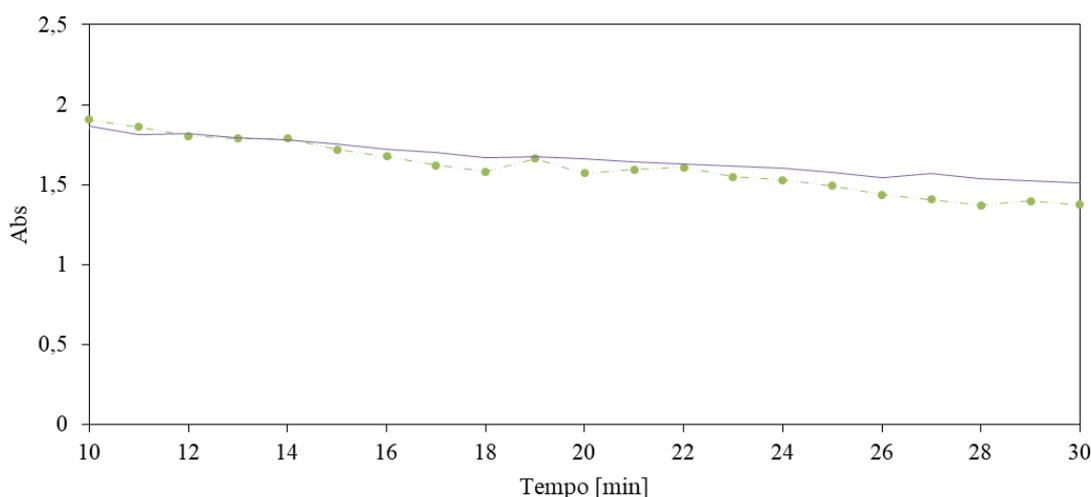


Figura 30 Representação dos dados obtidos através do espectro UV-VIS para o ensaio com DPBF. (Legenda: (—) cápsulas de reação de 168 horas de LI (concentração: $11,81 \pm 2,153$ mg/mL); (•-) cápsulas de reação de 168 horas de LI+Pp IX (concentração: $10,18 \pm 1,496$ mg/mL)

Uma alternativa seria irradiar uma amostra de suspensão de cápsulas e posteriormente centrifugar a amostra, utilizando para o ensaio espectrofotométrico apenas o

sobrenadante resultante da centrifugação, prevenindo assim as incertezas de medida causadas pela presença de partículas em suspensão na amostra e a presença de sílica que poderá adsorver o composto radical utilizado.

Conclusão

Este trabalho tinha como objetivo a síntese e caracterização de uma nova formulação de nanocápsulas para aplicação em terapia fotodinâmica. Entre os principais constituintes das nc/Si-LI+Pp IX estão a Pp IX dissolvida no líquido iónico que foi por sua vez encapsulado nas nanocápsulas de sílica porosa através de métodos de microemulsão e técnicas de sol-gel. Estes materiais foram selecionados pelas suas propriedades únicas e por serem biocompatíveis e não tóxicos para o organismo humano, permitindo uma aplicação segura e capaz de servir de alternativa às formulações já aprovadas para fins terapêuticos.

A imobilização do LI+Pp IX dentro das nanocápsulas foi bem sucedida, no entanto esta era apenas garantida quando as nanocápsulas se encontravam em suspensão aquosa visto que a integridade das capsulas era afetada aquando da sua secagem. Assim sendo, esta formulação apresenta-se viável para utilização em trabalhos futuros, com a condicionante de ter que se manusear o material obtido em suspensão aquosa.

Adicionalmente, foi avaliada a capacidade das nc/Si-LI e da emulsão de LI para absorver e libertar O₂, visando explorar o seu potencial para intensificar a atividade oxidante da Pp IX, quando irradiada. Ambas as amostras sujeitas a este teste revelaram ser capazes de capturar e difundir oxigénio, sendo a constante de difusão de O₂ (K_{La}) superior no caso da emulsão. Comprovou-se assim a capacidade do [P_{6,6,6,14}][NTf₂] de absorver eficazmente O₂, tanto na sua forma “livre”, em emulsão como na sua forma encapsulada.

Finalmente a viabilidade das nc/Si-LI+Pp IX para produção de espécies reativas de oxigénio foi analisada através de ensaios preliminares de oxidação com DPPH, realizados após irradiação prévia das nanocápsulas com luz visível. Nestes ensaios provou-se que a irradiação das nanocápsulas despoletava a produção de ROS e que, quando previamente saturadas em O₂ as nanocápsulas conduziam a um efeito oxidante mais intenso durante os primeiros 300 minutos de reação. Apesar destas conclusões é necessário otimizar o método, já que os resultados apresentam uma incerteza associada de módulo muito elevado.

As condições experimentais para a realização destes ensaios estão a ser otimizadas e deverão ser repetidos num futuro próximo.

Trabalhos futuros

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho de dissertação foram surgindo algumas opções de melhoria relacionadas com procedimentos experimentais que, por limitação temporal não foi possível concretizar. Algumas dessas opções consistem nas seguintes:

- Tentar reduzir a aglomeração das nc/Si-LI+Pp IX. Neste sentido podem ser adotadas duas estratégias: ajustar algumas condições da sua síntese como por exemplo aumentar o volume de água usado (suspensão mais diluída leva ao menor contacto partícula a partícula). Poder-se-ia ainda aplicar ultrassons às nc/Si-LI+Pp IX já sintetizadas, promovendo a dispersão das partículas no meio;
- Utilizar uma outra mistura de surfatantes que aumente a eficácia de emulsificação do LI, ou testar um LI diferente;
- Aumentar a quantidade de TEOS inicialmente adicionado à reação por forma a garantir o completo revestimento das partículas com Sílica, impedindo assim o extravasamento do LI.
- Adicionar um marcador fluorescente às nc/SI-LI+Pp IX que permita, para além do tratamento, a utilização das nanocápsulas em imagiologia e diagnóstico (função teranóstica);
- Adicionar à formulação elementos modificadores que aumentem a biocompatibilidade como ácido fólico e/ou outros funcionalizadores poliméricos (PEG, PLGA) biocompatíveis;
- Realizar microscopia de STEM para obter uma visão mais detalhada da morfologia das nanocápsulas;
- Realizar testes de imunocompatibilidade das nc/Si-LI+Pp IX e testes in-vivo para avaliar a reação de organismos vivos aos materiais propostos neste trabalho;
- Melhorar as condições experimentais do ensaio de difusão de oxigénio com recurso a caudalímetros e medidores de pressão para controlar o fluxo de O₂ e N₂.
- Testar a incorporação das nc/Si-LI+Pp IX numa matriz de hidrogel para aplicações tópicas;
- Realizar os testes de quantificação de ROS através de espectroscopia de SPR e EPR. Testar também outros marcadores antioxidantes utilizados na literatura como o ADPA;

- Realizar a espectrofotometria de UV-VIS apenas ao sobrenadante da amostra de suspensão de cápsula, para evitar a incerteza de leitura causada pelas cápsulas em suspensão e evitar a adsorção do marcador antioxidante à capsula de sílica das nanocápsulas.

Bibliografia

- (1) Bouilloux, J., Collaud, S., & Lange, N. (Julho, 2016). When Polymers See the Light — Applications in Photodynamic Therapy and Photodiagnosis Handbook of Porphyrin Science, 192, 83-120
- (2) Cheng, L., Wang, C., & Liu, Z. (2014). Functional nanomaterials for phototherapies of cancer. Chinese Journal of Clinical Oncology, 41(1), 18–26.
- (3) Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., & Golab, J. (2011). Photodynamic Therapy of Cancer : An Update. American Cancer Society, 61, 250–281.
- (4) Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, T., & Kasprzak, K. (2016). The potential of photodynamic therapy (PDT) - Experimental investigations and clinical use. Biomedicine and Pharmacotherapy, 83, 912–929.
- (5) Rocha, L. B., Arnaut, L. G., Pereira, M. M., Almeida, L., & Simões, S. (2015). Terapia fotodinâmica para tratamento do cancro. Biomateriais Aplicados ao Desenvolvimento de Sistemas Terapêuticos Avançados, 16, 638-674.
- (6) Li, L., & Huh, K. M. (2014). Polymeric nanocarrier systems for photodynamic therapy. Biomaterials Research, 18(19), 1-13.
- (7) Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. Adv. Enzyme Regul., 41, 189-207.
- (8) Kobayashi, H., Watanabe, R., & Choyke, P. L. (2013). Improving Conventional Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effects ; What Is the Appropriate Target ? Theranostics, 4(1), 9-81.
- (9) Prabhakar, U., Blakey, D. C., & Maeda, H. (2013). Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect (EPR) for nanomedicine drug delivery in oncology. Cancer Res., 73(8), 7-2412.
- (10) Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N., & Gambhir, S. S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. Nanomedicine, 6(4), 715-728.
- (11) Rocha, G. B. (2015). Development of a novel photosensitizer for Photodynamic Therapy of cancer. Tese de doutoramento em Ciências Farmacêuticas. Universidade de Coimbra, 1-161.

- (12) Huang, Z., Chen, Q., & Shakil, A. (2003). Hyperoxygenation enhances the tumor cell killing of Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 78, 496-502.
- (13) Chen, Q., Huang, Z., Chen, H., Beckers, J., & Hetzel, F. W. (2002). Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 76, 197-203.
- (14) Vakrat-Haglili, Y., Weiner, L., & Brumfeld, V. (2005). The microenvironment effect on the generation of reactive oxygen species by Pd-bacteriopheophorbide. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 6487-6497.
- (15) Vaupel, P., & Mayer, A. (2007). Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.*, 26, 225-239.
- (16) Sitnik, T. M., Hampton, J. A., & Henderson, B. W. (1998). Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate. *Br J Cancer* 77, 1386-1394.
- (17) Henderson, B. W., Busch, T. W., Vaughan, L. A. (2000). Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. *Cancer Res.*, 60, 525-529.
- (18) Curnow, A., Haller, J. C., Bown, S. G. (2000). Oxygen monitoring during 5-aminolaevulinic acid induced photodynamic therapy in normal rat colon. Comparison of continuous and fractionated light regimes. *Photochem. Photobiol.*, 58, 149-155.
- (19) Maier, A., Anegg, U., Fell, B. (2000). Effect of photodynamic therapy in a multimodal approach for advanced carcinoma of the gastroesophageal junction. *Lasers Surg Med*, 26, 461-466.
- (20) Maier, A., Tomaselli, F., & Anegg, U. (2000). Combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in carcinoma of the esophagus and the esophago-gastric junction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, 18, 649-654.
- (21) Tomaselli, F., Maier, A., & Sankin, O. (2001). Acute effects of combined photodynamic therapy and hyperbaric oxygenation in lung cancer – a clinical pilot study. *Lasers Surg Med*, 28, 399-403.
- (22) Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2005). Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(2), 91–106.

- (23) Sharman, W. M., Allen, C. M. & van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov. Today*, 4(11), 507-517.
- (24) Filipe, J., & Alves, S. (2014). Porfirinas e Terapia Fotodinâmica em Neoplasias, 70. Tese de mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, 1-84.
- (25) Lehninger, A. L., Nelson, L. D. & Cox, M. M. (1993). *Lehninger principles of biochemistry*, New York: Worth Publishers, 1013.
- (26) Menezes, P. F. C. (2006). Estudos Espectroscópicos e Citotóxicos do Photogem[®] Fotodegradado e dos Fotoprodutos Formados pela Irradiação com Laser. Tese de doutoramento, Instituto de Química de São Carlos, 178.
- (27) Hunter, C. A. & Sanders J. K. M. (1990). The nature of pi-pi interactions. *Journal of American Chemical Society*, 112(14), 5525–5534
- (28) Ormond, A. B., & Freeman, H. S. (2013). Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*, 6, 817–840.
- (29) Lucky, S. S., Soo, K. C., & Zhang, Y. (2015). Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews*, 115, 1990-2042.
- (30) Couleaud, Pierre; Morosini; Vincent; Frochot, Céline; Richeter, Sébastien; Raehm, Laurence; Durand, J.-O. (2010). Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale*, 2(7), 1057.
- (31) Homayoni, H., Jiang, K., Zou, X., Hossu, M., Rashidi, L. H., & Chen, W. (2015). Enhancement of protoporphyrin IX performance in aqueous solutions for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(2), 258–266.
- (32) Silva, P. R., Vono, L. L. R., Espósito, B. P., Baptista, M. S., & Rossi, L. M. (2011). Enhancement of hematoporphyrin IX potential for photodynamic therapy by entrapment in silica nanospheres. *Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP*, 13(33), 14946–14952.
- (33) Kadish, K. M., Smith, K. M., & Guillard, R. (2003). *The Porphyrin Handbook, Medical aspects of porphyrins*, Elsevier Science, 14, 214-215.
- (34) Cartlotti, M. E., Trotta, M., & Gasco, M. R. (1982). Behaviour of Hematoporphyrin and Protoporphyrin with Antidepressant Drugs, *Die Pharmazie*, 27.
- (35) Wang, Y., Wang, C., Ding, Y., Li, J., Li, M., Liang, X., & Wang, W. (2016). Biomimetic HDL nanoparticle mediated tumor targeted delivery of indocyanine green for enhanced photodynamic therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 533–540.
- (36) Deda, K. D., & Araki, K. (2015). Nanotechnology, Light and Chemical Action: an Effective Combination to Kill Cancer Cells. *Chem. Soc*, 26(12), 2448–2470.

- (37) Bechet, D., Couleaud, P., Frochet, C., Viriot, M. L., Guillemin, F., & Barberi-Heyob M. (2008). Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends in biotechnology*, 26(11), 21-612.
- (38) Vivero-Escoto, J. L., & Vega, D. L. (2014). Stimuli-responsive protoporphyrin IX silica-based nanoparticles for photodynamic therapy in vitro. *RSC Advances*, 4(28), 1-14.
- (39) Davis, M., Chen, Z., & Shin D. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews*, 7(9), 71-82.
- (40) Konan, Y., Gurny, R., & Allémann, E. (2002). State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology*, 66(2), 89-106.
- (41) Shibu, E. S., Hamada, M., Murase, N., & Biju, V. (2013). Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 15(1), 53–72.
- (42) Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., & Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer*, 37, 1590-1598.
- (43) Reddi, E. (1997). Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. *Elsevier*, 37, 189-195.
- (44) Jin, C. S., Lovell, J. F., & Zheng, G. (2013). One Minute, Sub-One-Watt Photothermal Tumor Ablation Using Porphysomes, *Intrinsic Multifunctional Nanovesicles*, 12(1), 1–6.
- (45) Morgan, A. R., Garbo, G. M., Keck, R., W., & Selman, S. H. (1988). New photosensitizers for photodynamic therapy: combined effect of metallo purpurin derivatives and light on transplantable bladder tumors, *Cancer Res.*, 48 (1988) 194-198.
- (46) Lowe, K. C., Akande, S. L., Bonnett, R., White, R. D., & Berenbaum, M. C. (1992). Protective effects of a novel perfluorochemical emulsion in photodynamic therapy. *Biomaterials, Artificial Cells and Immobilization Biotechnology*, 20(2-4), 925-927.
- (47) Li, B., Moriyama, E. H., Li, F., Jarvi, M. T., Allen, C., & Wilson, B. C. (2007). Diblock Copolymer Micelles Deliver Hydrophobic Protoporphyrin IX for Photodynamic Therapy, 5(30), 6-18.
- (48) Gong, H., Dong, Z., Liu, Y., Yin, S., Cheng, L., Xi, W., Xiang, J., Liu, K., Li, Y., & Liu, Z. (2014). Engineering of multifunctional nanomicelles for combined photothermal and photodynamic therapy under the guidance of multimodal imaging. *Adv. Funct. Mater.* 24(42), 6492–6502

- (49) Goindi, S., Arora, P., Kumar, N., & Puri, A. (2014). Development of Novel Ionic Liquid-Based Microemulsion Formulation for Dermal Delivery of 5-Fluorouracil. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 15(4), 21-810.
- (50) Honzak, L., Sentjurc, M., & Swartz, H. M. (2000). In vivo EPR of topical delivery of a hydrophilic substance encapsulated in multilamellar liposomes applied to the skin of hairless and normal mice. *Journal of controlled release*, 66(2-3), 221-228.
- (51) Ichikawa, K., Hikita, T., Maeda, N., Takeuchi, Y., Namba, Y., & Oku, N. (2004). PEGylation of liposome decreases the susceptibility of liposomal drug in cancer photodynamic therapy. *Biological & Pharmaceutical bulletin*, 27(3),4-443.
- (52) Rahmanzadeh, R., Rai, P., Celli, J. P., Rizvi, I., Baron-Lühr, B., Gerdes, J., & Hasan1, T. (2011). Ki-67 as a molecular target for therapy in an in vitro 3D model for ovarian cancer. *Cancer Research*, 70(22), 9234-9242.
- (53) Oku, N., & Ishii, T. (2009). Antiangiogenic photodynamic therapy with targeted liposomes. *Methods in enzymology*, 465, 30-313.
- (54) Moret, F., Scheglmann, D., & Reddi, E. (2013). Folate-targeted PEGylated liposomes improve the selectivity of PDT with meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC). *Photochemical and photobiological sciences*, 12, 823-834.
- (55) Paszko, E., Vaz, G. M., Ehrhart, C., & Senge, M. O. (2013). Transferrin conjugation does not increase the efficiency of liposomal Foscan during in vitro photodynamic therapy of oesophageal cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(1-2), 10-202.
- (56) Richter, A. M., Waterfield, E., Jain, A. K., Canaan, A. J., Allison, B. A., & Levy, J. G. (1993). Liposomal delivery of a photosensitizer, benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD), to tumor tissue in a mouse tumor model. *Photochemistry and Photobiology*, 57(1), 1000-1006
- (57) Casas, A., & Batlle, A. (2006). Aminolevulinic Acid Derivatives and Liposome Delivery as Strategies for Improving 5-Aminolevulinic Acid- Mediated Photodynamic Therapy, 1157–1168.
- (58) Chowdhary, R.K., Shariff, I., & Dolphin D. (2003). Drug release characteristics of lipid based benzoporphyrin derivative. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 9-13
- (59) Liang, X., Li, X., Yue, X., & Dai, Z. (2011). Conjugation of porphyrin to nanohybrid cerasomes for photodynamic diagnosis and therapy of cancer. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(49), 11622–11627.

- (60) Lee, D. J., Park, G. Y., Kwag, D. S., Youn, Y. S., & Lee, E. S. (2012). Multifunctional poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for luminescence/magnetic resonance imaging and photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1-2), 63-257.
- (61) Gupta, A., Wang, S., Pera, P., Patel, N., Missert, J., Morgan, J., Lee, Y., Kopelman, R., Pandey, R. (2012). Multifunctional nanoplatforms for fluorescence imaging and photodynamic therapy developed by post-loading photosensitizer and fluorophore to polyacrylamide nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(13), 941-950.
- (62) Zhang, Y., Hsu, B. W., Ren, C., Li, X., & Wang, J. (2015). Silica-based nanocapsules: synthesis, structure control and biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 44(1), 315–335.
- (63) Teng, I.-T., Chang, Y.-J., Wang, L.-S., Lu, H.-Y., Wu, L.-C., Yang, C.-M., Ho, J. A. (2013). Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials*, 34(30), 70-7462.
- (64) Kim, W. L., Cho, H., Li, L., Kang, H. C., & Huh, K. M. (2014). Biarmed poly(ethylene glycol)-(pheophorbide a)₂ conjugate as a bioactivatable delivery carrier for photodynamic therapy. *Biomacromolecules*, 15(6), 34-2224.
- (65) Nann, T., Darbandi, M., & Thoman, R. (2007). Hollow Silica Nanospheres: In situ, Semi-In situ, and Two-Step Synthesis. *Chem. Mater.* 19(1), 1700-1703.
- (66) Gary-bobo, M., Mir, Y., Rouxel, C., Brevet, D., Hocine, O., Maynadier, M., Durand, J. (2012). Multifunctionalized mesoporous silica nanoparticles for the in vitro treatment of retinoblastoma : Drug delivery, one and two-photon photodynamic therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 432(1–2), 99–104.
- (67) Tu, H. L., Lin, Y. S., Lin, H. Y., Hung, Y., Lo, L. W., Chen, Y. F., Mou, C. Y. (2009). Light-Activated Hypoxia-Responsive Nanocarriers for Enhanced Anticancer Therapy. *Adv. Mater*, 21, 172.
- (68) Ding, H., Sumer, B. D., Kessinger, C. W., Dong, Y., Huang, G., Boothman, D. A., & Gao, J. (2011). Nanoscopic micelle delivery improves the photophysical properties and efficacy of photodynamic therapy of protoporphyrin IX. *Journal of Controlled Release*, 151(3), 271–277.
- (69) Pucelik, B., Arnaut, L. G., Stochel, G., & Dabrowski, J. M. (2016). Design of Pluronic-Based Formulation for Enhanced Redaporfin-Photodynamic Therapy against Pigmented Melanoma. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(34), 22039–22055.

- (70) Evans, R. G., Klymenko, O. V., Saddoughi, S. A., Hardacre, C., & Compton, R. G. (2004). Electroreduction of oxygen in a series of room temperature ionic liquids composed of group 15-centered cations and anions. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(23), 7878–7886.
- (71) Dias, A. M. A., Freire, M., Coutinho, J. A. P., & Marrucho, I. M. (2004). Solubility of oxygen in liquid perfluorocarbons. *Fluid Phase Equilibria*, (222–223), 1-350.
- (72) Wang, Y., Kim, H., Mun, S., Kim, D., & Choi, Y (2013). Indocyanine green-loaded perfluorocarbon nanoemulsions for bimodal ¹⁹F-magnetic resonance/nearinfrared fluorescence imaging and subsequent phototherapy. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 3(3), 132-140.
- (73) Riess, J. G. (2001). Oxygen Carriers (“Blood Substitutes”) - Raison d’Etre, Chemistry, and Some Physiology, 101, 2797-2919.
- (74) Castro, C., & Briceno, J. C. (2010). Perfluorocarbon-Based Oxygen Carriers: Review of Products and Trials. *Artificial Organs*, 34(8), 622-634.
- (75) Cheng, Y., Cheng, H., Jiang, C., Qiu, X., Wang, W., Yuan, A., Wu, J., & Hu, Y. (2015). Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy. *Nature communications*, 6(8785), 1-8
- (76) Fuchs, J. & Thiele, J. (1998). The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 835–847.
- (77) Wang, S., Li, X., Wu, H., Tian, Z., Xin, Q., He, G., Peng, D., Chen, S., Yin, Y., Guiver, M. D. (2016) Advances in high permeability polymer-based membrane materials for CO₂ separations. *Energy Environ.*, 9, 1863–1890.
- (78) Luis, P., Gerven, T. V., & Bruggen, B., (2012). Recent developments in membrane-based technologies for CO₂ capture. *Prog. Energy Combust. Sci.*,38 (3), 419–448.
- (79) Ferguson, L., & Scovazzo, P. (2007). Solubility, Diffusivity, and Permeability of Gases in Phosphonium-Based Room Temperature Ionic Liquids: Data and Correlations. *Ind. Eng. Chem. Res*, 46, 1369-1374.
- (80) Egorova, K., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017). Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chemical Reviews*, 117(10), 7132-7189.
- (81) Zhang, D., Okajima, T., Matsumoto, F., & Ohsaka, T. (2004). Electroreduction of Dioxygen in 1-n-Alkyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate Room-Temperature Ionic Liquids. *J. Electrochem. Soc.*, 151 (4), 31–37

- (82) Katayama, Y., Sekiguchi, K., Yamagata, M., & Miura, T. (2005). Electrochemical Behavior of Oxygen/Superoxide Ion Couple in 1- Butyl-1-methylpyrrolidinium Bis(trifluoromethylsulfonyl)imide Room-Temperature Molten Salt. *J. Electrochem. Soc.*, 152 (8), 247–250.
- (83) Hayyan, M., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., AlNashef, I. M., & Tan, X. M. (2011). Electrochemical reduction of dioxygen in bis-(trifluoromethylsulfonyl) imide based ionic liquids. *J. Electroanal. Chem.*, 657 (1–2), 150–157.
- (84) Buzzeo, M. C., Klymenko, O. V., Wadhawan, J. D., Hardacre, C., Seddon, K. R., & Compton, R. G. (2003). Voltammetry of oxygen in the room-temperature ionic liquids 1-ethyl-3-methylimidazolium bis((trifluoromethyl) sulfonyl) imide and hexyltriethylammonium bis((trifluoromethyl) sulfonyl) imide: One-electron reduction to form superoxide. Steady-state and transient behavior in the same cyclic voltammogram resulting from widely different diffusion coefficients of oxygen and superoxide. *J. Phys. Chem. A.*, 107 (42), 8872–8878.
- (85) Huang, X.-J., Rogers, E. I., Hardacre, C., & Compton, R. G. (2009). The Reduction of Oxygen in Various Room Temperature Ionic Liquids in the Temperature Range 293–318 K: Exploring the Applicability of the Stokes-Einstein Relationship in Room Temperature Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. B.*, 113 (26), 8953–8959.
- (86) Nakamoto, H., Suzuki, Y., Shiotsuki, T., Mizuno, F., Higashi, S., Takechi, K., Asaoka, T., Nishikoori, H., & Iba, H. (2013). Ether-functionalized ionic liquid electrolytes for lithium-air batteries. *J. Power Sources*, 243, 19–23.
- (87) Neale, A. R., Li, P., Jacquemin, J., Goodrich, P., Ball, S. C., Compton, R. G., & Hardacre, C. (2016). Effect of cation structure on the oxygen solubility and diffusivity in a range of bis{(trifluoromethyl)sulfonyl}-imide anion based ionic liquids for lithium-air battery electrolytes. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18 (16), 11251–11262.
- (88) Fraser, K. J., & MacFarlane, D. R. (2009). Phosphonium-based ionic liquids: An overview. *Australian Journal of Chemistry*, 62(4), 309–321.
- (89) Sousa, S. F. (2017). Membranas de base PVA mais eficientes para a captura e separação de gases. Projeto de Dissertação de Mestrado na área científica de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, 86.
- (90) Iego, N. D. (2012). Guidelines for dynamic light scattering measurements, *NanoComposix*, 3, 1–7.
- (91) Malvern Instruments - Zetasizer Nano Series User Manual (2003, 2004).

- (92) Sponsored Content by Malvern Instruments Ltd (2014). Using DLS Deconvolution Algorithms to Acquire Intensity Weighted Particle Size Distribution from Measured Correlogram, 1–15.
- (93) A Malvern Instruments' Bioscience Development Initiative Executive (2014). Application of Dynamic Light Scattering (DLS) to Protein Therapeutic Formulations: Principles, Measurements and Analysis - 3. DLS Deconvolution Algorithms.
- (94) Acton, Q. A. (2012), *Advances In Nanotechnology Research And Application*. Scholarly Editions, 2069-2073.
- (95) Bhattacharjee, S. (2016). Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not ? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351.
- (96) Moutafchieva, D., Popova, D., Dimitrova, M., & Tchaoushev, S. (2013). Experimental determination of the volumetric mass transfer coefficient. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 48 (4), 351-356.
- (97) Eaton, A., & Franson M. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*. American Public Health Association, 21, 1200.
- (98) Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free Radicals, Natural Antioxidants, and their Reaction Mechanisms, *RSC Advances*, 15(2), 156-170.
- (99) Cox, S. G., & Whitten, G. (1983). Excited state interactions of Protoporphyrin IX and related porphyrins with molecular oxygen in solutions and in organized assemblies. Department of Chemistry, University of North Carolina, 279-289.
- (100) Mukerjee, P., Mysels, K. J. (1971). Critical micelles concentrations of aqueous surfactant systems. *National Standard Reference Data System*, 126-139
- (101) Lin, S., Lin, Y., Chen, E., Hsu, C. & Kwan, C. (1999). A study of the equilibrium surface tension and the critical micelle concentration of mixed surfactant solutions. *Langmuir*, 15 (13), 4370–4376.
- (102) Kovalchuk, N. M., Trybala, A., Starov, V., Matar, O.; Ivanova, N. (2014). Fluoro-Vs hydrocarbon surfactants: Why do they differ in wetting performance? *Adv. Colloid Interface Sci.* 210, 65–71.
- (103) Al-Oweini, R., & El-Rassy, H. (2009). Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several Si(OR)₄ and RSi(OR)₃ precursors. *Journal of Molecular Structure*, 919, 140–145.
- (104) Asha, M., Nithya, C., & Kathiravan, A. (2017). *Spectrochimica Acta Part A : Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Unravel the interaction of protoporphyrin IX

with reduced graphene oxide by vital spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 178, 86–93.

(105) Fedrizzi, L., & Simões A. (2007). Innovative pre-treatment techniques to prevent corrosion of metallic surfaces. *Woodhead Publishing in Materials*, 54, 1354-5116.

(106) Motte, C., Maury, N., Olivier, M., Petitjean, J., & Willem, J. (2005). Cerium treatments for temporary protection of electroplated steel, 200, 2366–2375.

(107) Sorenson, K. L., & Sims, R. (2010). Comparative Studies on Oxygen Mass Transfer for the Design and Development of a Single-Use Fermentor, tese de mestrado em Engenharia Biológica, Universidade de Logan, Utah, 1-116.

Anexos

Anexo A

Anexo A1 – Representação esquemática dos meios de ação da PDT e principais agentes envolvidos no processo.

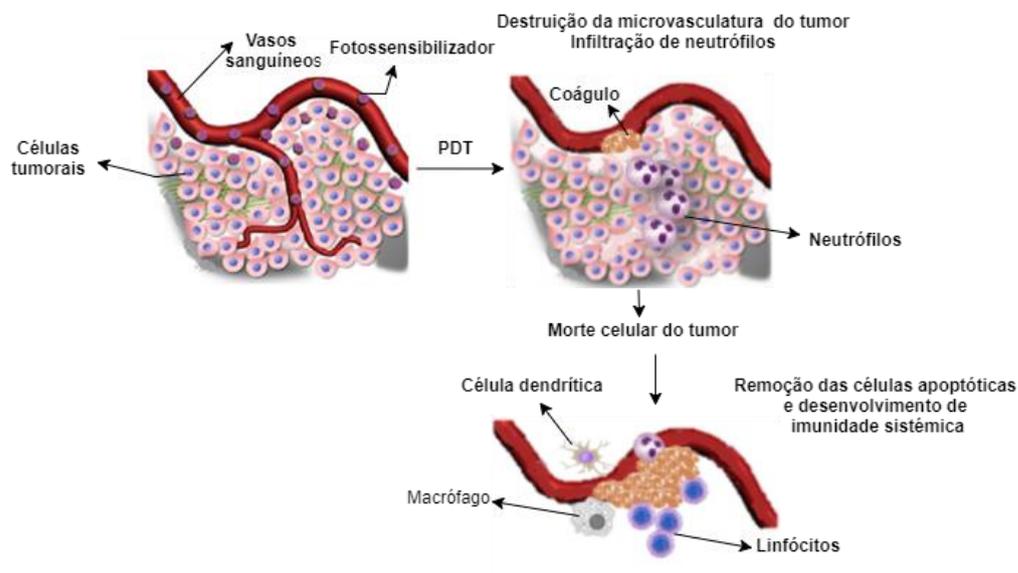


Figura A 1 Danos irreparáveis ocorrem nas macromoléculas celulares e provocam a morte celular via apoptose, necrose ou autofagia, acompanhada de indução de inflamação local aguda que participa na remoção das células mortas e contribui para a recuperação da homeostase sistêmica. Adaptado da referência 1.

Anexo A2 – Representação gráfica do espectro de absorção da Protoporfirina IX.

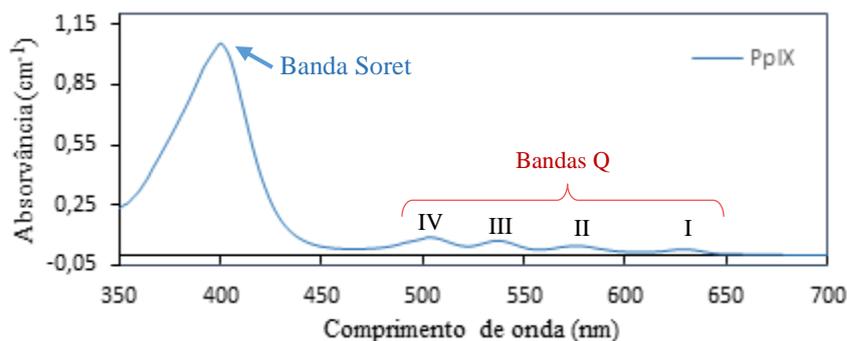


Figura A 2 Espectro de absorção da Pp IX obtido através de um ensaio realizado no espectro UV-VIS do laboratório GSP (Green and Sustainable Processes) da UC para uma amostra de concentração 0,002 mg/mL em etanol.

Anexo B - Concentração micelar crítica para vários sistemas de surfatantes

Tabela B 1 Resultados experimentais dos ensaios de tensão superficial (γ , mN/m) em função da concentração total de surfatantes (C, mM) para todos os sistemas estudados. Os dados obtidos nesta tese encontram-se a negrito.

Sistema	C (mM)	γ (mN/m)	$\delta\gamma$ (mN/m)	CMC		
				A	B	C
S_{1,1}:S_{2,1}:S_{3,1} *	6,000	35,62	0,381	0,156	0,139	1,000
	5,000	35,64	0,461			
	4,000	35,73	0,460			
	3,000	35,75	0,434			
	2,000	36,05	0,861			
	1,000	36,62	1,665			
	0,500	36,10	1,098			
	0,250	37,02	1,960			
	0,150	37,50	2,500			
	0,075	42,89	0,496			
	0,010	50,89	1,697			
	0,000	71,45	0,029			
S_{1,2}:S_{2,2}:S_{3,2} *	6,000	34,22	0,317	0,213	0,220	1,000
	5,000	33,97	0,023			
	4,000	33,87	0,225			
	3,000	33,87	0,390			
	2,000	34,79	0,338			
	1,000	35,33	0,568			
	0,500	34,44	0,017			
	0,250	32,11	0,342			
	0,010	48,73	2,524			
	0,005	51,54	2,768			
	0,000	72,40	0,000			
	S_{1,3}:S_{2,3}:S_{3,3} *	6,000	29,86			
5,000		29,87	1,121			
4,000		30,32	0,994			
3,000		31,78	0,950			
2,000		33,00	1,148			
1,000		34,31	0,225			
0,500		34,13	2,196			
0,250		37,04	1,440			
0,010		42,34	0,157			
0,005		56,53	2,283			
0,000		71,09	0,475			
S_{1,4}:S_{2,4}:S_{3,4} **		6,000	26,81	0,559	0,546	0,435
	5,000	27,37	1,131			
	4,000	27,51	0,834			
	3,000	28,07	1,315			
	2,000	28,97	1,846			
	1,000	29,34	0,078			
	0,500	31,12	3,019			
	0,250	33,74	1,725			
	0,070	39,87	2,779			
	0,000	72,40	0,000			
S_{1,5}:S_{2,5}:S_{3,5} *	6,000	24,89	0,173	0,240	0,190	2,000
	5,000	25,00	0,509			
	4,000	24,94	1,284			
	3,000	26,00	1,874			

	2,000	27,36	1,904							
	1,000	29,86	0,701							
	0,500	36,16	1,181							
	0,250	39,66	0,310							
	0,150	40,60	0,395							
	0,075	41,66	0,561							
	0,010	55,05	2,476							
	0,000	71,09	0,475							
S_{1,6}:S_{2,6}:S_{3,6}	6,000	22,27	0,205	0,669	0,509	2,000				
	5,000	22,20	0,707							
	4,000	21,55	1,344							
	3,000	20,69	0,007							
	2,000	21,56	0,368							
	1,000	24,96	0,099							
	0,500	27,92	0,898							
	0,250	36,69	1,782							
	0,070	40,94	1,216							
	0,000	72,40	0,000							
	6,000	24,57	0,371							
	5,000	23,98	0,052							
	4,000	23,77	0,394							
	3,000	23,45	0,233							
	2,000	24,09	0,441							
S_{1,7}:S_{2,7}:S_{3,7}*	1,000	26,62	0,057	0,330	0,309	2,000				
	0,500	34,11	1,372							
	0,250	37,15	0,913							
	0,150	43,49	1,767							
	0,075	48,69	0,424							
	0,010	66,52	3,484							
	0,000	71,09	0,475							
		6,000	23,12				1,235			
		5,000	22,71				1,409			
		4,000	21,93				1,645			
	3,000	17,88	1,595							
	2,000	17,23	1,798							
S_{1,8}:S_{2,8}:S_{3,8}*	1,000	23,82	3,551	0,562	0,435	2,000				
	0,530	34,44	1,506							
	0,247	41,27	1,289							
	0,114	47,51	0,429							
	0,052	52,76	0,521							
	0,023	56,84	1,151							
	0,000	71,45	0,029							

* Dados obtidos por Sylvania Sousa, “Membranas de base PVA mais eficientes para a captura e separação de gases.”, dissertação do MIEQ, 2016 – 2017 & Mariana Silva, “Novos materiais para oxigenação melhorada de culturas de células e de scaffolds para engenharia de tecidos”, dissertação do MIEB, 2017 – em curso;

**Dados obtidos por Gustavo Marques, “Instrumentos biomédicos com capacidade de oxigenação aumentada”, dissertação do MIEB, 2017 – em curso.

Uma vez que as concentrações relativas de surfatantes não podem ser reveladas, no sentido de possibilitar a comparação entre cada sistema são apresentadas os seguintes critérios: $S_{1,1} > S_{1,2} > S_{1,4} > S_{1,6}$; $S_{1,2} = S_{1,3}$; $S_{1,4} = S_{1,5}$; $S_{1,6} = S_{1,7}$; $S_{1,8} = 0$; $S_{2,1} = S_{2,3} = S_{2,5} = S_{2,7} = S_{2,8} = 0$; $S_{2,2} = S_{2,4} = S_{2,6}$; $S_{3,1} = S_{3,2} = 0$; $S_{3,3} = S_{3,4}$; $S_{3,5} = S_{3,6}$; $S_{3,3} < S_{3,5} < S_{3,7} < S_{3,8}$. O sistema nomeado por $S_{1,2}:S_{2,2}:S_{3,2}$ corresponde ao sistema (2) [$S_{1}:S_{2}:0$] referido neste trabalho e o sistema $S_{1,6}:S_{2,6}:S_{3,6}$ diz respeito ao sistema (1) [$S_{1}:S_{2}:S_{3}$].

Anexo C – Dados obtidos através de DLS

Após a obtenção dos dados pelo DLS estes foram sujeitos a uma análise que foi transversal a todos os elementos do grupo GSP e cujos resultados se encontram nas tabelas C1 e C2. Por cada medição foram recolhidos 5 valores e destes selecionaram-se apenas 4, 3 ou 2, escolhidos tendo em conta um critério pré determinado, que para além de se basear na proximidade entre os valores obtidos, valorizou ainda a semelhança entre as curvas de dispersão obtidas referentes a cada valor. Para além disso, por cada medição, o software *Zetasizer* apresenta-nos dois resultados distintos que provém de duas análises efetuadas pelo software: a análise de dispersão (valor do pico médio) e a análise de cumulantes (valor de Z-average). Essas análises diferem entre si, sendo que a *análise de dispersão* tem em conta a média e os desvios padrão associados aos valores extraídos durante a totalidade da medição, enquanto a análise de cumulantes se fundamenta na obtenção de uma equação de decaimento exponencial que é ajustada à parte inicial de uma função de autocorrelação (ACF). Este método é menos vulnerável à presença de ruído que os outros algoritmos, no entanto não pode ser utilizado para amostras com valores de dH heterogéneos, sendo adequado apenas para casos de baixa dispersão, caracterizados por picos de banda estreita (variação de menos de 100 nm) e PDI inferior a 0,1. Nas tabelas seguintes estão discriminados os valores obtidos segundo estas duas metodologias de análise para todos os sistemas estudados pelo grupo GSP.

Tabela C 1 Resultados experimentais dos ensaios de DLS efetuados às emulsões de PFD para todos os sistemas estudados pelo grupo GSP da UC. Apresenta-se o dH (nm) das partículas em função do tempo de sonicação (min) para a cinética de formação (0 horas) e para a cinética de degradação (4, 24 e 48 horas). Os resultados obtidos nesta tese encontram-se a negrito.

		Cinética de Formação				Cinética de Degradação											
		Instante (0 horas)				4 horas				24 horas				48 horas			
Sistema	At sonicação (min)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)
S _{1,1} :S _{2,1} :S _{3,1} *	5	285,2	11,81	227,6	0,49	279,5	1,20	256,9	0,61	343,9	0,85	295,8	2,19	489,9	36,42	395,3	3,39
	10	257,9	8,49	219,2	2,40	280,3	8,70	244,1	0,35	337,0	4,81	317,7	2,69	363,7	2,51	323,4	7,54
	15	270,5	13,72	232,7	1,48	285,2	5,43	247,1	1,95	325,3	2,15	275,7	2,69	363,6	8,98	316,8	1,41
	20	262,9	1,56	234,1	5,59	269,8	5,80	223,4	1,27	321,9	13,15	278,3	0,99	388,8	7,85	323,5	3,25
	25	330,1	7,21	263,0	7,00	291,2	0,78	275,3	3,39	345,6	2,83	276,1	1,41	393,7	3,11	366,0	2,90
S _{1,2} :S _{2,2} :S _{3,2} *	5	259,0	4,31	190,6	0,00	251,9	2,90	216,5	0,64	310,9	5,52	259,2	2,19	282,1	1,06	282,1	1,06
	10	230,9	5,37	195,1	3,11	257,2	2,83	217,0	0,99	298,9	4,24	259,0	3,39	280,4	0,21	280,4	0,21
	15	230,7	2,12	196,6	1,48	266,3	4,38	230,4	3,32	307,5	21,40	263,8	3,40	298,2	7,99	298,2	7,99
	20	273,8	3,18	226,1	3,96	257,7	0,78	223,4	2,33	298,2	0,14	272,2	6,08	301,9	3,75	301,9	3,75
	25	240,7	4,60	218,0	6,65	256,6	2,76	229,9	7,21	318,9	10,11	269,1	5,37	302,6	1,63	302,6	1,63
S _{1,3} :S _{2,3} :S _{3,3} *	5	208,4	1,91	164,0	0,92	214,8	3,14	183,3	7,32	251,4	4,22	218,7	1,30	281,4	1,13	243,4	1,84
	10	190,1	8,41	162,7	0,99	206,6	3,99	177,5	1,22	251,6	1,70	221,7	3,68	282,3	4,05	241,8	4,80
	15	213,1	4,53	169,3	2,83	210,4	7,96	183,0	5,00	259,5	9,33	224,6	3,96	279,5	1,64	244,5	1,63
	20	202,1	1,91	175,5	5,16	209,5	1,27	188,3	2,90	252,5	6,65	228,1	0,28	293,0	7,76	255,7	7,02
	25	180,2	0,28	197,7	21,50	228,7	0,71	187,8	1,27	262,9	16,05	229,5	3,89	285,4	5,44	252,1	5,73
S _{1,4} :S _{2,4} :S _{3,4} *	5	227,3	13,58	191,5	2,83	191,0	2,80	158,7	1,56	202,3	2,26	175,7	1,27	224,0	0,71	195,2	0,64
	10	192,8	2,33	178,2	8,49	201,4	4,65	165,3	3,60	221,7	1,77	185,5	1,84	234,9	0,92	204,3	0,35
	15	204,1	1,98	177,8	1,84	210,8	3,32	177,7	0,42	218,1	4,95	194,8	0,42	229,9	1,98	215,7	3,46
	20	209,0	0,92	177,2	2,05	207,1	4,53	179,6	1,41	234,3	0,42	199,0	1,20	243,6	5,26	219,7	5,48
	25	212,0	3,81	186,3	5,55	213,4	3,25	176,6	1,34	235,1	0,71	200,7	3,18	234,2	1,20	220,5	6,58
S _{1,5} :S _{2,5} :S _{3,5} *	5	249,0	13,72	228,5	1,48	237,7	3,39	217,4	0,35	243,3	12,59	209,9	1,56	251,2	6,65	222,9	1,56
	10	194,8	7,85	177,3	1,41	200,6	7,42	180,2	0,85	199,5	24,61	191,4	2,05	213,1	0,21	196,1	5,02
	15	177,3	0,00	171,1	5,59	185,4	4,95	170,1	3,25	186,0	16,62	181,6	7,78	202,9	1,56	184,1	2,12
	20	164,6	3,75	157,3	1,98	174,8	3,39	161,0	0,92	180,1	15,49	175,0	1,41	189,5	10,54	180,5	1,70
	25	158,0	1,27	154,6	5,63	153,7	3,32	162,3	6,72	171,2	6,72	169,8	5,52	175,0	8,70	176,2	4,81
	30	157,6	2,76	148,6	0,57	159,3	1,77	146,2	2,19	157,3	4,17	163,2	3,68	170,5	5,09	171,3	1,20
S _{1,6} :S _{2,6} :S _{3,6} *	5	297,3	10,04	223,9	0,64	312,7	0,99	257,9	2,05	314,7	0,71	273,4	2,47	445,9	5,37	356,2	2,05
	10	267,0	5,44	242,0	3,68	297,9	6,72	233,3	0,49	328,2	7,07	287,1	5,09	342,4	7,35	304,3	0,35
	15	271,7	4,53	230,4	4,17	269,2	6,51	251,5	3,89	318,8	7,71	288,8	4,67	325,2	2,76	316,7	5,02

	20	299,0	8,31	270,2	2,42	286,8	14,64	241,8	3,75	337,9	10,18	280,8	3,68	350,0	2,47	309,6	4,82
	25	253,8	4,32	259,0	24,28	276,3	1,84	237,7	2,83	318,5	7,99	279,3	1,84	325,6	8,63	310,9	8,41
	30	280,0	3,89	252,1	10,11	281,2	2,62	259,7	19,94	326,4	11,03	286,0	2,19	336,3	3,89	319,4	0,28
S_{1,7}:S_{2,7}:S_{3,7} *	5	269,3	7,21	221,4	3,39	276,2	0,85	246,1	0,42	305,9	12,16	270,1	1,13	314,5	29,56	315,6	5,52
	10	266,2	20,51	230,6	1,77	276,9	9,19	233,9	5,52	312,1	11,88	276,0	3,25	324,6	9,10	317,2	7,13
	15	269,0	34,08	232,2	3,96	268,9	2,26	241,7	1,91	318,5	1,48	301,8	0,78	333,2	0,00	320,6	16,48
	20	262,0	2,19	246,2	0,85	383,2	7,42	380,4	5,59	352,0	9,33	299,3	9,33	351,6	8,77	332,4	7,28
	25	263,0	5,94	243,0	0,92	260,6	7,35	241,1	3,75	322,2	7,85	323,2	5,59	335,3	9,33	311,5	5,30
	30	261,4	2,37	238,2	7,08	283,7	1,10	249,2	18,85	320,5	2,12	272,2	0,42	344,2	27,15	301,6	1,70
S_{1,8}:S_{2,8}:S_{3,8} **	5	305,1	91,10	150,9	31,10					236,7	3,00	176,7	29,20	265,8	13,90	175,4	24,40
	10	219,9	18,10	184,5	9,10					242,1	9,00	208,5	6,30	273,8	10,40	227,6	5,10
	15	226,9	5,30	189,5	5,50					252,3	1,60	222,4	2,80	270,7	12,90	227,2	9,40
	20	237,5	7,40	199,5	2,00					258,2	17,20	227,7	11,80	285,7	2,20	246,5	2,70
	25	258,9	7,50	209,5	2,70					246,7	1,90	218,0	2,00	326,5	21,90	274,9	12,80
	30	249,1	8,80	219,1	8,10					260,8	7,10	230,0	8,90	281,8	8,30	248,0	7,50
S_{1,9}:S_{2,9}:S_{3,9}	5	227,5	8,45	228,0	46,56					218,6	4,54	166,9	27,97	242,3	22,31	185,5	18,87
	10	226,7	6,95	184,9	3,72					220,0	4,78	186,7	4,50	234,0	15,61	206,1	19,29
	15	233,6	4,18	191,1	7,46					236,7	8,17	201,4	8,29	256,2	8,31	224,2	1,69
	20	238,7	12,04	198,9	7,67					244,4	3,30	212,8	0,67	261,7	3,34	229,3	6,35
	25	238,9	5,19	196,2	3,00					254,0	17,50	214,0	10,40	260,3	1,68	224,6	2,61
	30	238,8	7,08	205,2	9,72					245,8	2,87	211,7	3,00	259,9	4,45	231,1	8,52
S_{1,10}:S_{2,10}:S_{3,10} *	5	223,6	3,39	186,4	3,61	209,9	2,57	181,9	0,99	228,5	5,20	199,6	2,31	247,0	2,05	220,1	3,61
	10	202,9	12,66	188,7	1,13	212,6	3,70	185,2	0,85	232,9	13,58	206,0	1,98	244,3	3,50	214,8	2,57
	15	223,2	5,57	198,4	4,11	227,1	3,25	195,3	1,59	228,1	7,07	210,1	0,85	247,1	3,60	224,3	2,61
	20	230,1	1,13	189,4	2,26	216,6	0,42	190,8	0,85	233,6	0,42	211,6	1,91	249,4	2,83	222,2	6,22
	25	192,0	1,41	205,7	9,26	234,6	5,66	196,7	0,07	233,8	0,07	217,8	2,55	256,2	2,62	231,7	1,20
	30	216,4	18,17	203,0	1,27	213,5	5,48	200,5	5,21	225,0	4,24	215,4	3,11	262,2	4,60	229,6	0,64
S_{1,11}:S_{2,11}:S_{3,11} *	5	199,5	0,92	152,0	1,20	185,3	4,74	149,9	0,85	190,2	1,07	168,2	1,65	211,7	3,46	184,2	0,57
	10	143,8	3,61	231,8	65,62	170,2	0,99	150,2	5,09	187,1	2,86	161,0	1,12	195,7	3,04	171,8	2,15
	15	190,1	7,35	166,9	14,14	187,4	1,48	152,7	0,14	198,6	2,47	171,5	3,32	210,4	5,02	183,4	2,26
	20	148,5	0,49	174,2	12,30	173,9	14,85	158,9	3,54	197,2	10,68	175,5	4,88	213,5	0,64	185,0	0,64
	25	189,8	9,33	168,0	7,64	168,9	27,58	163,0	6,29	217,6	2,47	188,3	1,84	206,2	6,51	182,3	1,56
	30	158,8	7,35	231,1	62,30	181,7	9,55	156,3	0,00	237,7	12,66	200,2	1,77	216,2	0,64	191,1	0,92
S_{1,12}:S_{2,12}:S_{3,12} *	5	288,1	13,86	243,3	2,90	223,6	14,21	227,3	0,99	236,0	3,71	217,6	0,68	243,4	14,25	223,2	1,24
	10	187,7	3,21	176,8	1,42	205,4	0,57	182,7	0,28	215,1	6,01	198,9	4,03	213,1	0,21	196,1	5,02
	15	174,2	3,40	162,3	2,35	183,9	2,11	169,6	1,42	200,0	0,35	184,0	3,25	202,9	1,56	184,1	2,12
	20	169,7	6,51	152,9	1,70	172,7	1,06	157,5	1,13	189,2	7,07	178,6	2,55	189,5	10,54	180,5	1,70
	25	157,4	2,83	146,7	0,57	160,0	2,37	148,8	1,06	178,2	2,60	165,3	2,80	175,0	8,70	176,2	4,81
	30	146,3	3,46	150,9	4,86	157,2	1,70	143,3	2,21	175,2	3,46	162,2	0	171,7	4,16	167,6	6,44

*Dados obtidos por Usman Sayed, aluno de doutoramento do grupo GSP.

**Dados obtidos por Gustavo Marques, “Instrumentos biomédicos com capacidade de oxigenação aumentada”, dissertação do MIEB, 2017 – em curso.

Uma vez mais, visto que as concentrações relativas de surfatantes não podem ser reveladas, no sentido de possibilitar a comparação entre cada sistema são apresentadas os seguintes critérios: $S_{1,1} > S_{1,2} > S_{1,3} = S_{1,6} = S_{1,7} = S_{1,8} > S_{1,4} = S_{1,9} > S_{1,10} = S_{1,11} > S_{1,5} = S_{1,12} = 0$; $S_{2,6} = S_{2,10} = S_{2,12} > S_{2,7} = S_{2,11} > S_{2,8} = S_{2,9} > S_{2,1} = S_{2,2} = S_{2,3} = S_{2,4} = S_{2,5} = 0$; $S_{3,5} > S_{3,4} > S_{3,3} = S_{3,9} = S_{3,11} = S_{3,12} > S_{3,10} > S_{3,2} = S_{3,8} > S_{3,7} > S_{3,1} = S_{3,6}$. O sistema nomeado nesta tabela por $S_{1,8}:S_{2,8}:S_{3,8}$ corresponde ao (1) [$S_1:S_2:S_3$].

Tabela C 2 Resultados experimentais dos ensaios de DLS efetuados às emulsões de líquidos iónicos (OMIM[NTf₂] e [P_{6,6,6,14}][NTf₂]) para todos os sistemas estudados pelo grupo GSP da UC. Apresenta-se o dH (nm) das partículas em função do tempo de sonicação (min) para a cinética de formação (0 horas) e para a cinética de degradação (24, 48 e 72 horas). Encontram-se ainda discriminados os valores obtidos através do método de análise do pico médio e do método Z-average. Os dados obtidos nesta tese encontram-se a negrito.

		Cinética de Formação				Cinética de Degradação											
		Instante (0 horas)				24 horas				48 horas				72 horas			
Sistema	Δt sonicação (min)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)	Pico médio (nm)	Desvio padrão (nm)	Z-average (nm)	Desvio padrão (nm)
$S_{1,1}:S_{2,1}:S_{3,1}$ *	5	323,9	2,89	257,2	5,3	406,6	5,36	387,2	8,58	304,3	2,76	245,6	4,81	291,0	9,40	233,50	0,85
	10	385,3	2,40	377,5	33,7	404,8	2,69	339,3	2,62	319,8	3,46	227,8	0,21	311,3	2,57	222,30	2,89
	15	380,4	4,08	307,5	18,7	384,1	3,26	310,4	6,34	304,4	3,86	235,4	1,21	373,5	4,53	305,95	11,10
	20	373,1	3,18	245,1	3,6	311,8	2,40	280,2	1,84	300,7	4,68	224,6	0,32	293,8	4,25	226,63	13,56
	25	347,4	3,09	287,8	2,7	369,8	21,78	360,2	3,89	303,2	3,70	237,2	1,78	308,6	7,47	241,00	5,12
	30	459,6	24,40	419,0	1,1	422,0	6,36	417,3	13,58	315,5	3,08	230,2	2,95	304,1	6,46	288,00	19,02
$S_{1,2}:S_{2,2}:S_{3,2}$ *	5	254,7	2,75	221,7	1,49	260,7	5,40	212,6	0,56	263,3	2,76	224,6	2,47	256,6	3,32	207,40	2,46
	10	284,5	3,74	222,0	2,82	331,1	2,45	255,1	2,73	295,1	4,53	260,1	6,51	285,3	0,78	227,15	0,64
	15	284,6	1,69	229,8	3,79	356,6	2,37	282,1	7,67	296,7	9,55	261,6	4,37	284,6	1,91	238,43	4,61
	20	326,7	1,91	229,3	0,14	284,9	0,95	259,0	4,10	288,7	0,55	268,6	3,47	295,8	1,65	223,53	1,24
	25	388,2	3,04	311,2	7,21	284,2	2,55	257,9	0,64	291,3	9,05	264,0	7,14	295,4	6,90	222,57	1,14
	30	360,5	26,87	251,3	10,96	397,6	4,24	380,5	23,05	403,8	2,05	353,3	5,20	286,3	4,53	218,85	0,21
$S_{1,3}:S_{2,3}:S_{3,3}$	5	242,2	19,12	338,2	77,86	215,4	19,04	422,7	104,71	208,3	5,03	259,9	41,95	218,5	27,47	247,10	65,27
	10	268,5	42,04	188,5	18,22	275,7	43,01	233,6	24,32	277,1	70,26	219,2	55,38	244,5	24,01	216,18	4,59
	15	318,3	13,38	253,7	28,11	277,3	67,07	238,1	39,53	299,8	23,61	225,9	4,95	319,8	39,38	250,16	25,97
	20	322,8	19,14	226,4	2,20	299,5	51,00	261,7	23,26	332,7	13,26	272,0	17,11	334,5	16,73	233,99	7,37
	25	292,3	35,24	251,0	26,94	334,8	12,30	230,8	3,06	305,5	39,76	254,0	37,31	301,4	27,02	250,11	31,93
	30	355,3	25,74	244,9	10,59	273,0	4,59	231,8	7,79	303,0	30,21	272,0	8,44	340,7	7,82	243,71	20,54
$S_{1,4}:S_{2,4}:S_{3,4}$	5	208,9	10,72	722,7	254,20	228,5	9,38	431,5	102,86	219,0	6,21	495,0	210,52	220,4	9,55	407,44	145,74
	10	291,1	3,88	206,8	3,45	265,2	11,52	220,3	21,28	266,7	5,16	238,2	32,65	273,1	6,12	246,55	30,22
	15	303,9	13,65	248,2	15,15	255,2	10,68	222,3	9,40	305,6	26,19	232,2	15,35	294,5	21,30	220,07	17,96
	20	333,4	6,92	243,9	9,88	276,1	11,29	251,5	15,07	274,1	15,06	247,3	7,43	275,4	15,42	250,16	12,80
	25	304,9	22,17	222,9	3,69	272,1	18,02	209,7	3,62	274,8	21,93	203,7	12,69	291,2	12,92	209,83	7,97
	30	290,2	19,06	239,2	27,16	307,5	31,71	232,1	33,66	309,3	42,92	227,6	16,14	311,1	25,58	230,48	23,40

* Dados obtidos por Sílvia Sousa, “Membranas de base PVA mais eficientes para a captura e separação de gases”, dissertação do MIEQ, 2016 – 2017.

Novamente, visto que as concentrações relativas de surfatantes não podem ser reveladas, no sentido de possibilitar a comparação entre cada sistema são apresentadas os seguintes critérios: $S1,1 < S1,2$; $S2,1 = S2,2$; $S3,1 > S3,2=0$. Neste caso os sistemas 2), 3) e 4) são iguais, variando apenas o LI usado e a tipologia da sonda. O sistema S1 foi testado para o líquido iônico OMIM recorrendo à sonda microtip, o sistema S2 foi testado para o líquido iônico OMIM recorrendo à sonda microtip, o sistema S3 foi testado para o líquido iônico $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$ recorrendo à sonda microtip e o sistema S4 foi testado para o líquido iônico $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$ recorrendo à sonda macrotip. Os sistemas 3) e 4) correspondem ambos à formulação (2) $[S1:S2:0]$ referida neste trabalho.

Anexo D – Perfis da análise de TGA para os compostos usados no seu estado puro

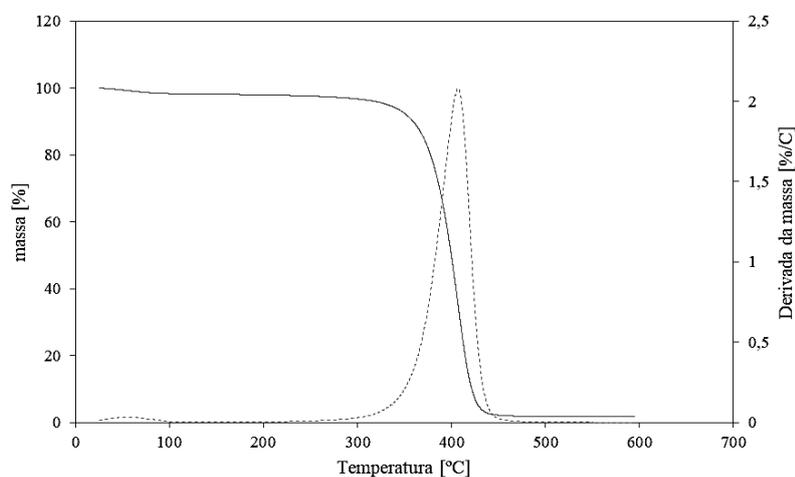


Figura D 1 Perfil de TGA do surfatante S1. (Legenda: (—) Massa [%]; (·) Derivada da massa [%/C]).

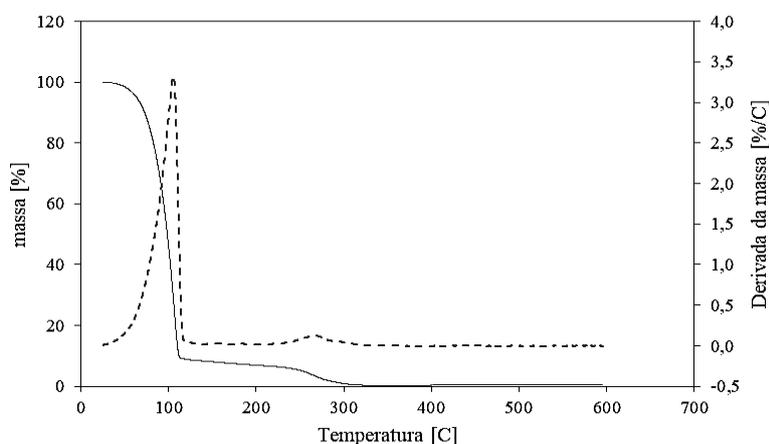


Figura D 2 Perfil de TGA do surfatante S2. (Legenda: (—) Massa [%]; (--) Derivada da massa [%/C]).

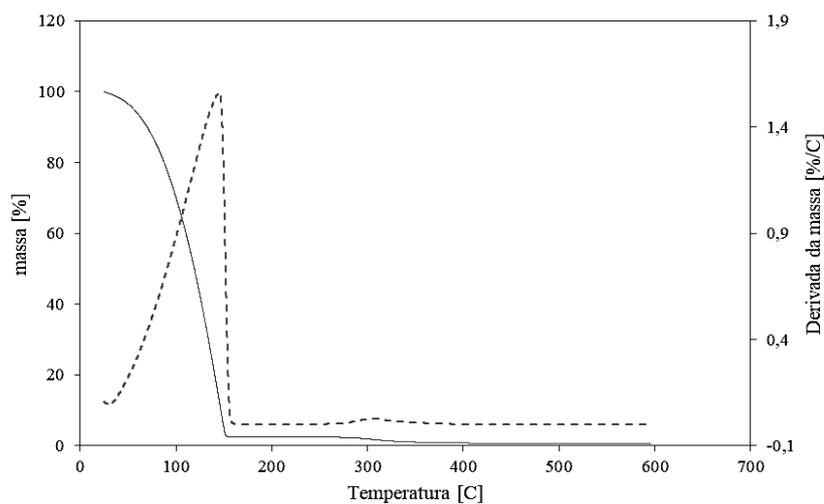


Figura D 3 Perfil de TGA da solução de sal orgânico. (Legenda: (–) Massa [%]; (– –) Derivada da massa [%/C])

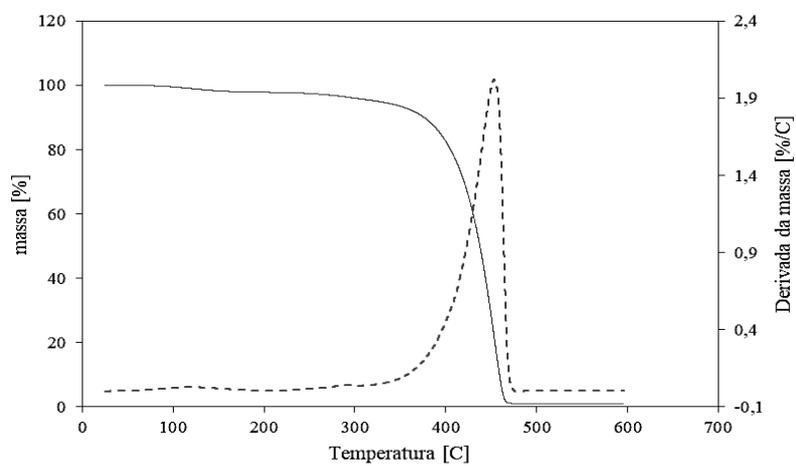


Figura D 4 Perfil de TGA do $[P_{6,6,6,14}][NTf_2]$. (Legenda: (–) Massa [%]; (– –) Derivada da massa [%/C])

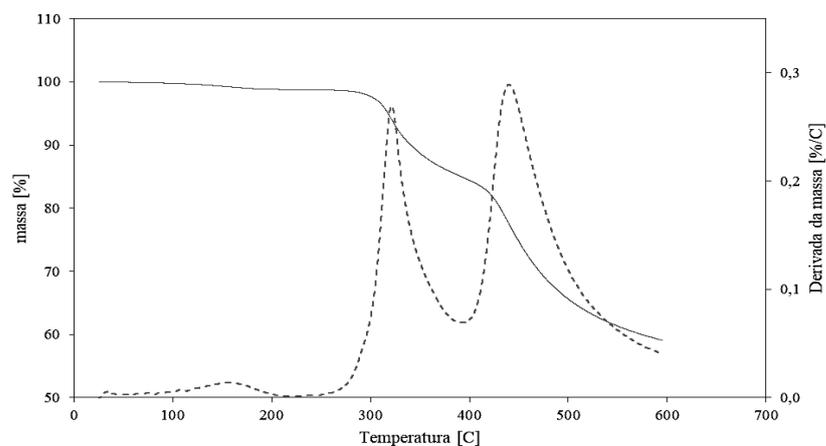


Figura D 5 Perfil de TGA da Pp IX. (Legenda: (–) Massa [%]; (– –) Derivada da massa [%/C])

Anexo E – Exemplos do cálculo dos K_{La} 's

Neste anexo encontra-se um exemplo do cálculo dos K_{La} 's para cada um dos tipos de ensaio efetuado.

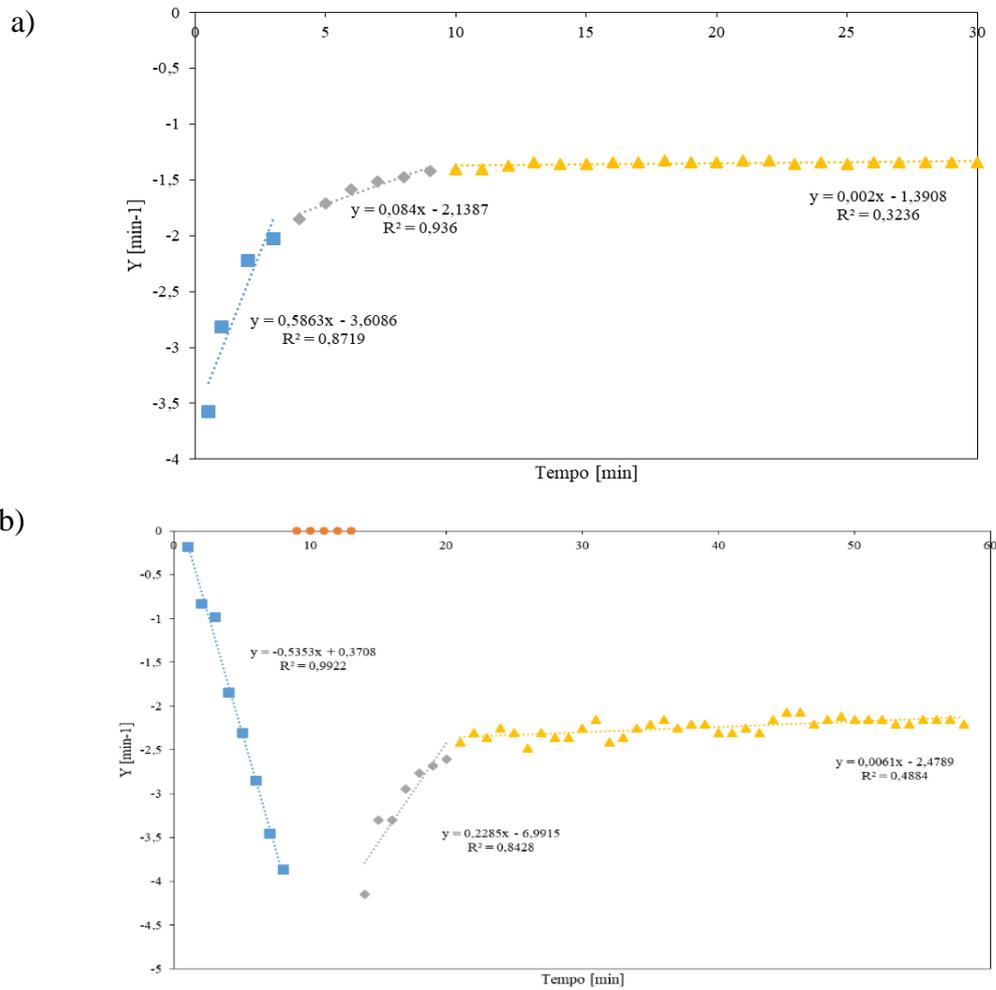


Figura E 1 Exemplo do cálculo dos K_{La} 's para os ensaios a) Adição de 10 mL de nanocápsulas desgaseificadas ao meio; b) Adição de 10 mL de nanocápsulas gaseificadas ao meio. (Legenda: ■ – K_{La}_1 ; ♦ - K_{La}_2 ; ▲ - K_{La}_3)

Anexo F - Ensaios de quantificação de ROS preliminares

1) Confirmação da necessidade da presença de O₂ para despoletar o processo.

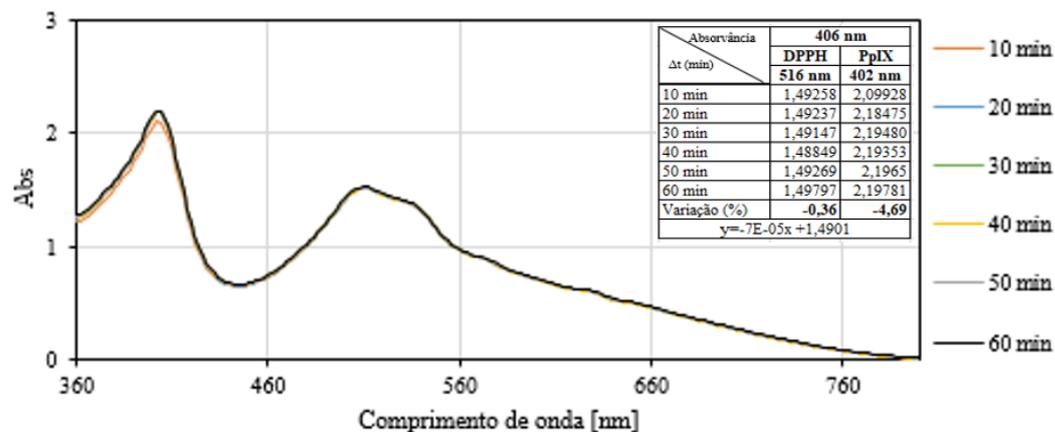


Figura F 1 Sobreposição dos perfis de absorção obtidos ao longo de 60 minutos para excitação da amostra com 406 nm.

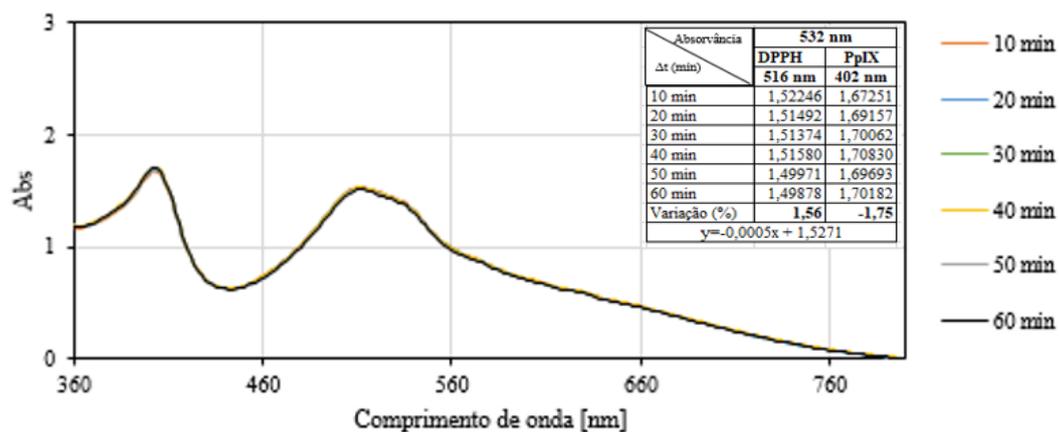


Figura F 2 Sobreposição dos perfis de absorção obtidos ao longo de 60 minutos para excitação da amostra com 532 nm.

2) Ensaio para 406 nm e 532 nm para amostra não desgaseificada

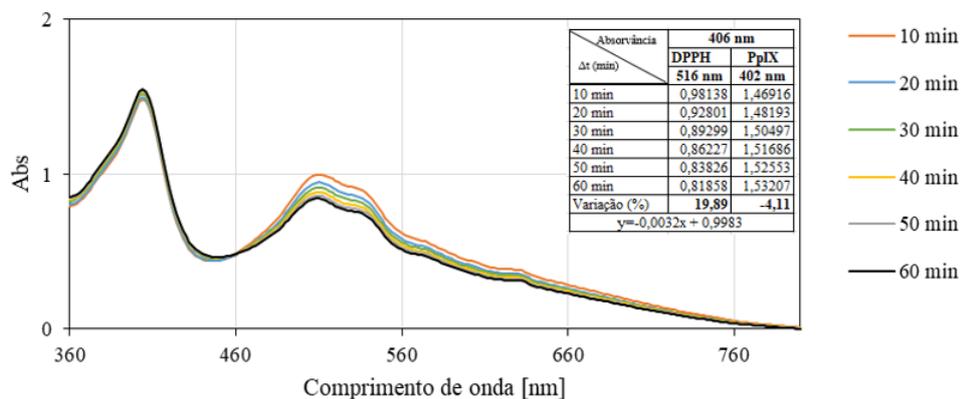


Figura F 3 Sobreposição dos perfis de absorção obtidos ao longo de 60 minutos para excitação da amostra com 406 nm.

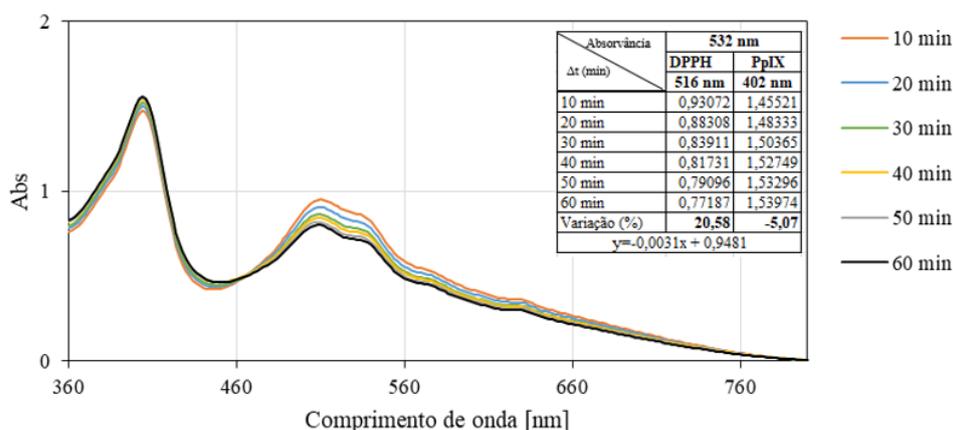


Figura F 4 Sobreposição dos perfis de absorção obtidos ao longo de 60 minutos para excitação da amostra com 532 nm.

3) Ensaios para água não desgaseificada sem irradiação e usando irradiação de 532 nm por 5, 10 e 20 minutos.

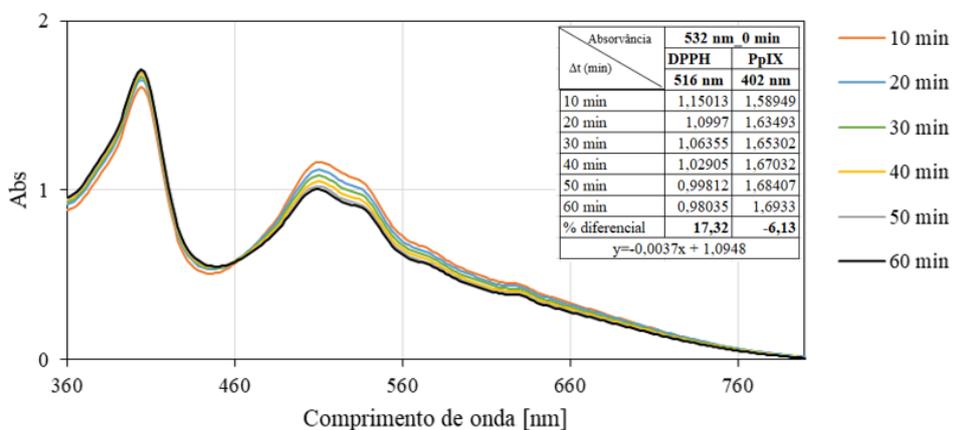


Figura F 5 Sobreposição dos perfis de absorção obtidos ao longo de 60 minutos amostra sem excitação prévia.

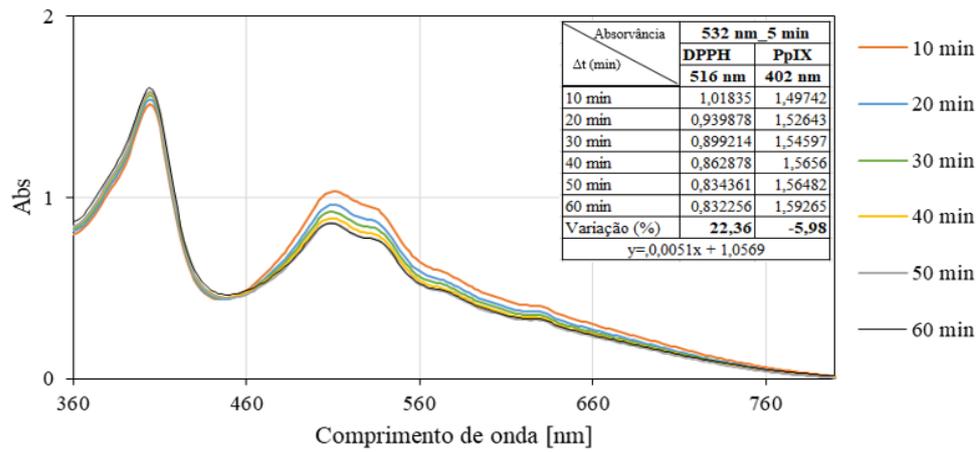


Figura F 6 Sobreposição dos perfis de absorção obtidos ao longo de 60 minutos para excitação da amostra por 5 minutos.

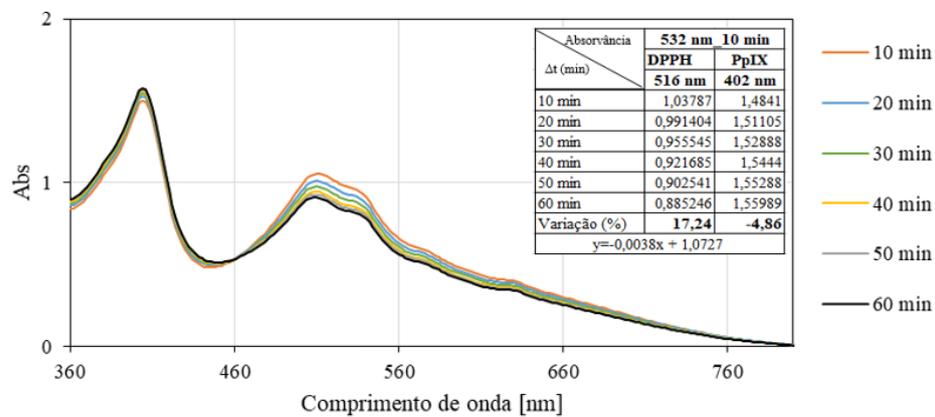


Figura F 7 Sobreposição dos perfis de absorção obtidos ao longo de 60 minutos para excitação da amostra por 10 minutos.

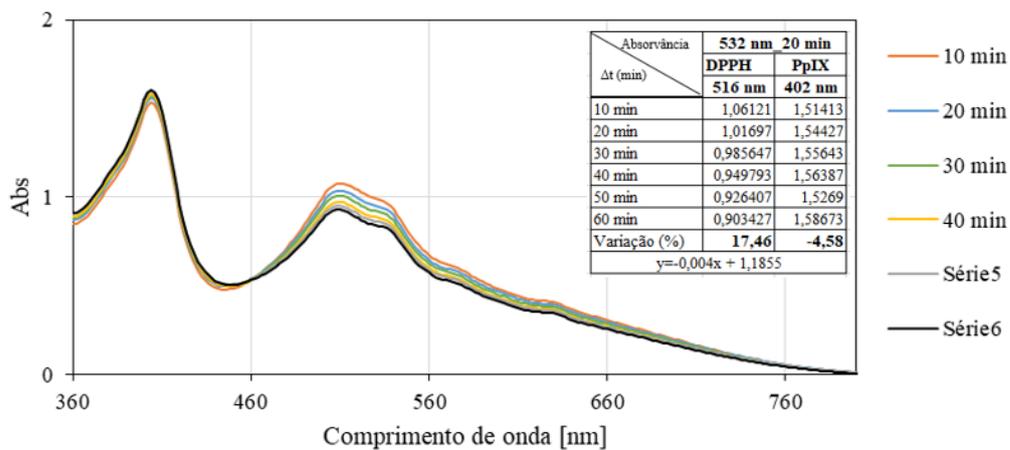


Figura F 8 Sobreposição dos perfis de emissão obtidos ao longo de 60 minutos para excitação da amostra por 20 minutos.