

*Est exemplar corresponde a rubrica final
da Tese de Mestrado submetida pela aluna Denise Maria
Zezell, aprovada pela comissão julgadora.*

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE FÍSICA "GLEB WATAGHIN"

27/04/87

HEMATOPORFIRINA E DERIVADOS:
PROPRIEDADES ÓPTICAS E TERAPIA FOTODINÂMICA DE CANCER

DENISE MARIA ZEZELL

Dissertação de mestrado, sob orientação
do Dr. Jorge Humberto Nicola, apresenta-
da ao Instituto de Física Gleb Wataghin
como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do título de Mestre em
Física

Trabalho parcialmente financiado pela FAPESP e pela UNICAMP.

Campinas, fevereiro de 1987.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Los meus queridos pais,
pelo carinho e por terem sempre
propiciado condições para que eu
pudesse chegar até aqui.

Ao Nicola,

pela amizade e pela dedicação na
orientação deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Francisco B.T. Pessine, pela atenção, por ter facilitado e auxiliado no uso de equipamentos do IQ, pelas informações e discussões, fundamentais para a realização deste trabalho.

A profa. Rosa O. Couto, pela paciência e por ajudar a tornar as informações obtidas mais claras.

Ao prof. Jorge Humberto Nicola, pela orientação deste e de todos os trabalhos, desde a época de iniciação científica e por ter me introduzido na área de Física Médica.

A profa. Ester M.D. Nicola, pelo incentivo, motivação e esclarecimento de termos médicos.

A Tina, pela amizade, companheirismo, e por deixar que a fizéssemos rir tanto.

Aos amigos Roger, Adriana e Márcio, pelos bons jantares.

Ao pessoal técnico e científico do GDAL, por auxiliarem sempre quando se fez necessário, em especial ao Palmeira. Aos amigos Paulo (pelo ventilador) e Marinalva, pela proeza na hora de cumprir as burocracias.

Ao pessoal da secretaria do departamento e da pós-graduação. A Inoz, Leno, Cidinha e Lori.

Ao pessoal do desenho e da gráfica, que me atenderam sempre, mesmo nos horários mais chatos.

Ao maninho Luiz, pelo relax das corridas e pela datilografia.

A todos aqueles que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

No presente trabalho desenvolvemos o estudo, sob o ponto de visto físico, da Terapia Fotodinâmica do Câncer (PDT), bem como de substâncias usadas em tal processo. A PDT é uma técnica de uso clínico no tratamento do câncer já consagrada em outros países e ainda não implantada no nosso, que consiste na destruição do tecido maligno via excitação óptica de moléculas de um derivado da hematoporfirina (HpD), previamente injetado no paciente. Na primeira parte de nosso trabalho apresentamos, além de uma revisão bibliográfica, um estudo que situa as fases do processo, separando-as sob o ponto de vista da química, biologia e física, o que inclui a preparação do composto, a ação metabólica do mesmo, bem como o efeito físico propriamente dito da fotorradiação. A parte final do trabalho está dedicada ao estudo das propriedades ópticas da hematoporfirina e de seus derivados, que por sua complexibilidade estrutural apresentam espectros de absorção, fluorescência e Raman, de difícil interpretação, podendo levar até mesmo a erros, como os encontrados na literatura.

ABSTRACT

In this work we present a study of Photodynamic Therapy of Cancer (PDT) from the physical point of view as well as the study of substances used in this process. PDT is a type of cancer treatment therapy successfully used in other countries, but unknown in our own country. It consists of the destruction of malignant tissues by optical excitation of the molecules of an hematoporphyrin derivative (HpD) previously injected in the patient. In the first part of this work we present a study with a bibliographical review that establishes the steps of the process, dividing them under the chemical, physical and biological point of view. This includes the compound preparation, its metabolic action and the physical effect of photoradiation. The last part of the work consists of the study of the optical properties of the hematoporphyrin and its derivatives which, due to their complex structures, show absorption, fluorescence and Raman spectra of difficult interpretation, leading to errors found in other publications.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	01
1- HISTÓRIA E INTRODUÇÃO A TERAPIA FOTODINÂMICA DE CANCER.....	02
2- MECANISMO DE AÇÃO FOTODINÂMICA DA HEMATOPORFIRINA E DO HpD...	09
3- PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO HpD.....	13
3.1 PREPARAÇÃO DO HpD.....	13
3.2 COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA DO HpD.....	15
4- TESTES E APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DA Hp E DERIVADOS.....	21
4.1 PRIMEIROS TESTES.....	21
4.2 TESTES BIOLÓGICOS "IN VITRO".....	23
4.3 TESTES BIOLÓGICOS "IN VIVO".....	26
4.4 USO CLÍNICO.....	31
5- PROPRIEDADES ÓPTICAS DA HEMATOPORFIRINA E DERIVADOS.....	35
5.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	37
5.2- ABSORÇÃO.....	39
5.3- FLUORESCÊNCIA.....	49
5.4- RAMAN E RAMAN RESSONANTE.....	62
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	77
APÊNDICE BIBLIOGRÁFICO.....	87

INTRODUÇÃO

A classe médica internacional tem voltado sua atenção nos últimos anos para uma nova terapia, alternativa, no tratamento do câncer, a chamada **TERAPIA DE CANCER POR FOTORRADIACÃO (PRT)**, ou preferivelmente **TERAPIA FOTODINÂMICA DE CANCER (PDT)** (evitando assim o uso do termo "radiação", frequentemente associado pelos pacientes à radiação ionizante) devido à sua eficiência em uma grande variedade de neoplasias malignas.

O processo baseia-se no fato de que tecidos malignos, por seu particular metabolismo, absorvem e/ou retém determinados corantes da família das porfirinas que tenham sido injetados no paciente via venosa. Através da excitação óptica ressonante estes corantes fluorescem, possibilitando a detecção e delimitação de tumores, e estimulam reações químicas, causando destruição tecidual bastante localizada. Vários corantes tem sido investigados (protoporfirina, ftalocianina, etc.), entretanto os mais utilizados nesta terapia tem sido a hematoporfirina e seus derivados.

A presente monografia tem como principal objetivo agrupar de maneira didática informações à respeito da Terapia Fotodinâmica de Câncer, e apresentar as propriedades ópticas registradas da hematoporfirina e de seus derivados, discutindo-as e comparando-as a alguns poucos dados existentes na literatura; contribuindo assim, para o acervo de dados existente e para a divulgação de tal terapia, ainda não implantada em nenhum centro médico do país.

CAPÍTULO I

1- HISTÓRIA E INTRODUÇÃO À TERAPIA FOTODINÂMICA DE CANCER

O uso da luz visível e ultra-violeta em terapia se divide em duas áreas: fototerapia, onde a luz é usada sozinha, e, fotoquimioterapia, na qual um fotossensibilizador apropriado é administrado no paciente antes do tratamento com luz. A fototerapia, na qual a luz é absorvida por moléculas endógenas, foi inicialmente desenvolvida e popularizada através do sucesso do uso de radiação ultravioleta do sol e de fontes artificiais no tratamento do "lupus vulgaris", um tipo de tuberculose endêmica, nos países da Escandinávia, no século passado, por Niels Finsen (prêmio Nobel 1903)(ref. 01). Em fotoquimioterapia é usado um sensibilizador exógeno que absorve os fótons envolvidos em uma determinada reação. Isto representa um conceito antigo, descrito cerca de 30 séculos atrás e usado na Índia, Egito e China no tratamento de vitiligo (refs.02 e 03). Embora o fenômeno tenha sido observado há tanto tempo, se atribui ao trabalho de Oscar Raab em 1898 (ref. 04) o início dos estudos de reações fotossensibilizadoras na atualidade. Ele verificou que baixas concentrações de acridina e outros corantes levavam rapidamente os protozoários paramécia à morte, quando iluminados com luz com comprimento de onda de absorção dos corantes. Desde então, uma série de estudos com diferentes corantes, especialmente da classe das porfirinas tem se realizado.

As porfirinas são uma classe de compostos químicos orgânicos que podem ser encontrados em animais e plantas. São de grande importância para sistemas biofísicos e bioquímicos complexos devido a

transformações químicas vitais que, em geral, são responsáveis nestes sistemas. Elas são componentes essenciais na hemoglobina, pois são responsáveis pelo transporte do oxigênio no sangue. Fazem também parte da clorofila, onde são responsáveis pela conversão de energia no processo da fotossíntese.

As porfirinas apresentam diferentes propriedades físicas e químicas que dependem dos detalhes estruturais da molécula particular. Todas porfirinas são intensamente coloridas e absorvem luz nas regiões da radiação visível e ultra-violeta do espectro. Algumas exibem luminescência, ressonância paramagnética, podem ser semicondutoras ou fotocondutoras. Algumas são catalizadoras ou fotossensibilizadoras.

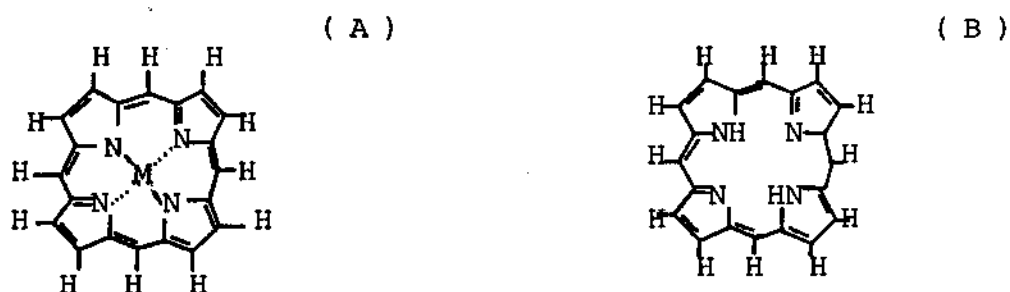


FIGURA 01- Estrutura química das duas formas de porfinas

(a)- Metaloporfina, com um íon metálico ligado a seu centro.

(b)- Porfina do base livre.

O composto mais simples das porfirinas e que constitui o núcleo de todas elas de uma maneira geral é a porfina. Esta molécula existe em duas configurações (fig. 01). Se um íon metálico está ligado ao centro do composto ele é dito metaloporfina, e se dois átomos de

hidrogênio estão ligados ao centro, o composto é chamado porfina de base livre. As diferentes classes de porfirinas são formadas quando os átomos de hidrogênio da periferia do núcleo base porfina são deslocados por um ou mais grupos moleculares. Estes grupos servem, em alguns casos, para ligar a porfirina a uma substância química inerte, como uma grande cadeia de proteína.

Quando o íon metálico na metaloporfirina é um ferro, a porfirina é chamada heme. A figura 02 mostra esquematicamente a estrutura da hemoglobina, composta por quatro cadeias de proteínas, cada uma ligada a uma metaloporfirina. As moléculas de oxigênio nos pulmões se ligam ao núcleo metálico que as libera nos capilares. Outras porfirinas heme, contendo proteínas são as mioglobinas, que armazenam oxigênio nos músculos, e os citocromos, enzimas cuja função celular envolve a produção de energia bioquímica de alimentos.

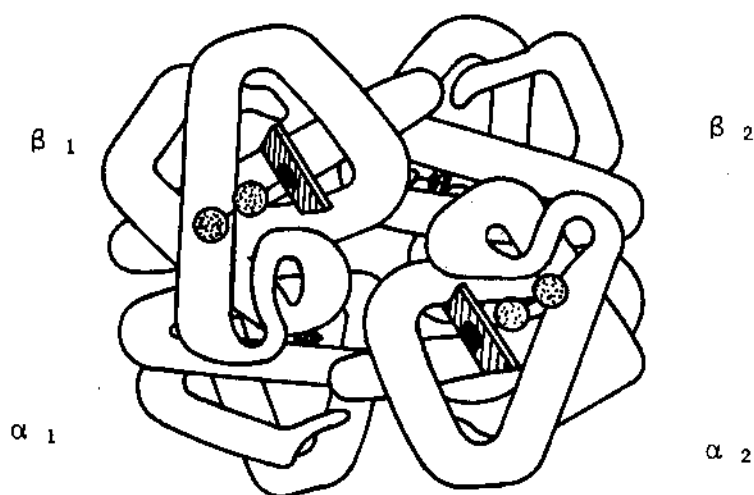


FIGURA 02- Estrutura esquemática da hemoglobina, consistindo de quatro cadeias de proteínas (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) e quatro estruturas planas heme, onde o oxigênio se liga.

O uso hoje bastante difundido de uma particular porfirina em tratamento de câncer, a hematoporfirina (retirada do sangue de coelhos e bois), teve início quando von Tappeiner (ref. 05) publicou um pequeno artigo sobre a descoberta de Oscar Raab (antes que este escrevesse um artigo detalhado) onde disse que o consumo de certos materiais fluorescentes poderia ter aplicações clínicas, predizendo assim as aplicações fotoquimioterapêuticas de sensibilizadores fotodinâmicos.

Em 1903, von Tappeiner e Jesionek (ref. 06) fizeram estudos usando eosina como corante e luz branca na sensibilização de câncer de pele e no tratamento de uma variedade de outras doenças de pele (herpes, "psoriasis vulgaris", etc.), quando introduziram o termo **ação fotodinâmica**. Em 1908 Hausmann (ref. 07 e 08), primeiro a usar hematoporfirina em estudos de ação fotodinâmica, registrou a destruição de paramécias e células vermelhas do sangue descrevendo os sintomas de sensibilidade em ratos quando expostos à luz. Em 1913 Meyer-Betz (ref. 09) sensibilizou a si próprio com hematoporfirina e registrou sintomas semelhantes que duraram aproximadamente dois meses.

Em 1924 Pollicard (ref. 10) demonstrou a existência de fluorescência avermelhada em certos tumores malignos de animais, atribuindo-a ao acúmulo de porfirinas endógenas em tais tumores, devido a uma infecção secundária por bactérias hemolíticas.

Assim, em 1942 Auler e Banzer (ref. 11) demonstraram que a hematoporfirina quando injetada sistematicamente em cobaias, tendia a acumular-se no tecido maligno existente e nos nódulos linfáticos. Observaram um aumento na necrose dos tumores e em apenas um animal uma pequena fluorescência vermelha do tecido tumoral, quando exposto à luz

de uma lâmpada ultravioleta. Este grupo estava iniciando estudos semelhantes em humanos, mas seu trabalho foi interrompido pela guerra. Em 1948 Figge e colaboradores (ref. 12) demonstraram que a fluorescência vermelha da hematoporfirina acumulada podia ser utilizada na visualização e delimitação de tecidos neoplásicos malignos.

Os trabalhos de Auler, Banzer e Figge despertaram o interesse da clínica médica como um método físico de diagnóstico não invasivo de certos tipos de câncer. Desta forma, vários estudos em animais e humanos foram realizados, o logo se verificou que a técnica empregada deveria ser refinada, pois apresentava considerável variação nos resultados, além de que requeria grande quantidade de hematoporfirina, aumentando o perigo da fotossensibilidade e, ao mesmo tempo, diminuía a especificidade. Em 1955, Schwartz e colaboradores (ref.13) encontraram que a hematoporfirina usada nestes experimentos era na realidade uma mistura bruta de muitas porfirinas, e que os chamados componentes impuros eram melhores nas propriedades de localização do que a própria hematoporfirina pura.

Desta forma, em 1960, Lipson e colaboradores (ref.14) tentaram usar técnicas mais refinadas na obtenção do composto, de maneira a conseguir resultados mais reprodutíveis e confiáveis, mesmo com diferentes remessas do composto. Assim, este grupo decidiu utilizar um derivado de hematoporfirina, obtido mediante um tratamento com ácido acético-sulfúrico, resultando no HpA, seguido de hidrólise em meio básico, da hematoporfirina comercial, chamado de derivado de hematoporfirina, HpD. Esta mistura se mostrou superior à hematoporfirina em suas propriedades de localização de tumores malignos.

Em 1966 Lipson, Gray e Baldes (ref.15) registraram o

primeiro uso do HpD no tratamento do câncer. Enquanto seus propósitos iniciais visavam a detecção de tumores, Lipson percebeu o potencial para destruição seletiva de tumores contendo HpD, fazendo uso de suas propriedades fotodinâmicas.

Em 1968 Gregorie e colaboradores (ref.16) mostraram a aplicabilidade clínica da ativação da fluorescência em tumores com HpD e luz azul-violeta. Em 1972 Diamond e colaboradores (ref.17) examinaram Hp comercial ativado por luz branca em cultura de células malignas e células do mesmo tipo transplantadas em ratos. Este estudo observou a morte das células em cultura e considerável destruição do tumor na pele dos ratos. Em 1973 Dougherty e seu grupo (refs. 18) demonstraram que a fluorescência ativada por luz com comprimento de onda $\lambda = 488\text{nm}$ reduzia a taxa de crescimento de células de tumor maligno transplantadas em camundongos.

Para um fotossensibilizador ser usado clinicamente para o tratamento do câncer, deve ser:

- não tóxico em doses clinicamente úteis.
- seletivamente retido o/ou acumulado em tecidos malignos.
- ativado por luz penetrante ($600 < \lambda < 700\text{ nm}$), e apresentar elevado rendimento quântico.

Em 1975 Dougherty e seu grupo (ref. 19) registrou que o HpD sistematicamente aplicado e ativado por luz vermelha de uma lâmpada de xenônio, poderia causar completa erradicação de tumores malignos transplantados em camundongos, sem dano excessivo na pele circundante, também incluída no campo de luz. Em 1976 Weishaupt (ref.20), do mesmo grupo, identificou a produção de oxigênio no estado singlete como provável agente citotóxico nos tumores malignos, quando da ativa-

ção do HpD incorporado às células carcinogênicas, com luz vermelha. Concluídos os estudos pré-clínicos e toxicológicos, este grupo iniciou testes clínicos em pacientes terminais e hoje inclui a Terapia Fotodinâmica de Câncer, PDT, ou Terapia de Câncer por Fotorradiação (PRT) como terapia usual no tratamento de diferentes tipos de câncer.

Especialmente desde 1980 numerosos estudos envolvendo esta terapia utilizando o HpD, aplicado a uma enorme variedade de tumores tem sido realizados e registrados.

CAPÍTULO II

2-MECANISMO DE AÇÃO FOTODINÂMICA DA HEMATOPORFIRINA E DO SEU DERIVADO

Muitos tipos de moléculas podem agir como fotossensibilizadores, incluindo as de ocorrência natural (entre elas as porfirinas), as sintéticas derivadas de compostos orgânicos, e algumas substâncias inorgânicas. Em geral, estes sensibilizadores são excitados a um estado singleto pela absorção de um fóton, decaindo para um estado excitado tripleto, proporcionando assim danos fotobiológicos. A reação subsequente pode se processar por uma variedade de caminhos, dependendo da natureza química do fotossensibilizador, da molécula substrato, bem como das condições de reação. Em alguns destes processos, o sensibilizador, ativado pela ação de luz, recebe um elétron do substrato para dar radicais livres, que reagem fornecendo produtos foto-oxidados na molécula e o fotossensibilizador regenerado. Alguns sensibilizadores no estado excitado tripleto transferem a energia de excitação para o estado fundamental do oxigênio molecular, gerando oxigênio no estado singleto e o sensibilizador no estado fundamental. O oxigênio singleto por sua vez, pode reagir com muitos tipos de biomoléculas não suscetíveis a ele no estado fundamental. Em muitos processos fotossensibilizadores, outras espécies reativas, como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido ou radical hidroxila são produzidos e podem alterar as biomoléculas. Finalmente em alguns poucos casos o fotossensibilizador excitado é convertido em um fotoproduto tóxico. A maioria das reações fotossensibilizadoras requer oxigênio molecular, e o consome em quantidades estequiométricas, ou seja, estas reações re-

presentam processos sensibilizadores de foto-oxidação, como no caso que ocorre com o derivado da hematoporfirina, o HpD.

Wolshaupt (ref.20) identificou o oxigênio singlete como sendo o agente citotóxico, e propôs que o tratamento fotodinâmico poderia ser sumarizado em duas etapas: na primeira, o tecido maligno é iluminado com radiação azul ($\lambda \approx 470$ nm), excitando as moléculas do HpD por ele absorvido, do estado fundamental S_0 para um certo estado excitado singlete S_n , onde se observa a fluorescência do tecido no vermelho ($\lambda \approx 600$ nm) quando ocorre o decaimento, possibilitando a detecção e delimitação do neoplasma. Na segunda etapa, o tecido é iluminado com radiação vermelha ($\lambda \approx 620$ nm), com o conjunto laser de Argônio-laser do corante, que excita as moléculas do HpD ao estado excitado S_1 , a partir do qual são levadas mediante cruzamento intersistemas ao estado excitado T_1 , que devido a seu maior tempo de vida, é o responsável direto pelo efeito fotodinâmico. Uma vez em T_1 , as moléculas poderão transferir a energia de excitação às do oxigênio 3O_2 ($^3\Sigma_g^-$), produzindo-as no estado excitado singlete 1O_2 ($^1\Delta_g$) ou a componente intracelulares essenciais, resultando na morte celular.

A figura 03 apresenta um diagrama esquemático do processo, e a figura 04 mostra um sumário da terapia fotodinâmica do câncer.

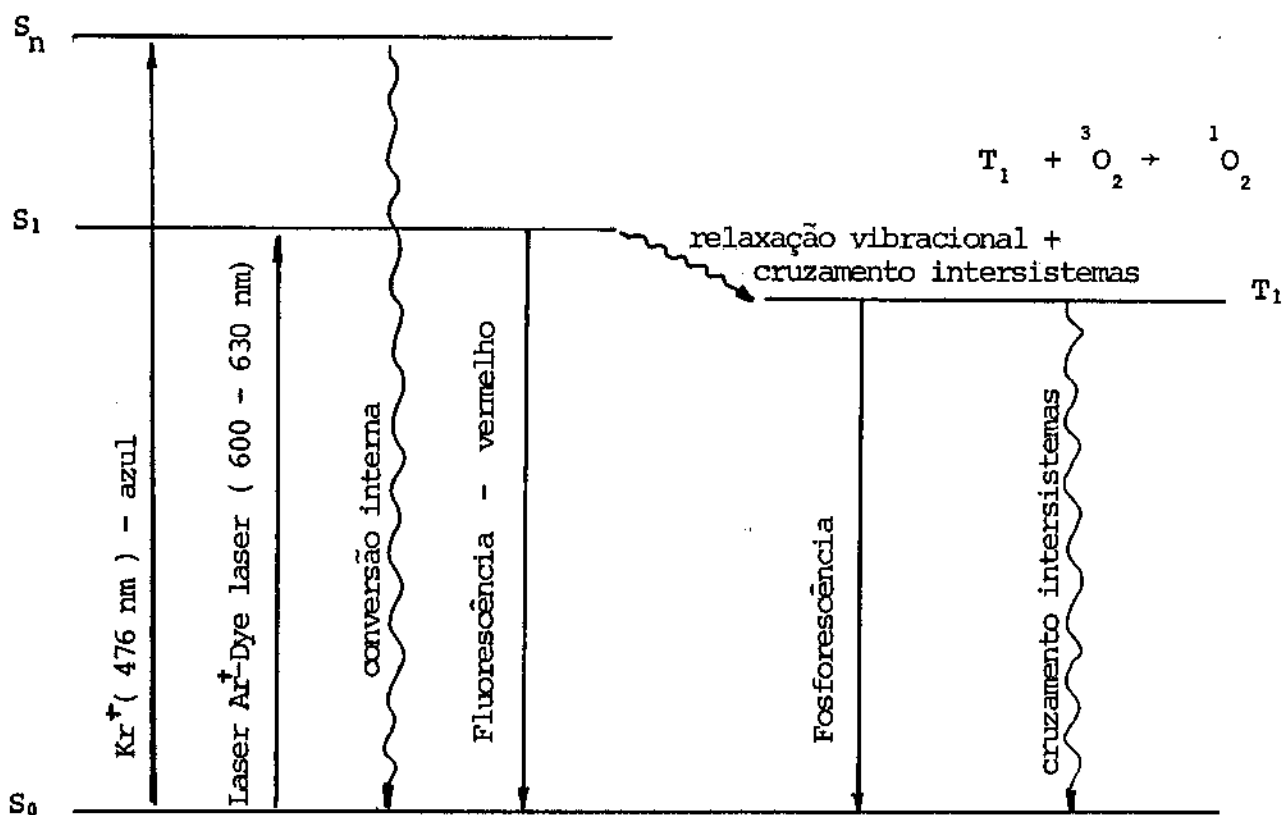


FIGURA 03- Diagrama esquemático dos níveis de energia do HpD, no processo de Terapia Fotodinâmica de Câncer.

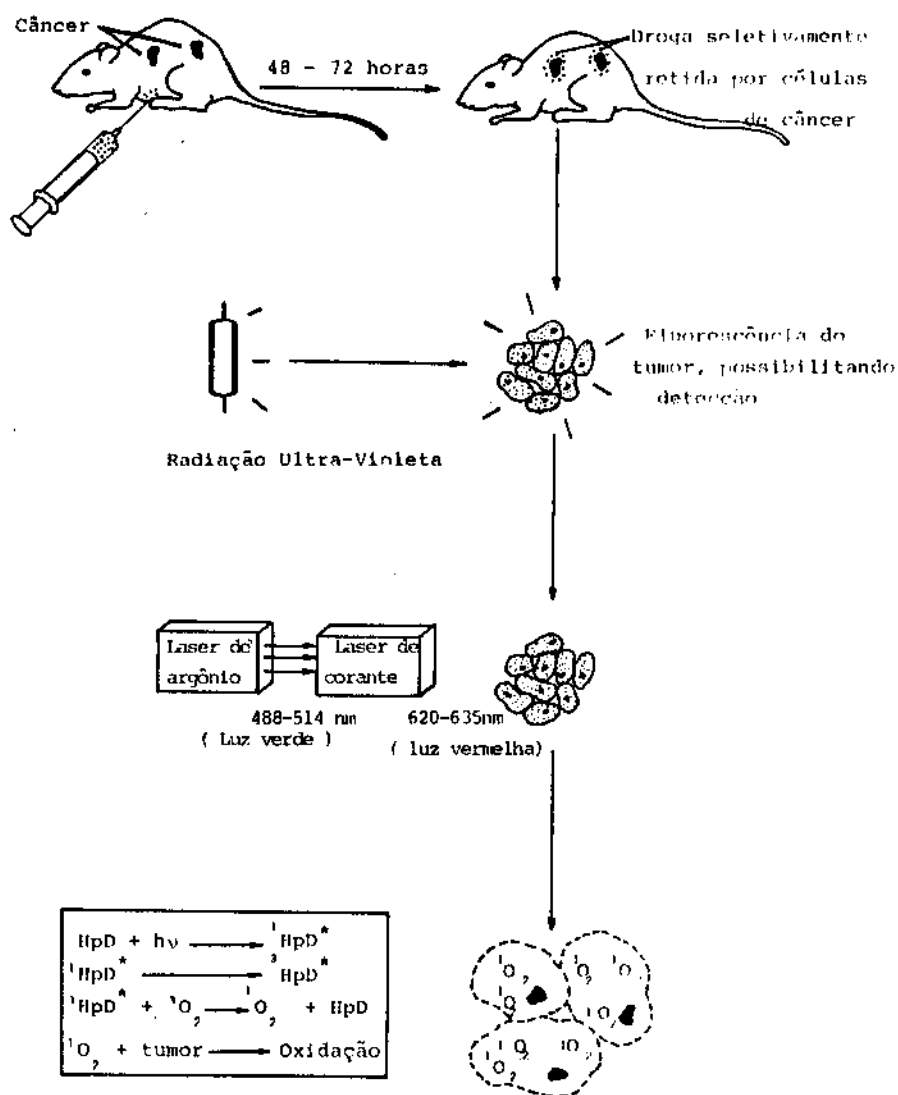


FIGURA 04- Sumário da Terapia Fotodinâmica do Câncer. ${}^1\text{HpD}^*$ = derivado de Hp no estado singleto. ${}^3\text{HpD}^*$ = derivado de Hp no estado triplete. ${}^3\text{O}_2$ = oxigênio molecular no estado triplete. ${}^1\text{O}_2$ = oxigênio molecular no estado excitado singleto.

CAPÍTULO III

3- PREPARAÇÃO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO HpD

A aquisição do hematoporfirina o principalmente do HpD é bastante dificultada uma vez que envolve importação e, no caso do HpD, a comercialização é restrita a determinados centros de saúde e pesquisa.

O método de preparação do HpD inicialmente estabelecido por Lipson (ref. 14), foi sistematizado, repetido e descrito por Dougherty (ref. 23). Nota-se na literatura especializada uma grande dificuldade em obter partidas igualmente eficientes "in vivo" do HpD. Uma vez que diferentes métodos de preparação levam a produtos finais diferentes, esta dificuldade, grosseiramente, pode ser atribuída à existência de alguns passos críticos na preparação, descritos de forma vaga na metodologia divulgada por Dougherty.

Desta forma, se fez necessário que tomássemos conhecimento de algumas técnicas químicas que permitissem a preparação de nossa própria amostra de HpD para estudo, como descreveremos a seguir.

3.1- PREPARAÇÃO DO HpD

O método de preparação seguido consiste na dissolução, por agitação, de 1g de Hp.2HCl (Hematoporphyrin Dihydrochloride- Sigma Chemical Co.) em uma mistura de 19ml de ácido acético glacial, P.A. (

CH_3COOH - Merck) o 1ml do ácido sulfúrico concentrado suprapur, P.A. (H_2SO_4 - Merck ou Carlo Erba) durante aproximadamente 20 minutos. Esta solução permanece em repouso 24hs no escuro e à temperatura de 20°C , a seguir é filtrada em papel de filtro Whatmann nº 1, cerca de 30 minutos. Com a adição de cerca de 15 litros de solução aquosa (3-5)% de acetato de sódio, P.A. ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - Merck) à solução inicialmente filtrada, estabelece-se pH=6,0 para que haja precipitação máxima de sólido.

O material precipitado é recolhido mediante filtração por gravidade (aproximadamente 48 horas) em papel de filtro Whatmann nº 1 e extensivamente lavado com água bidestilada. Os papéis de filtro com o sólido são colocados em um dessecador com sílica gel, onde é feito vácuo ($1 \cdot 10^{-2}$ torr) por cerca de 1 hora. O sólido recolhido pela raspagem dos papéis de filtro é o HpA (0,45g) e deve ser guardado em frasco escuro à temperatura de -20°C , até que se queira preparar a solução injetável, chamada de HpD.

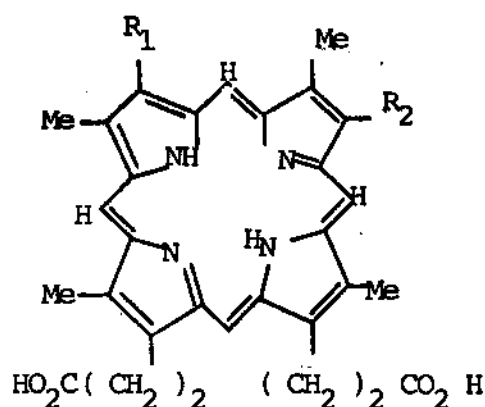
A solução injetável é obtida dissolvendo-se a proporção de 1g de HpA para 50ml de solução de hidróxido de sódio, P.A. (NaOH -Merck) 0,1N. A solução é agitada por cerca de 1 hora à temperatura de 20°C e neutralizada a pH=7,1 com a adição de solução de ácido clorídrico, P.A. (HCl - Merck) 0,1N e ajustada a um volume total de 200ml com solução de cloreto de sódio, P.A. (NaCl -Merck) 0,9%. O NaCl é adicionado para tornar a solução isotônica. A solução é esterelizada por filtração em membrana # 20 μm (Millipore Co.). Esta solução é estável quando guardada no escuro, em freezer, à -20°C por cerca de (3-6) meses (ref. 24 e 25).

3.2- COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA QUÍMICA DO HpD

Uma vez que diferentes porfirinas têm diferentes propriedades fotossensibilizadoras, é de considerável interesse separar os componentes do HpD para identificá-los quimicamente e conhecer suas propriedades físicas, possibilitando assim a determinação de suas propriedades individuais como localizadores e fotossensibilizadores de tumores.

Com o auxílio de uma técnica cromatográfica simples, a cromatografia de camada delgada, também chamada de cromatografia de placas (TLC), que consiste na separação dos componentes individuais de uma mistura através do transporte do composto em solução (soluto) por um fluxo de solvente líquido (eluyente) que o arrasta através do meio (placa com camada de sílica gel) até que seja separado de outros solutos que tenham sido arrastados com velocidades diferentes; foram identificados os 3 principais componentes do HpA : hematoporfirina pura, monoacetato de hematoporfirina e diacetato de hematoporfirina (cerca de 50%) e registrada a presença de impurezas de estruturas desconhecidas (refs. 26, 23, 27, 28, 29).

É interessante notar que o tratamento alcalino do HpA resulta em hidrólise total dos acetatos e que estes são sempre instáveis em soluções aquosas neutras. Tal fato leva a concluir que nem monoacetato nem o diacetato de hematoporfirina são importantes para as propriedades de localização e fotossensibilização de tumores do HpD.



Nº	COMPONENTES	R1	R2	ISÔMEROS?
01	hematoporfirina	CHOHMe	CHOHMe	
02	protoporfirina	CH=CH ₂	CH=CH ₂	
03	monoacetato Hp	CHOHMe	CHOAcMe	sim
04	diacetato Hp	CHOAcMe	CHOAcMe	
05	HVD	CHOHMe	CH=CH ₂	sim
06		CHOHMe	CHOEtMe	sim
07		CHOAcMe	CH=CH ₂	sim
08		CHOEtMe	CHOAcMe	sim
09		CHOHMe	Ac	sim
10		CHOAcMe	Ac	sim
11		CHOEtMe	CH=CH ₂	sim
12		CHOEtMe	CHOEtMe	
13		Ac	Ac	
14	do HpA o do HpD	?	?	

TABELA 01-Abreviações: Ac= CH₃COO- , Me= CH₃- , Et= CH₃CH₂- , HVD= hidroxietilviniliduteroporfirina.

(tabela formulada à partir dos dados das referências 30 e 36).

Diversos grupos de trabalho (refs. 30, 31, 26, 32, 27, 33, 34 e 35) fizeram uso de uma técnica química mais sofisticada para o estudo de HpD; a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC); e com o auxílio do uso de grupos acetato radioativos [^{14}C] na preparação do derivado, e NMR [^1H], identificaram algumas porfirinas conhecidas como componentes do HpD e observaram a presença de uma porfirimina de estrutura até então desconhecida, que se mostrou ser o material primariamente responsável pela atividade fotossensibilizadora da mistura HpD, "in vitro" e "in vivo" (ref. 36).

A figura 05 mostra os diferentes tipos de porfirinas encontradas na separação do HpA por HPLC (vide numeração e estruturas na tabela anterior) e a figura 06 mostra uma comparação dos cromatogramas da protoporfirina (PP), do hidroxietilvinilduteroporfirina (HVD) e do HpD.

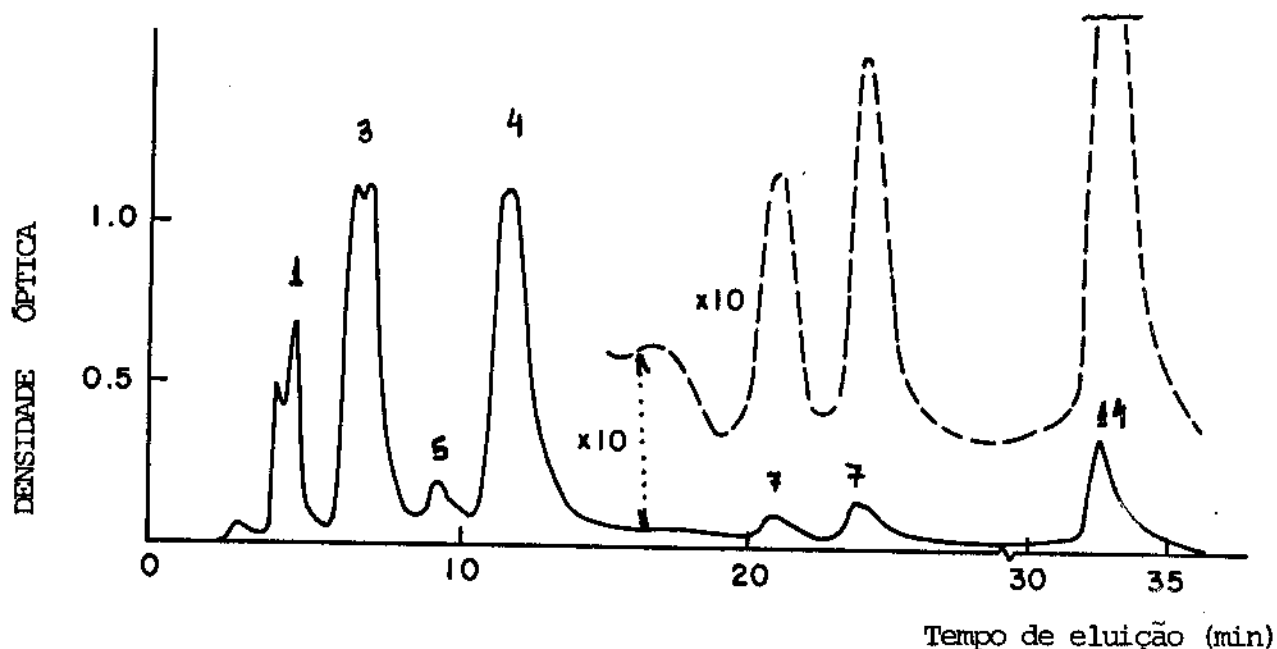


FIGURA 05- Cromatograma do HpA. (ref. 35)

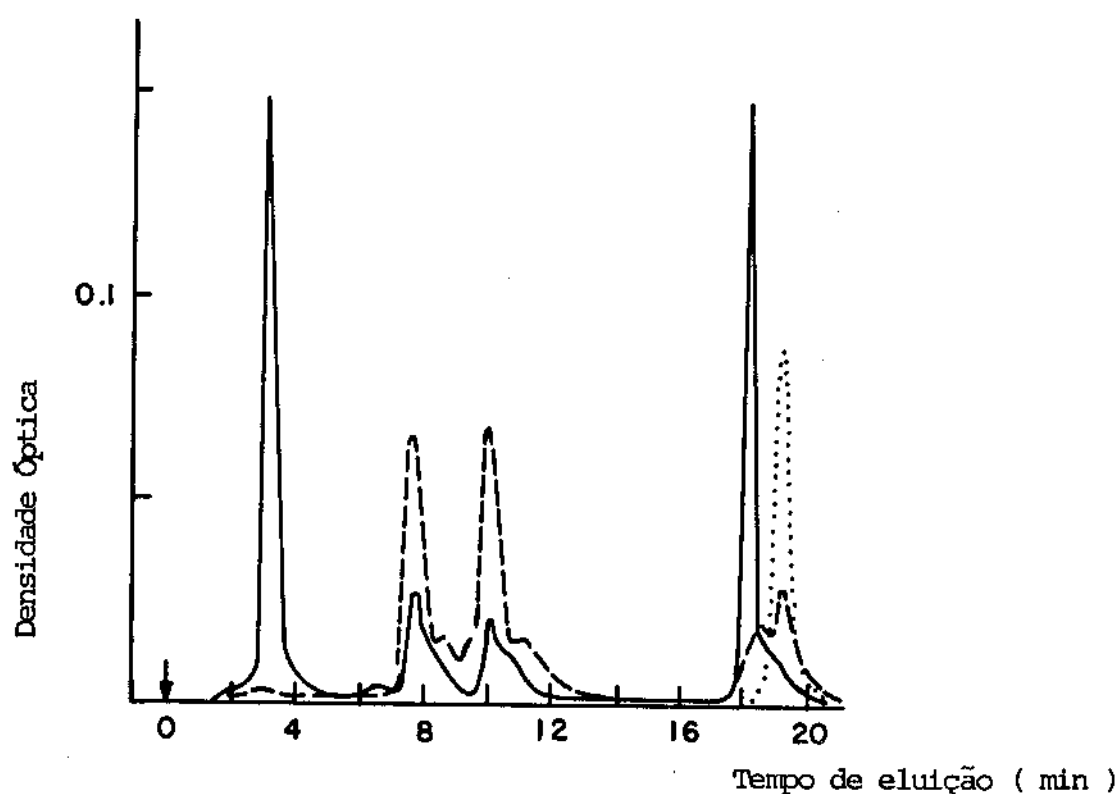


FIGURA 06- Cromatograma da protoporfirina (...), do hidroxietilvinil-deuteroporfirina (---) e do HpD (—).(ref. 35).

Da tabela 01 observamos que o componente nº 14 não havia sido identificado, entretanto, posteriormente Dougherty e colaboradores (ref. 37) isolaram esta substância do HpD com o uso de uma coluna de filtração em gel e de HPLC e puderam identificá-la com o auxílio de NMR [^1H] e espectrometria de massa por bombardeamento de átomos rápidos (FAB) como sendo o chamado dihomatoporfirina óxido, DHE, que é possível em 3 estruturas isoméricas (fig. 07). Verificaram que a fração 14 não se trata de uma fração pura, mas aparece com cerca de 10-20% de impurezas, sendo seu principal contaminante o HVD.

D H E

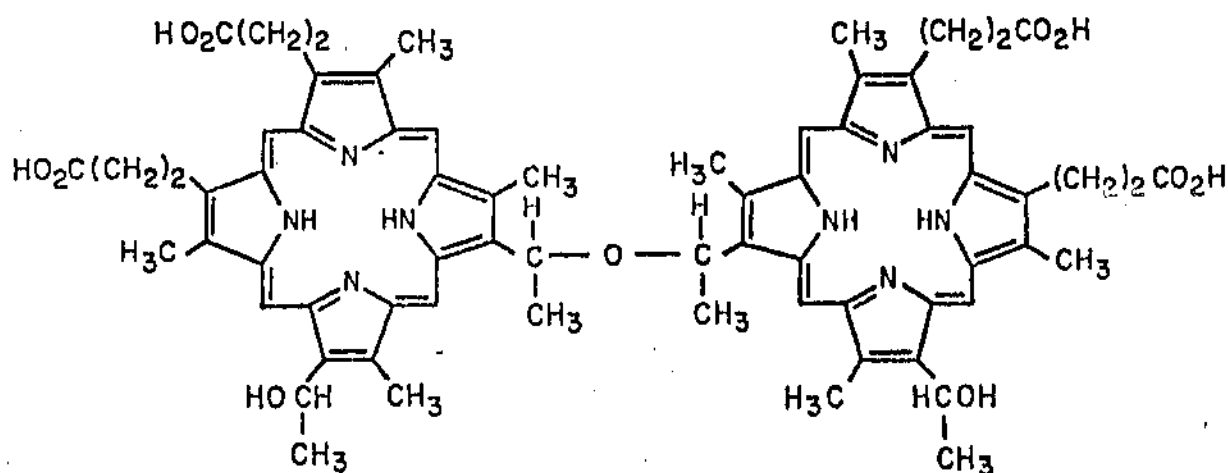


FIGURA 07- Estrutura química do componente fotoativo do HpD, O DHE.

Os três isômeros são: bis-1-[3-(1-hidroxietil)-deuteroporfirina-8-il] etil éter, bis-1-(8-(1-hidroxietil)-deuteroporfirina-3-il] etil éter e 1-[3-(1-hidroxietil)-deuteroporfirina-8-il]-1'-[8-(1-hidroxietil)-deuteroporfirina-3-il] etil éter.

Apesar de numerosos estudos no sentido de identificar todos os componentes da mistura HpD, ainda há uma quantidade de impurezas, pequena em porcentagem, mas não identificadas. Acredita-se hoje que os componentes desta mistura ultrapassem de 100 porfirinas. Com base no fato de que não é possível se manter o DHE na forma pura e de ainda não ter sido possível a identificação da totalidade dos componentes do HpD, a FDA ("Food and Drug Administration") órgão americano responsável neste país pela autorização do uso de medicamentos, que havia permitido a utilização do HpD e DHE (comercialmente conhecidos como Photofrin I e Photofrin II respectivamente) em determinados centros de pesquisa por 2 anos, vetou em meados de março de 1986 o uso clínico e comercialização destes produtos até que se completem as lacunas de identificação química e posterior teste biológico de cada um dos componentes separadamente (ref.38).

A hematoporfirina na sua forma comercial contém uma pequena parcela de impurezas (cerca de 2%)(ref. 32) e por mais sofisticadas que sejam as técnicas utilizadas em sua purificação, pouco se consegue reduzi-las. Entretanto, por se conhecer os resultados de seu uso clínico e por ser encontrado próximo de sua forma pura, o Hp tem seu uso clínico autorizado pelo FDA (ref. 38).

CAPÍTULO IV

4-TESTES E APLICAÇÕES DA HEMATOPORFIRINAS E DERIVADOS

4.1- PRIMEIROS TESTES

Os primeiros testes biológicos de toxicidade de Hp e HpD em cobaias foram realizados por Lipson e colaboradores (ref. 14) quando estabeleceu a metodologia de preparação do composto. Nestes testes seu grupo determinou a dose letal dos compostos em relação ao peso, o intervalo entre a injeção e a exposição à luz, e a duração destas exposições. Verificou que as cobaias apresentavam eritema nas orelhas, edema facial, irritação e queimadura na pele quando eram expostas à luz branca em um período de até 48hs depois da injeção intraperitoneal dos compostos e a doses maiores que 15mg/kg de massa corporal destas cobaias. Não foi verificado nenhum efeito depois de 72hs da aplicação e quando os compostos eram injetados intravenosamente os efeitos na pele eram observados mais rapidamente. Este grupo tentou inibir os efeitos tóxicos da ação fotodinâmica dos compostos com várias drogas (adrenalina, protoporfirina, etc.) e nenhuma delas diminuiu ou modificou estes efeitos. A comparação entre os efeitos do Hp e HpD resultou na observação do derivado ter duas vezes mais ação fotodinâmica mas ser também duas vezes mais tóxico.

Continuaram os experimentos e (ref. 39) testaram as propriedades de localização e do HpD em 4 tipos de tumores transplantados em ratos (rabdiosarcoma, adenocarcinoma mamário, carcinoma de Walker

256 e de Flex-Jobling) verificando que os tumores podiam ser detectados e localizados com o uso de HpD já depois de 24hs da transplantação (mesmo em agregados microscópicos de células malignas) e continuar a fluorescer com a incidência de luz até que se tornassem necróticos. Observaram que a fluorencência de tumores benignos em relação aos malignos era muito pequena, mas existente.

Em 1966 Lipson e colaboradores (ref. 15) foram os primeiros a testar o uso de HpD para detecção e localização de tumores em pacientes recorrentes (lesões do esôfago, tumor do seio e neoplasia maligna de vagina). A única ressalva apresentada foi que pacientes que não seguiram a recomendação de não exposição direta à luz do sol durante 4 dias depois da injeção, sofreram queimaduras de pele comparáveis às do excesso do sol em condições normais. Nestes estudos se notou o potencial para destruição seletiva de tumores por HpD, quando fez múltiplas injeções do composto, seguidas de exposição local de luz filtrada de lâmpada de xenônio (não especificou o espectro) em uma paciente com grande ulceração do tumor mamário recorrente. Embora a lesão permanecesse várias semanas de repetido tratamento, uma objetiva evidência de resposta foi verificada.

4.2- TESTES "IN VITRO"

Diversos grupos de trabalho têm estudado os efeitos da Hp e derivados em cultura de células e muitas vezes os resultados positivos obtidos "in vivo" não são observados em testes "in vitro".

Em estudos iniciais com células embrionofibroblásticas de rato (ref. 40 e 41) foi verificado que a absorção de HpD e a resultante fotossensibilização são geralmente similares em células normais e malignas "in vitro". Entretanto, o estudo realizado com células derivadas do carcinoma "in situ" (NH1K 3025) quando tratadas com HpD em cultura e expostas à luz, mostrou um aumento na permeabilidade da membrana (ref. 42) e danos na mitocôndria (devido à sua alta afinidade com porfirinas, ref. 43). Estudos mais recentes com esta mesma linhagem de células (ref. 44) mostraram que as células transformadas (tumoraes) têm (25-50)% mais habilidade para reter HpD do que células não transformadas (normais); também verificaram que o tratamento causava inativação de 85% das células e que as células sobreviventes se multiplicavam a uma taxa menor que as células do controle.

O estudo da absorção e eficiência de fotossensibilização de alguns componentes do HpD "in vitro" (ref. 45): hematoporfirina, hidroxi-etilvinil-deuteroporfirina e dihematoporfirina éter (números 1, 5 e 14 da tabela 01 do capítulo anterior), verificou a maior eficácia do componente 14, como pode ser verificado pela tabela 02 abaixo.

POLARIDADE	COMPONENTE	ABSORÇÃO RELATIVA	EFICIÊNCIA de FOTOSSENSIBILIZAÇÃO
↑	Hp	0,05	0,07
	HVD *	0,24	0,30
	HVD *	0,38	0,44
	DHE	1,00	1,00
			↓

TABELA 02- Absorção celular relativa dos componentes do HpD em células NHIK 3025 depois de 1h de incubação à 37°C. A eficiência relativa na sensibilização de células para fotoinativação é a medida do inverso do valor de tempo de exposição à luz necessário para inativar 90% das células ($330\text{nm} < \lambda < 410\text{nm}$, 10W/m^2). * = dois isômeros do HVD.

A eficiência de fotoinativação de células (ref. 16) diminui com a diminuição da concentração de oxigênio na atmosfera da cultura. Com 1% de O_2 na atmosfera da cultura a fotoinativação é reduzida a 50%, e quando o meio em cultura está sob atmosfera de N_2 puro, nenhum efeito é observado. A dependência da concentração de oxigênio e fotoinativação em tumores transplantados em cobaias também foi verificada, uma vez que há dificuldade em inativar regiões anóxicas do tumor, sendo provável que a inativação ocorra devido ao mau funcionamento do sistema circulatório do tumor causado pela fototerapia.

Um estudo da viabilidade e fluorescência de células de Sarcoma S-180 (refs. 17 e 18) tratadas com alguns componentes do HpD separados por HPLC, seguido de fotossensibilização com luz (tabela 03)

verifica uma associação de porfirinas com componentes celulares de constante dielétrica muito baixas (ligação com lipídeos da membrana e posterior associação a componentes intracelulares menos hidrofóbicos).

COMPONENTE	FLUORESCÊNCIA	ABSORÇÃO CELULAR	VIABILIDADE %
HpD	100	140	20
DHE	105	217	10
Hp, HVD, PP	205	160	17
Hp purificada	5	7	100

TABELA 03- Células de sarcoma S-180 tratadas com 10 µg/ml de HpD por 16hs a 30°C, com excitação em $\lambda = 400\text{nm}$ para determinação da fluorescência e irradiadas com luz em $590\text{nm} < \lambda < 640\text{nm}$, com 10W/m^2 por 10min. Os valores de fluorescência estão normalizados com a das células tratadas com HpD. Os valores de absorção estão expressos em µg de porfirina/g de célula. A viabilidade é relativa às células de controle.

Embora os maiores efeitos da PDT em tumores ocorram na sua vasculatura interna e circundante (congestão de células vermelhas e alguma enucleação de células adjacentes aos vasos e posterior extravazamento destas células com a destruição das células do tumor (ref. 27), o que obviamente não pode ser verificado pelo estudo "in vitro", estes estudos fornecem a importante informação de que os danos nas membranas são regra central do tratamento fotodinâmico (ref. 49- 51).

4.3- TESTES "IN VIVO"

Os testes "in vivo" fornecem informações muito importantes sobre os processos envolvidos na PDT, uma vez que se aproximam do fato das condições encontradas em "anima nobili". Estes testes possibilitam a determinação dos parâmetros envolvidos na terapia : tipos de tumor que apresentam resposta ao tratamento, dimensão destes tumores, dosagem necessária das soluções de Hp ou derivados a serem injetadas, intervalo de tempo entre aplicação e exposição à luz, comprimento de onda e potência mais adequados, o, sobre a necessidade ou não de repetição da terapia.

Os estudos iniciais "in vivo" mostraram apenas que a fluorescência ativada com $\lambda = 488\text{nm}$ reduzia a taxa de crescimento de carcinoma de células escamosas (ref. 28) e de células de tumor mamário transplantadas em ratos (ref. 18) e era de um vermelho intenso na região central do tumor, enquanto o tecido normal adjacente apresentava uma leve fluorescência rósea.

Testes mais abrangentes começaram a ser realizados numa tentativa de determinar a resposta à PDT de vários tipos de tumor em função do seu tamanho e localização (ref. 52). Verificaram que massas tumorais de até 8-10 cm podiam ser eficientemente tratadas, já massas tumorais maiores requeriam dosagem dobrada de HpD e tratamento prolongado (até um ano), conforme a tabela 04 a seguir.

TIPO DE TUMOR	LOCALIZAÇÃO	TAMANHO (cm)	DOSE (J)/ INSERÇÃO	RESPOSTA DO TUMOR	EFEITO NO TECIDO NORMAL	TEMPO *
Osteosarcoma	Mandíbula	2,5x2,5	360 (2)	Completa	Nenhum	34 meses
Osteosarcoma		3,0x3,5	360 (3)	Parcial	Nenhum	1 mês
		2,0x1,5	720 (3)	Completa	Nenhum	12 meses
Osteosarcoma	Fíbula	7,5x6,5x3,5	300 (5)	Nenhuma	Nenhum	1 mês
Osteosarcoma	Fíbula	5,0x2,0x2,0	300 (6)	Nenhuma	Nenhum	1 mês
		5,0x2,0x2,0	960 (14)	Nenhuma	Nenhum	2 meses
Adenocarcinoma metas- tático de próstata	Pélvis	4,0x4,0	280 (2)	Parcial	Leve eritema	1 mês
Melanoma maligno (amelanótico)	Pálato duro	4,0x2,0 2,0x2,0	240 (2) 240 (2)	Parcial Completa	Nenhum Nenhum	3 semanas 12 meses
Melanoma maligno (pigmentado)	Pálato duro	3,0x2,0 3,0x2,0 0,5x0,5	240 (2) 240 (2) 200 (1)	Nenhuma Parcial	Nenhum Nenhum	3 semanas 2 meses
			360 (1)	Completa	Nenhum	12 meses
Carcinoma de células escamosas	Cavidade sino- mandibular	2,0x1,0	360 (1)	Nenhuma	Nenhum	1 mês
		2,0x1,0	525 (2)	Parcial	Nenhum	3 meses
		1,5x1,5	270 (2)	Parcial	Nenhum	4 meses
			270 (2)	Parcial	Leve descamação	5 meses
Carcinoma de células escamosas	Pálato duro	3,0x4,0x2,0 3,0x3,0x1,0 3,2x2,0x1,0	300 (3) 144 (7) 187 (8)	Parcial Parcial Parcial	Nenhum Nenhum Nenhum	3 semanas 3 semanas 3 semanas
Carcinoma de células mast	Esterno	2,5x2,5	900 (3)	Completa	Descamação sobre a lesão	8 meses
Fibrosarcoma	Perna	2,3x1,0 3,5x2,5 0,7x0,5	324 (2) 480 (3) 480 (1)	Parcial Parcial Parcial	Nenhum Nenhum	1 mês 1 mês 1 mês
			900 (1)			
			1440 (1)	Parcial	Nenhum	2 semanas
Carcinoma de glandu- la sebácea	Face	3,0x3,0x2,0 4,0x3,5x2,0 4,0x3,5x2,0	900 (1) 1440 (1) 1619 (4)			
				Parcial	Nenhum	3 meses

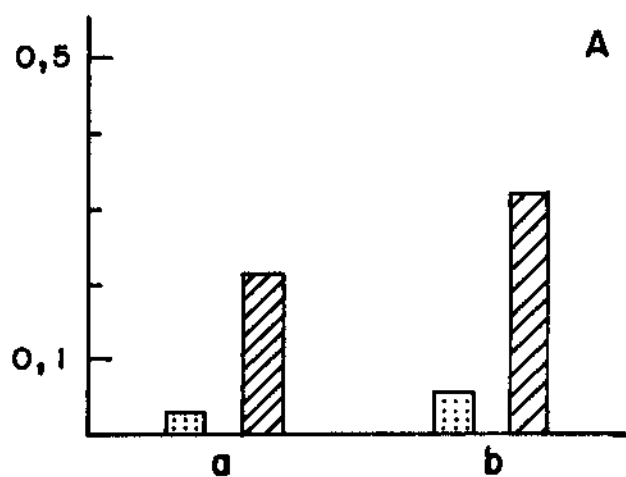
TABELA 04- Resposta de tumores primários em cães ao tratamento fracionado. Todos os animais receberam 5mg de HpD/kg, 18hs antes da exposição à luz durante 20-30 min. * = intervalo do tempo entre o tratamento mais recente e o exame.

Alguns grupos de trabalho testaram a atividade biológica dos diversos componentes do HpD (ref.30 e 53) e concordaram no sentido que o uso da Hp na forma purificada (isolada por coluna de permeação em gel) não apresenta habilidade de fotossensibilização, em contrapartida à Hp comercial contendo impurezas (tabela 05).

COMPONENTE	DOSE	% do DHE	% de RESPOSTA DO TUMOR		
Fabricante	mg/kg		dia 1	dia 7	dia 90
Hp (Porphyrin Prod)	15	15-20	70-80	50-60	0
Hp (Roussel)	15	<1	0	0	0
Hp purificada	15	0	0	0	0
HpD	7,5	45-50	80-100	50-60	10
DHE	3,75-4,2	100	80-100	50-60	10

TABELA 05- Habilidade de fotossensibilização de várias porfirinas em tumor mamário SMT-F (de 5-7 mm) transplantado em ratos que sofreram injeção intraperitoneal de porfirina 24hs antes da exposição à luz de $600\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$ com $160\text{mW}/\text{cm}^2$ por 30 min.

Duas indicações de que os efeitos citológicos da PDT possam ser diferentes em diferentes partes do tumor foram : a observação do aparecimento de bolhas na membrana perto da estrutura vascular 15min depois do tratamento de tumor de ratos com HpD (ref. 54) e, a verificação da sensível diminuição do fluxo sanguíneo em tumores uroteliais em ratos depois da fototerapia (figura 08).(ref. 24).



▤ TUMOR HpD + LUZ

▨ CONTROLE HpD, NÃO LUZ

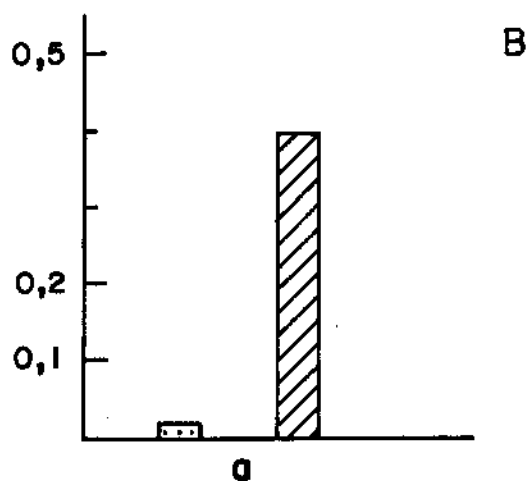


FIGURA 08- Fluxo sanguíneo do tumor depois da aplicação de HpD à uma dose de 10 mg/kg e fototratamento com luz de $\lambda > 590$ nm com 360 J/cm². a: tumor abaixo do processo xifóide, b: tumor acima da pubis. A- Fluxo sanguíneo determinado depois de 10 minutos do terminado o tratamento. B- Fluxo sanguíneo determinado depois de 24 hs do tratamento.

O estudo do carcinoma de células escamosas intrabronquiais e displasia de bexiga (ref. 55) induzidos em cães possibilitou o teste com o uso de fibras ópticas através do canal de biópsia do broncoscópio (praticável) na detecção e delimitação de tumores ocultos do pulmão e bexiga em humanos, refs. 55, 56, 57, 58 e 59) e foi de grande importância na determinação de alguns parâmetros da PDT. Estabeleceu o uso de luz de cor índigo do laser de Criptônio para ativação da fluorescência de tumores tratados com HpD, luz vermelha de um sistema laser de Argônio-laser do corante ($\lambda=630\text{nm}$) (ref. 21) dirigido pela fibra através dos diversos tipos de endoscópios em tumores que tivessem recebido $60-240 \text{ J/cm}^2$ depois de 48hs de injeção de $2,5-3,0\text{mg/kg}$ de HpD para produzir completa erradicação dos mesmos.

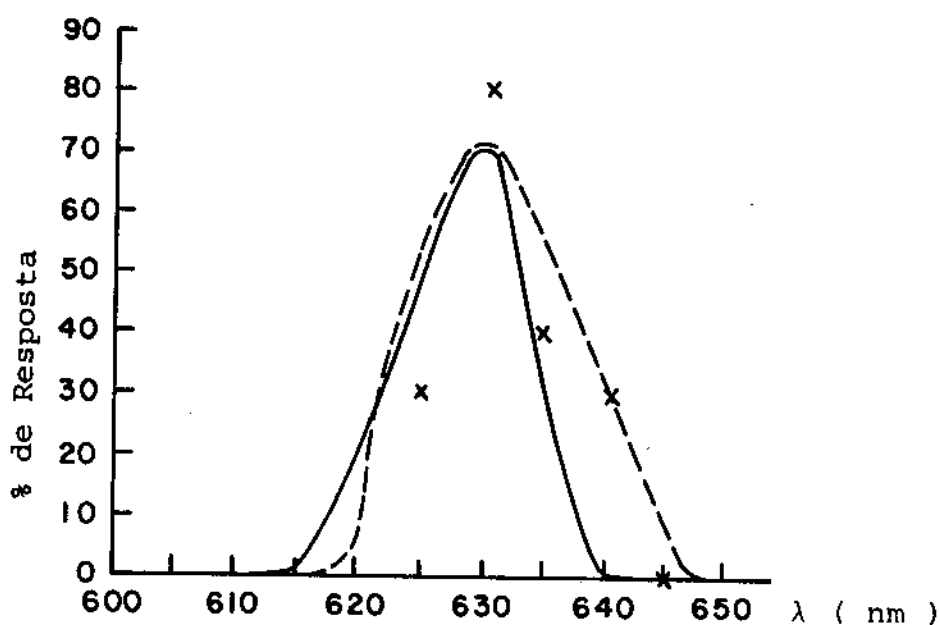


FIGURA 09- Resposta do tumor SMT-F em ratos. Os animais receberam HpD à dose de $7,5\text{mg/kg}$ ou DHE à dose de $5,0 \text{ mg/kg}$, 24 hs antes do tratamento com luz de 75 mW/cm^2 por 30 minutos. A resposta foi determinada pelo percentual de animais sem tumor depois de 7 dias do fototratamento. (X X) DHE , resposta ao HpD : { (—) tumor
(---) pele

4.4- USO CLÍNICO

O uso clínico de HpD em PDT foi iniciado em pacientes que já haviam tentado outras formas conhecidas de terapia (radioterapia, diferentes tipos de quimioterapia, terapia hormonal, etc.) e estas so mostraram ineficientes ou inadequadas à eles.(ref. 23)

TIPO DE TUMOR	RESPOSTA			TOTAL
	COMPLETA (a)	PARCIAL (b)	NENHUMA	
Células basais	2			2
Melanoma maligno	6		1	7
Condrosarcoma	1			1
Adenocarcinoma do cólon	2		1	3
Próstata	1			1
Micose fungóide	4	2		6
Carcinoma endometrial	6			6
Carcinoma de esôfo	75	10		85
Angiosarcoma		1		1
Carcinoma de células escamosas	1			1
TOTAL DE TUMORES	98	13	2	113

TABELA 06- Resposta do tumores ao HpD seguido de exposição à luz vermelha.(a) desaparecimento de tumor palpável.(b) redução de massa tumoral 50% ou completo desaparecimento seguido de recorrência.

A tabela 06 indica o tipo de resposta à PDT de uma variedade de tumores cutâneos, subcutâneos recorrentes e metastáticos, com injeção intravenosa de HpD à doses de (2,5-5)mg/Kg de massa corporal do paciente e irradiados 2,3,4 e 5 dias depois da injeção, com luz de $600\text{nm} < \lambda < 700\text{nm}$ com $100\text{mW}/\text{cm}^2$ durante 20min, ou, com $50\text{mW}/\text{cm}^2$ durante 40min.(ref. 23).

A fluorescência observada é mais fraca quanto mais pigmentado for o tecido, o que dificulta a penetração da luz azul. As melhores relações terapêuticas foram obtidas pelo tratamento à $100\text{mW}/\text{cm}^2$ durante 20min com luz de $620\text{nm} < \lambda < 640\text{nm}$ nos dias 3,5 ou 5 após a injeção de 2,5 mg de HpD/Kg de peso do paciente.(ref. 27). O uso de tratamento fracionado apresentou as vantagens de poupar o tecido normal e prevenir traumas em pacientes quando grandes áreas são tratadas. Em áreas tratadas repetidamente, uma segunda injeção 2 ou 3 semanas depois do primeiro tratamento resulta em resposta mais severa da pele, entretanto, a resposta do tumor é geralmente rápida com aparente necrose em menos de 1 semana.

Vários grupos de pesquisa nos EUA, outros na Itália, Noruega, Austrália, Japão, China, e mais recentemente na França, têm publicado resultados bastante promissores do uso de HPD/DHE em PDT (ref. 60 o 61).

Para tumores cutâneos e subcutâneos como melanoma maligno, carcinoma de células basais, micose fungóide, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, doença de Bowen e câncer metastático de seio se observa resposta completa de tumores superficiais (3 mm) com o uso de baixas dosagens e, tumores a profundidade de 1,5 cm só são destruídos com múltiplos tratamentos intersticiais com algum

sacrifício do paciente. A PDT mostra ser de grande benefício à maioria dos pacientes e não se mostra aplicável quando a doença está claramente fora do controle. (refs.23 e 27).

O tratamento de câncer de pulmão (refs.62 ,63 e 64)em estado inicial se mostra bastante eficiente, o a PDT tem sido largamente usada nestes casos. Para lesões obstrutivas e tumores extra-bronquiais, outras terapias são indicadas. A PDT não pode ser considerada como cura total para pacientes com caso avançado e/ou de recorrência múltipla, mas pode oferecer a eles a possibilidade de estender o período de sobrevivência nas situações pós-operatório e após outras terapias.

O uso da PDT em câncer de esôfago é bem similar aos casos de câncer no pulmão; mais indicado para estágio inicial quando a cirurgia possa ser evitada ou não apresente garantias.(refs.66 e 67).

Os únicos casos registrados do uso do PDT em câncer do estômago (ref. 67) mostraram que embora haja considerável necrose dos tumores, frequentemente se encontra pequenos aglomerados de células tumorais, o que é atribuído a dificuldades técnicas em alcançar todas as áreas igualmente com luz devido a dobras gástricas, peristalsia e o ângulo limite de divergência das fibras usadas.

Carcinoma "in situ", câncer multicêntrico e displasia de rins, têm mostrado maior grau de seletividade e alto grau de resistência do urotélio normal com HpD/PDT que com qualquer outro tipo de tratamento (refs.59, 68, 69 e 70).

O número de casos registrados do uso de PDT em tumores ginecológicos e de próstata (refs. 71, 72, 73, 74 e 75) é pequeno, mas todos os casos de câncer de vagina e vulva mostraram resposta parcial

ou completa com excelente reepitelialização depois da necrose dos tumores, ocorrendo geralmente em 3 ou 4 semanas.

Embora ainda se necessite mais estudo, a PDT tem mostrado excelentes resultados nos casos de tumores intraoculares, melanoma maligno do coróide o retinoblastoma. A luz é aplicada através da córnea e esclera (refs. 76, 77 e 78) com alta densidade de potência (200-600mW/cm²).

Desta forma podemos ver que a PDT tem se mostrado efetiva nos tratamentos de tumores do polo, brônquios, esôfago, rins o seio, e, bastante promissora em outras neoplasias. Apresenta a vantagem de poder ser aplicada sem nenhum problema depois de outras terapias convencionais, de forma que se torne uma modalidade de terapia. Para pacientes inoperáveis o aqueles terminais, tem sido escolhida como forma de tratamento preferido.

C A P Í T U L O V

5- PROPRIEDADES ÓPTICAS DA HEMATOPORFIRINA E DERIVADOS

Como vimos até aqui, a terapia fotodinâmica do câncer com o uso dos derivados da hematoporfirina se tornou um terapia alternativa, com aplicabilidade ampla e promissora. Podemos verificar que uma grande quantidade de estudos biológicos e clínicos têm sido realizada, o que nos levaria a esperar um volume da mesma ordem de grandeza em trabalhos que versassem acerca das propriedades e mecanismos físico-químicos dos compostos em questão. Ao contrário das expectativas, e por estranho que pareça, os estudos nestas áreas são mínimos e pouco elucidativos.

Depois de um levantamento bibliográfico minucioso e da realização bastante criteriosa no preparo das amostras e medidas de suas propriedades ópticas, podemos discutir, comparar e questionar algumas propriedades publicadas na literatura.

Átomos e moléculas são compostos por partículas ligadas que podem ser descritas usando-se mecânica quântica, através de funções de onda estacionárias. As condições que correspondem aos modos estacionários de onda são os estados. A estrutura quântica pode ser entendida considerando-se a estrutura de níveis de energia como sendo constituída de três partes principais: eletrônica, vibracional e rotacional. A estrutura eletrônica é determinada pela distribuição de carga eletrônica na molécula e por seus estados de energia eletrônica. Os modos vibracionais da molécula e seus correspondentes estados de energia vibracional compõe a estrutura vibracional. Dentro de um es-

tado vibracional há uma estrutura fina de níveis atribuídos a diferentes estados de rotação da molécula. Coletivamente estas estruturas são denominadas estruturas vibrônicas.

Os métodos físicos que permitem o estudo de estruturas vibrônicas de moléculas são vários. Dentro deles destacamos os métodos ópticos por estarem intimamente ligados aos processos envolvidos na Terapia Fotodinâmica de Câncer (PDT) de nosso interesse.

O espectro emitido por uma molécula pode ser dividido em três regiões correspondentes aos diferentes tipos de transição entre os estados quânticos moleculares. Na região de radiação infravermelho longínquo observa-se primariamente os espectros de rotação, correspondentes à radiação emitida em transições entre estados de rotação de uma molécula que possui momento de dipolo elétrico. Na região do infravermelho próximo, observamos em geral, os espectros de vibração correspondentes à radiação emitida em transições vibracionais de moléculas que possuem momento de dipolo elétrico e comportam também mudanças nos estados de rotação. Na região do visível e ultra-violeta observamos os espectros eletrônicos correspondentes à radiação emitida em transições eletrônicas. As vibrações descrevem vários ciclos durante o intervalo do tempo necessário para mudar a configuração nuclear, de modo que os espectros eletrônicos têm uma estrutura fina determinada pelo estado de rotação e vibração dos núcleos durante as transições eletrônicas.

5.1- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para a obtenção dos espectros de absorção, emissão e Raman, foram preparadas várias soluções de hematoporfirina e derivados, variando a concentração em solventes de diferente polaridade.

Os sólidos foram pesados em microbalança Mettler ME-22 e foram dissolvidos nos seguintes solventes: ácido acético glacial P.A.- Merck, acetona RPE- Carlo Erba, metanol P.A.- Merck e água bidestilada. As concentrações utilizadas foram 1.10^{-3} M, 1.10^{-4} M e 1.10^{-6} M.

As amostras destas soluções foram colocadas em cubetas fluorimétricas de quartzo, Hellman, de caminho óptico = 1cm, para as medidas de absorção e fluorescência. Para a excitação via laser de argônio ou criptônio, foram utilizadas cubetas de pirex, Hellman, com 5 faces transparentes, de mesmo caminho óptico.

Os espectros de absorção foram realizados no equipamento Baush & Lomb Spectronic 2000. As medidas de fluorescência foram realizadas no espectrofluorímetro Pelkin-Elmer MPF-44B Fluorescence Spectrophotometer.

Um sistema convencional de espectroscopia Raman foi utilizado para a obtenção dos espectros de emissão óptica via excitação laser. Neste sistema, um feixe laser incide na amostra e, a luz espalhada por ela é coletada por um espectrômetro duplo, e é registrada com o auxílio de um sistema de fóton contagem e um traçador x-t. Os equipamentos utilizados foram: Spectra Physics Ar-Laser 165, Coherent Radiation Kr-Laser CR-750K, Spex Spectrofotometer 1401; Channeltron 1155, pré-amplificador e discriminador 1120, fonte de alta tensão 1106

o photoncounting Digital Synchronous Computer 1110 , SSR Inst. Co., traçador Hewlett Packard 7100BM. Todos os espectros foram obtidos à temperatura de 20 °C e utilizando-se potência constante de 40mW, proveniente dos lasers.

Uma vez que foram realizadas medidas com o envelhecimento das soluções, estas permaneceram no escuro, à 20 °C entre uma medida e outra.

5.2- ABSORÇÃO ÓPTICA

Em espectroscopia óptica, variações nos estados quânticos podem ser detectados quando a molécula absorve energia de um fóton incidente, para passar para um estado de maior energia.

A figura 10 mostra os espectros de absorção ópticos típicos da maior parte das metaloporfirinas e porfirinas de base livre. Nestes espectros a banda mais intensa em $\lambda = 400$ nm é chamada de banda B, ou de banda de Soret, e é comum a todas as porfirinas. As bandas mais fracas na região $\lambda = 500$ nm e $\lambda = 600$ nm são chamadas de bandas Q. A banda Q_0 em metaloporfirinas é devido a transição eletrônica pura, sem vibrações moleculares, entre o estado eletrônico fundamental e o primeiro estado eletrônico excitado. A banda Q_1 é devido à mesma transição eletrônica, mas além disso, vibrações moleculares estão envolvidas. Esta banda é chamada de vibrônica. Q_x e Q_y são análogos para as porfirinas de base livre, e os subscritos x e y se referem à polarização do vetor campo elétrico da luz absorvida com respeito aos eixos mostrados na figura 10.

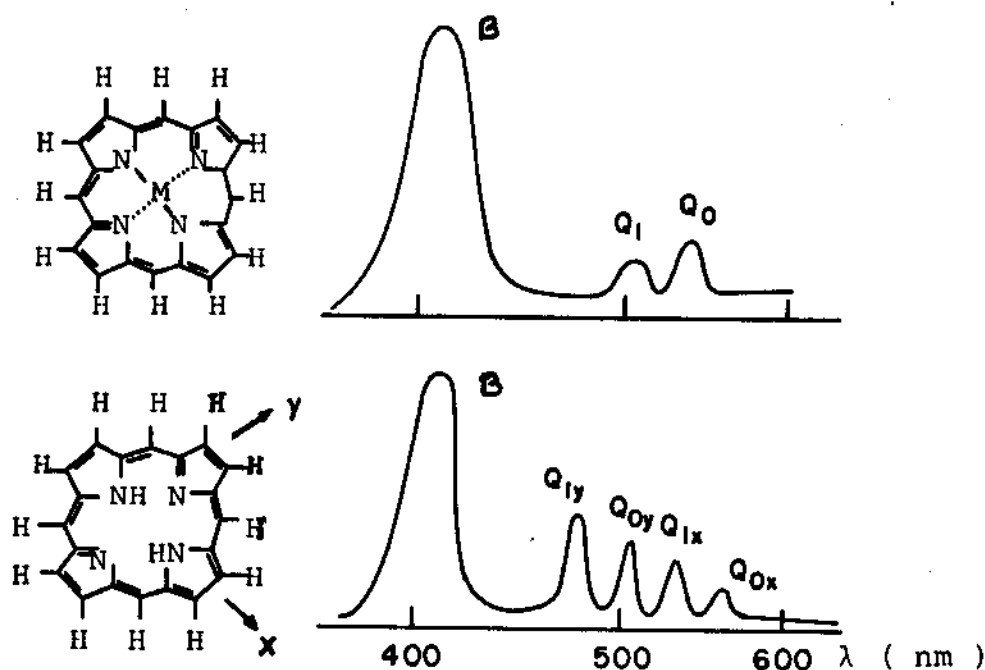


FIGURA 10- Espectro de absorção típicos para: (a) Metaloporfirinas o (b) porfirinas de base livre, em solução aquosa.

A figura 11 representa um diagrama típico de níveis de energia para as porfirinas. Para as porfirinas, a absorção de luz de Q_0 corresponde ao nível de energia E_1 . No espectro de absorção se observa transições do estado fundamental E_0 aos vários estados vibrônicos excitados da molécula ($E_1 + e_1$, $E_1 + e_2$, etc.). Assim, o espectro de absorção revela níveis de energia eletrônicos excitados e associados níveis de energia vibracionais (e_1 , e_2 , etc.).

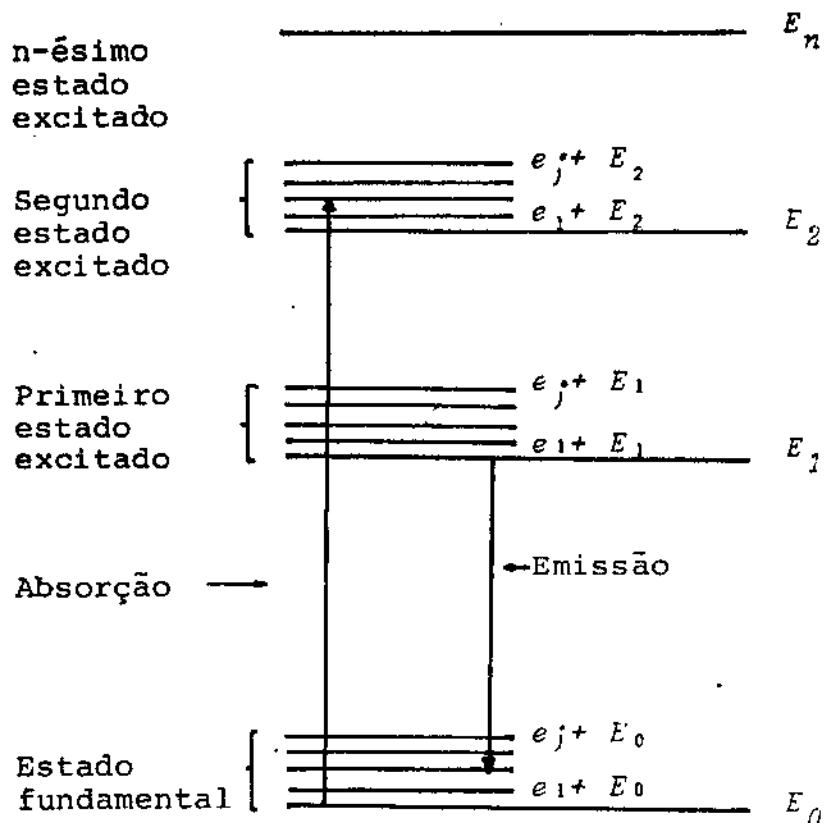


FIGURA 11- Processo de emissão e absorção de porfirinas (onde os níveis de energia são tipicamente maiores que 16.000 cm^{-1}).

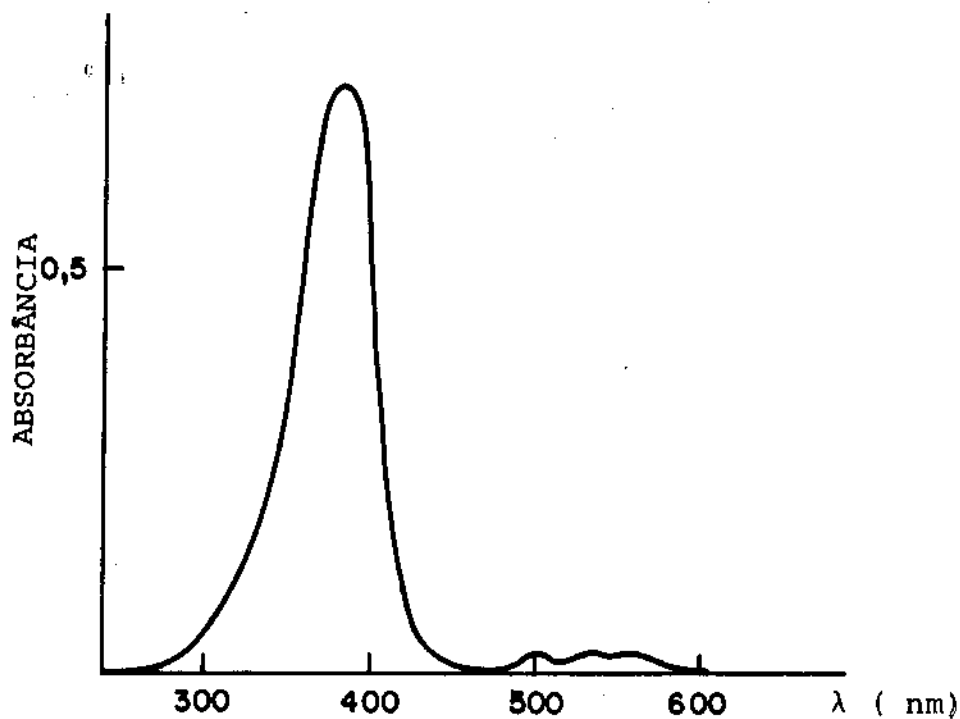


FIGURA 12- Espectro de absorção óptica de hematoporfirina em solução aquosa $1,25 \text{ } \mu\text{g/ml}$, no dia da preparação.

A figura 12 exibe o espectro de absorção registrado da Hp em solução aquosa $1,25 \mu\text{g/ml}$ ($1,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), tendo o perfil esperado, comum às porfirinas. Exibe pico máximo em $\lambda = 391 \text{ nm}$. Podemos observar que o espectro mostrado nesta figura e o espectro (a) da figura 13 (ref. 79) exibem os mesmos picos de absorção.

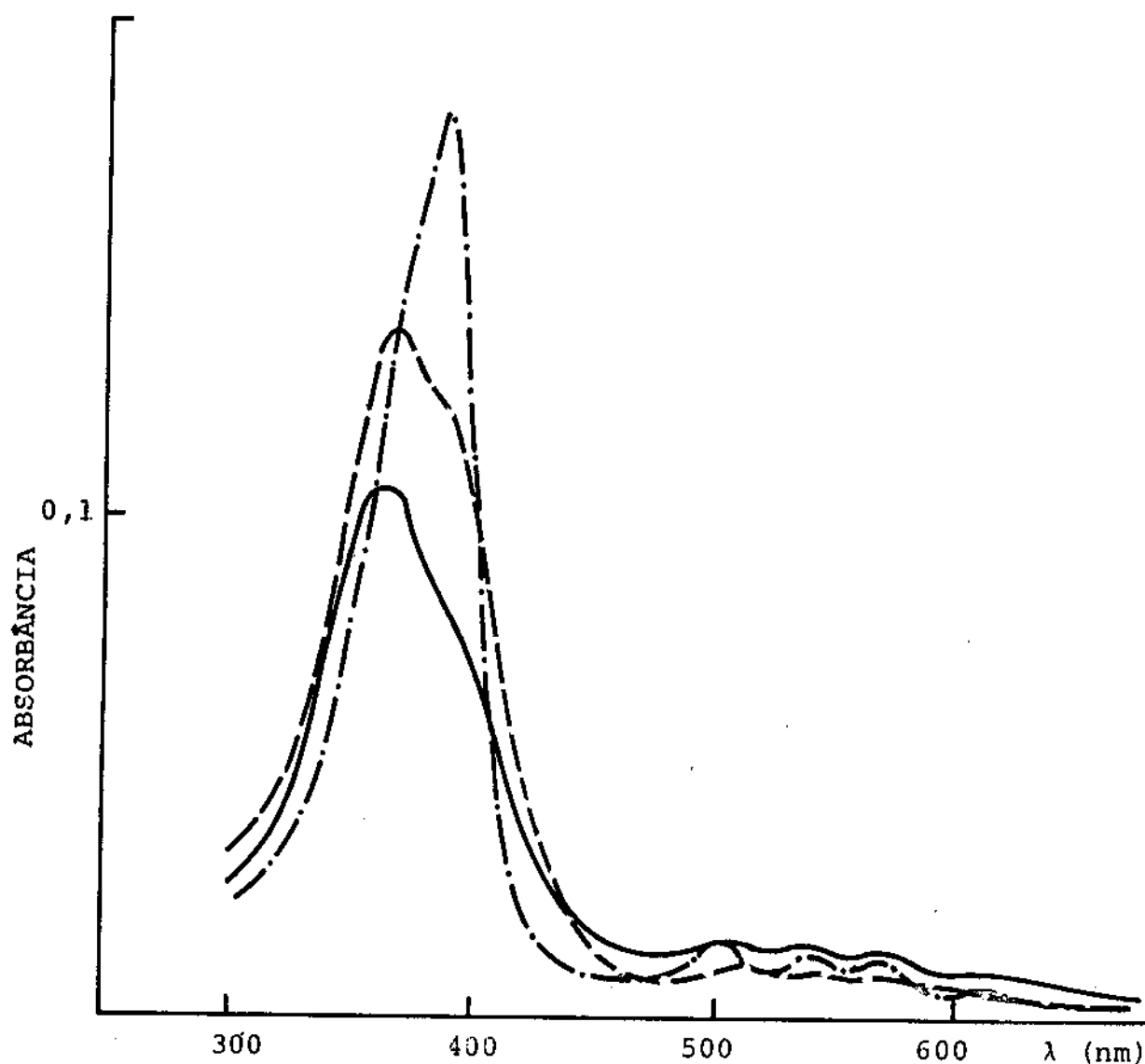


FIGURA 13- Espectros de solução aquosa $1,25 \mu\text{g/ml}$ de:
 (_ _ _) hematoporfirina , (- - - - -) HpD e (———) DHE.

A figura 13 (ref. 79) fornece uma comparação entre os espectros de absorção do Hp, HpD e DHE em solução aquosa. A variação das intensidades e pequenos deslocamentos caracterizam os diferentes espécies moleculares encontrados em solução. Enquanto a Hp tem máximo de absorção em $\lambda = 395$ nm (pico de absorção do monômero), o HpD e o DHE apresentam um deslocamento deste máximo para $\lambda = 365$ nm, indicando assim a presença de agregados moleculares. Todos os espectros exibem picos em $\lambda = 615$ nm e $\lambda = 675$ nm, com aproximadamente mesma intensidade, entretanto, um pico adicional em $\lambda = 580$ nm aparece para o DHE.

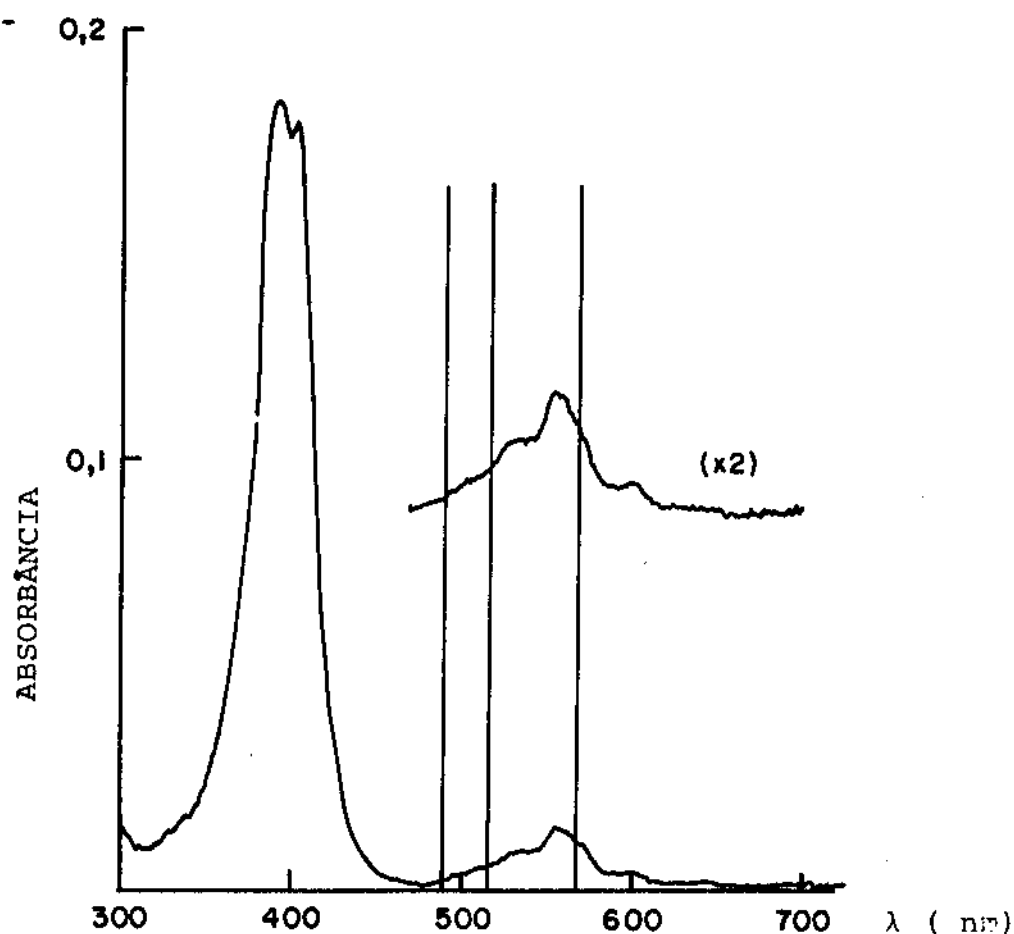


FIGURA 14- Espectro de absorção de solução de Hp em ácido acético 1.10^{-6} M no dia da preparação.

As figuras 14 e 15 mostram os espectros de absorção de solução de Hp em ácido acético, no dia de preparação das soluções, com concentração $1 \cdot 10^{-6}$ M e $1 \cdot 10^{-4}$ M respectivamente. A figura 16 mostra um espectro tomado em mesmas condições que a figura 15, depois de 30 dias de preparada a solução.

Nas figuras 14-19 as linhas verticais indicam os comprimentos de onda que serão utilizados para obter os espectros de emissão e espalhamento: $\lambda = 488 \text{ nm}$, $\lambda = 514,5 \text{ nm}$ e $\lambda = 568 \text{ nm}$.

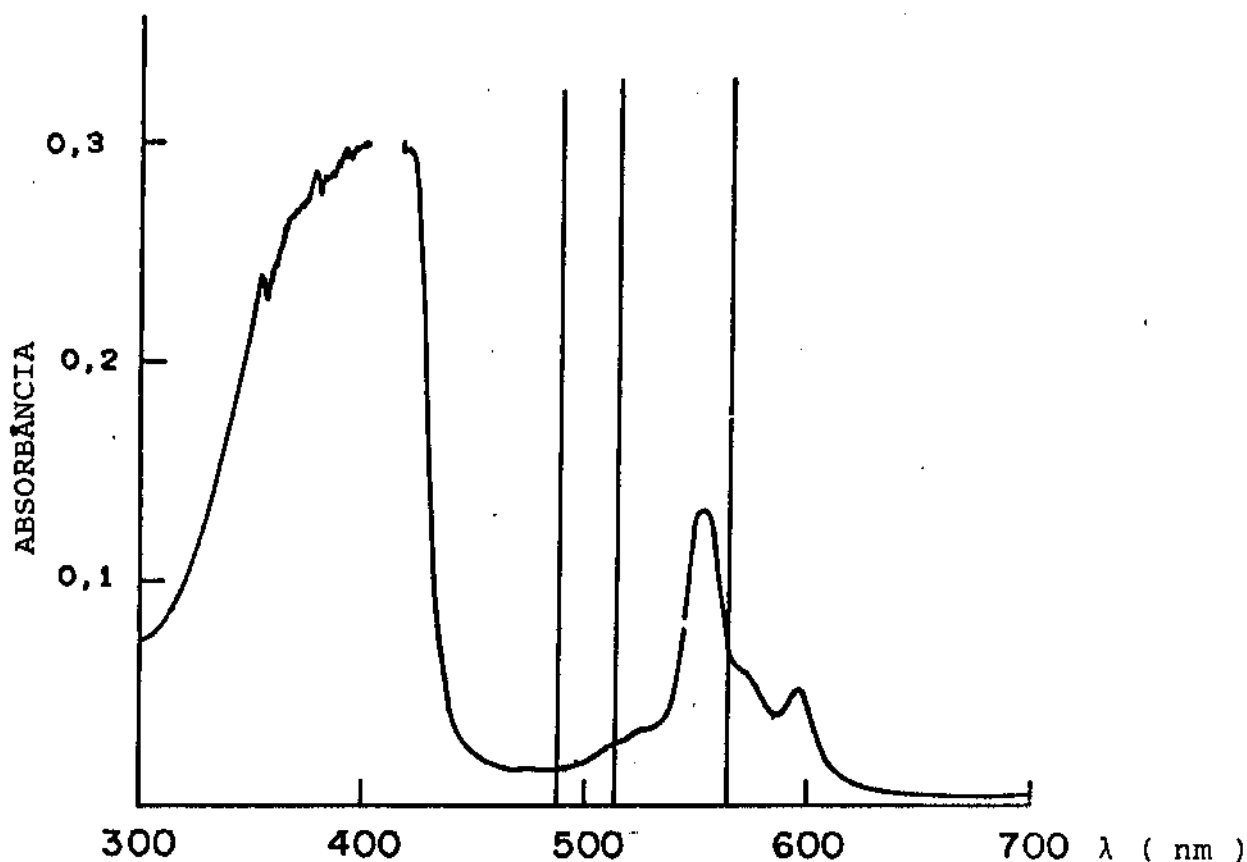


FIGURA 15- Espectro de absorção de solução de Hp em ácido acético $1 \cdot 10^{-4}$ M, no dia da preparação.

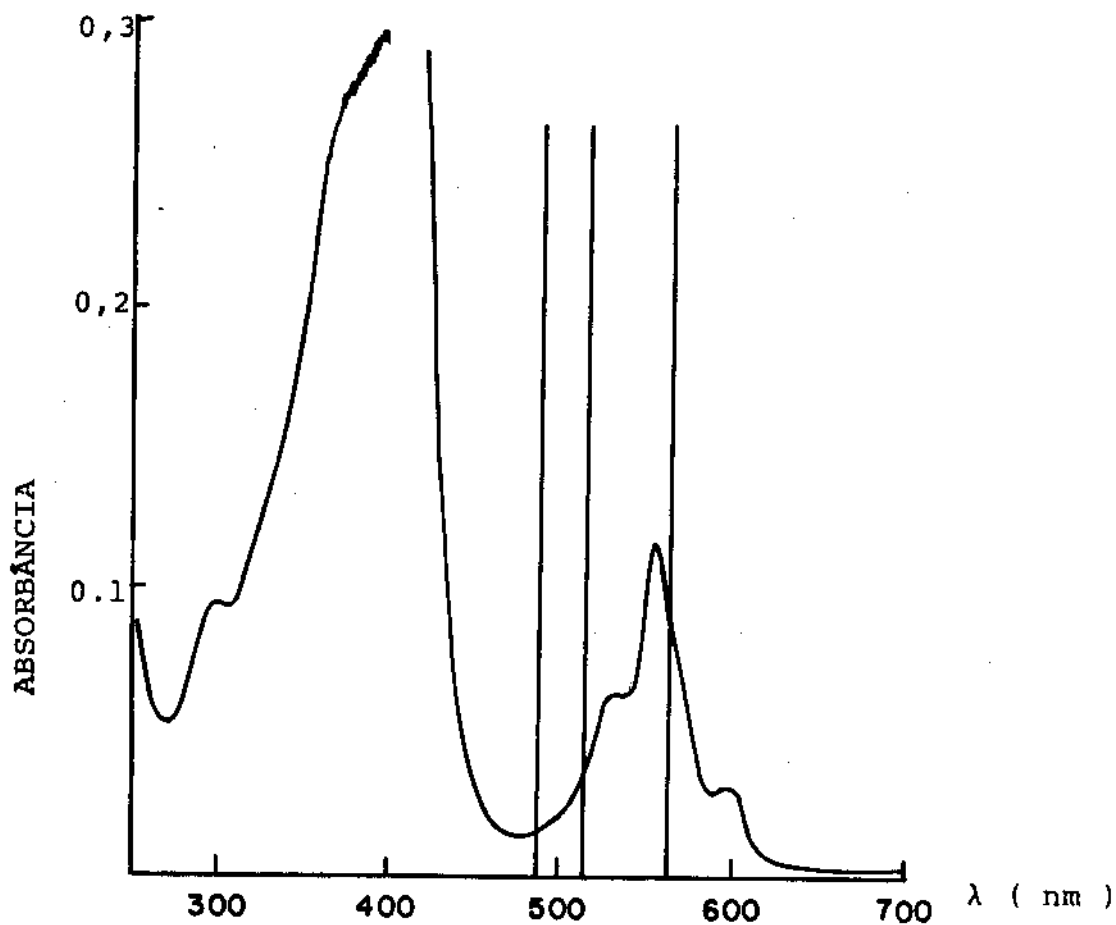


FIGURA 16- Espectro de absorção de solução de Hp em ácido acético 1.10^{-4} M, 30 dias depois da preparação.

As figura 17 e 18 mostram os espectros de absorção de soluções de Hp em acetona, com concentração 1.10^{-6} M e 1.10^{-4} M respectivamente, no dia de preparação da solução; e a figura 19 mostra o espectro da solução 1.10^{-4} M depois de 24 hs.

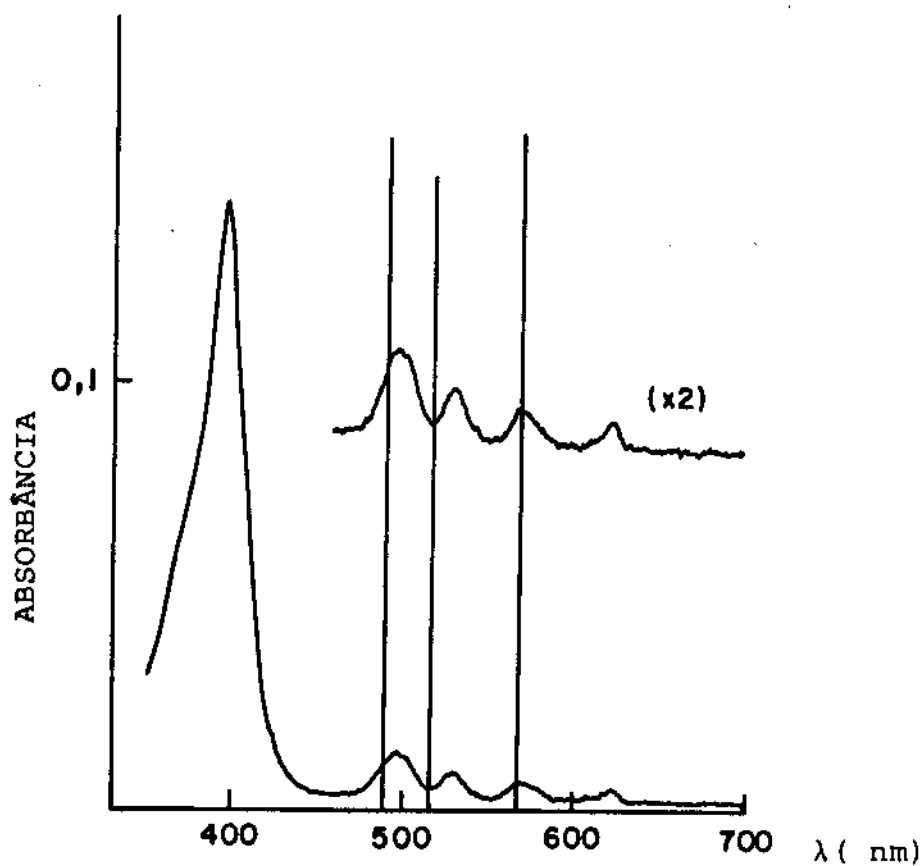


FIGURA 17- Espectro de absorção de solução de Hp em acetona 1.10^{-6} M, no dia da preparação.

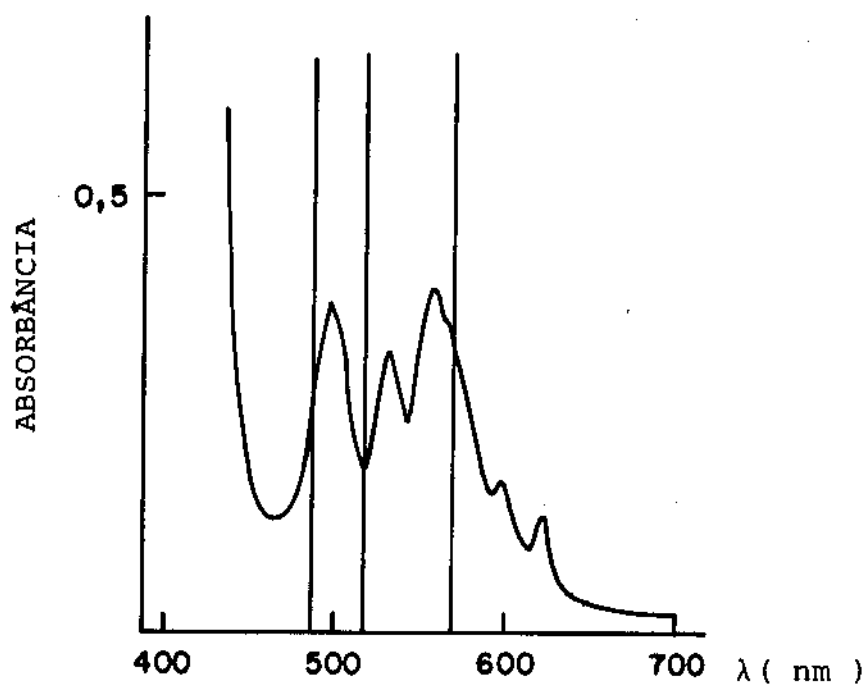


FIGURA 18- Espectro de absorção de solução de Hp em acetona 1.10^{-4} M, no dia da preparação.

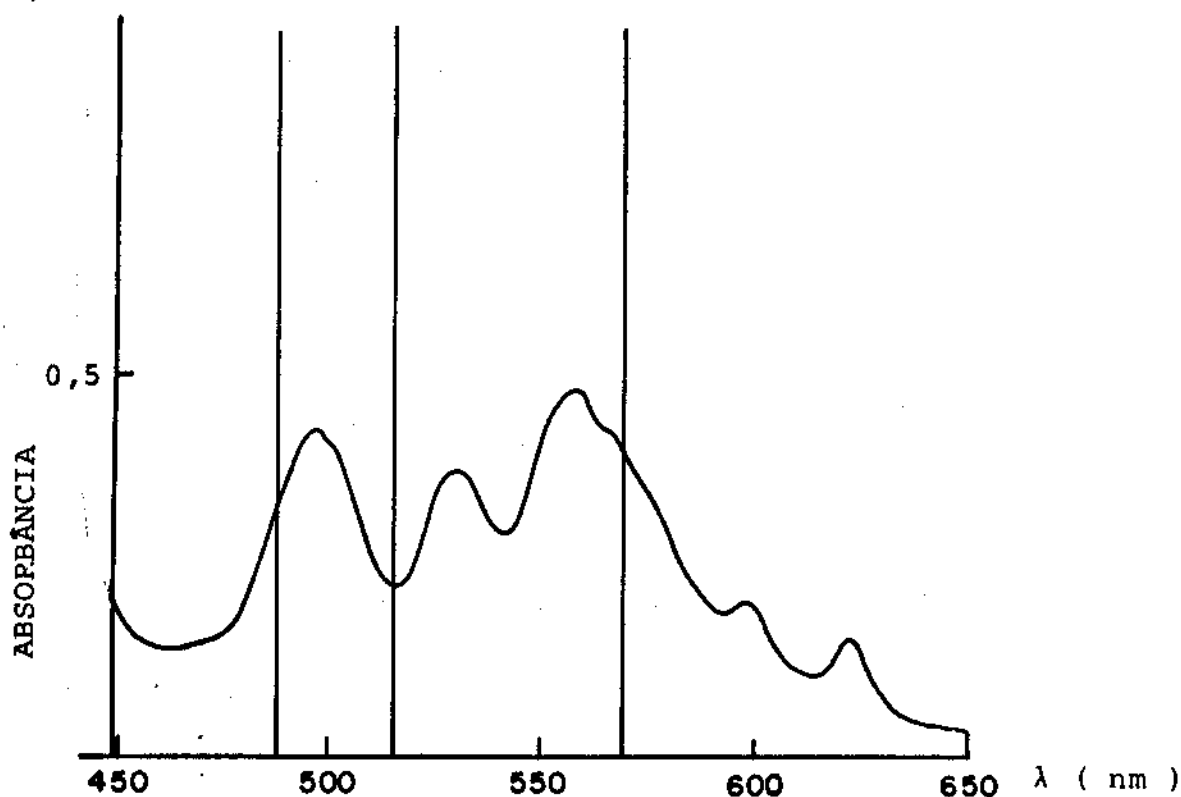


FIGURA 19- Espectro de absorção do solução do Hp em acetona 1.10^{-4} M, depois de 1 dia da preparação.

Todos estes espectros exibem picos de máxima absorção em $\lambda = 395$ nm (banda do Soret) e os demais picos permanecem fixos, apenas havendo variação nas intensidades relativas com a mudança da concentração e com o tempo de preparo das soluções.

A figura 20 (ref. 31) mostra o espectro de absorção de solução de Hp em acetona, nas mesmas condições que a figura 17, e está em acordo.

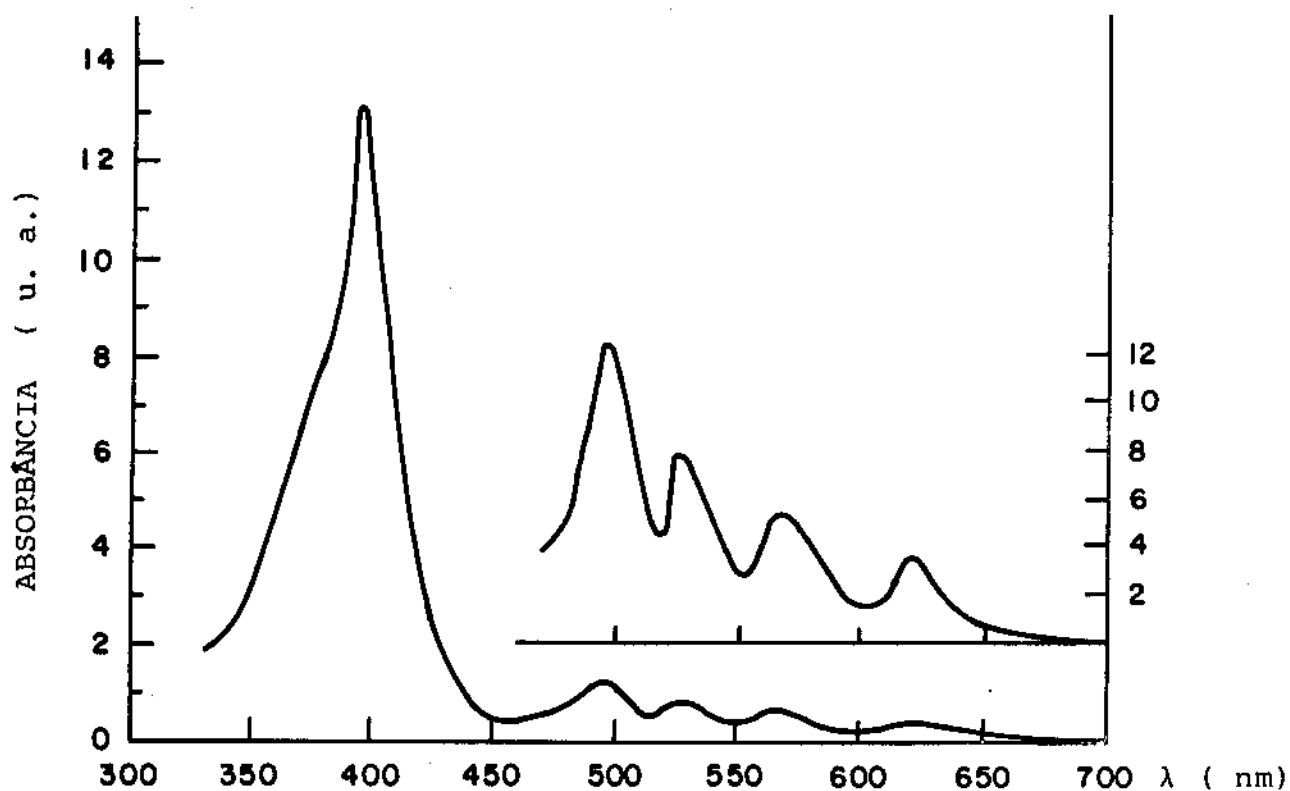


FIGURA 20- Espectro de absorção de solução de Hp em acetona (ref. 31).

Com base nestes dados, obtivemos as localizações de ressonância e com eles pudemos realizar as medidas de excitação com laser, para localizar a emissão e possíveis picos Raman das soluções.

5.3- FLUORESCÊNCIA

Uma vez absorvido o quantum de luz, a molécula irá converter a energia de excitação e retornar ao seu estado eletrônico fundamental E_0 . Quando as moléculas estão em uma fase sólida ou líquida, um estado molecular excitado decairá para um estado de menor energia, geralmente com a perda de energia sendo liberada em forma de calor. O decaimento subsequente deste estado ao estado eletrônico fundamental é frequentemente acompanhado pela emissão de radiação eletromagnética que é chamada de luminescência. A transição do estado eletrônico mais baixo E_1 para o estado eletrônico fundamental E_0 pode terminar em um nível vibracional deste estado fundamental, com a emissão de um fóton de frequência relativa a esta diferença de energia. Assim, segue que o espectro de fluorescência pode fornecer níveis de energia vibracionais no estado eletrônico fundamental.

A emissão de fluorescência ocorre quando o fóton incidente é completamente absorvido e o sistema transferido para um certo estado excitado tal que somente depois de um certo intervalo de tempo decai a vários estados de menor energia. Desta forma vemos que a fluorescência ocorre somente para as frequências de absorção.

A figura 21 (ref. 79) mostra os espectros de emissão fluorescente de solução aquosa de Hp, HpD e DHE, sobre excitação em $\lambda = 405$ nm. Uma diferença marcante nas intensidades de fluorescência entre o Hp e o DHE é observada (um fator de quatro). Isto se deve ao fato de que, em solução, o DHE tem uma certa quantidade de compostos agregados não fluorescentes.

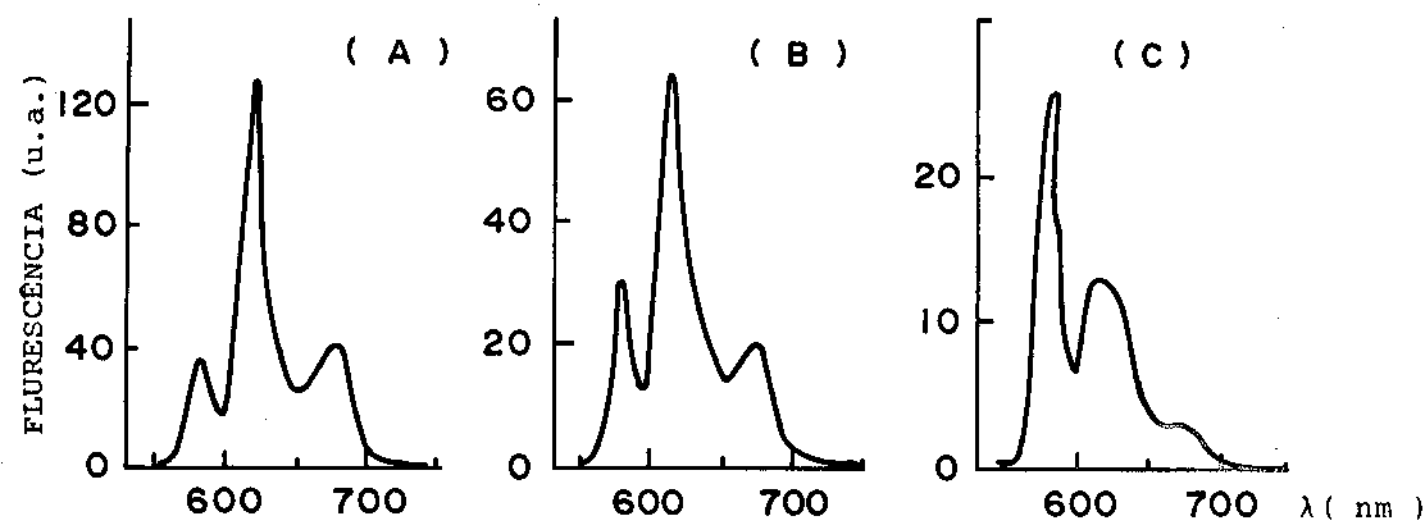


FIGURA 21- Espectros de emissão fluorescente de solução aquosa de (a) Hp , (b) HpD e (c) DHE , 1,25 μ g/ml sobre excitação em $\lambda = 405$ nm.

As figuras 22-27 mostram os espectros de emissão fluorescente de solução aquosa do HpA de concentração 1,25 μ g/ml. A variação dos espectros de emissão fluorescente excitados com $\lambda = 405$ nm e $\lambda = 396$ nm sugere a presença de mais do que um espécie molecular com propriedades espectrais diferentes, e mostra a instabilidade dos compostos em solução, onde há formação e aniquilamento de algumas porfirinas. (- - -) $\lambda = 405$ nm, e (—) $\lambda = 396$ nm.

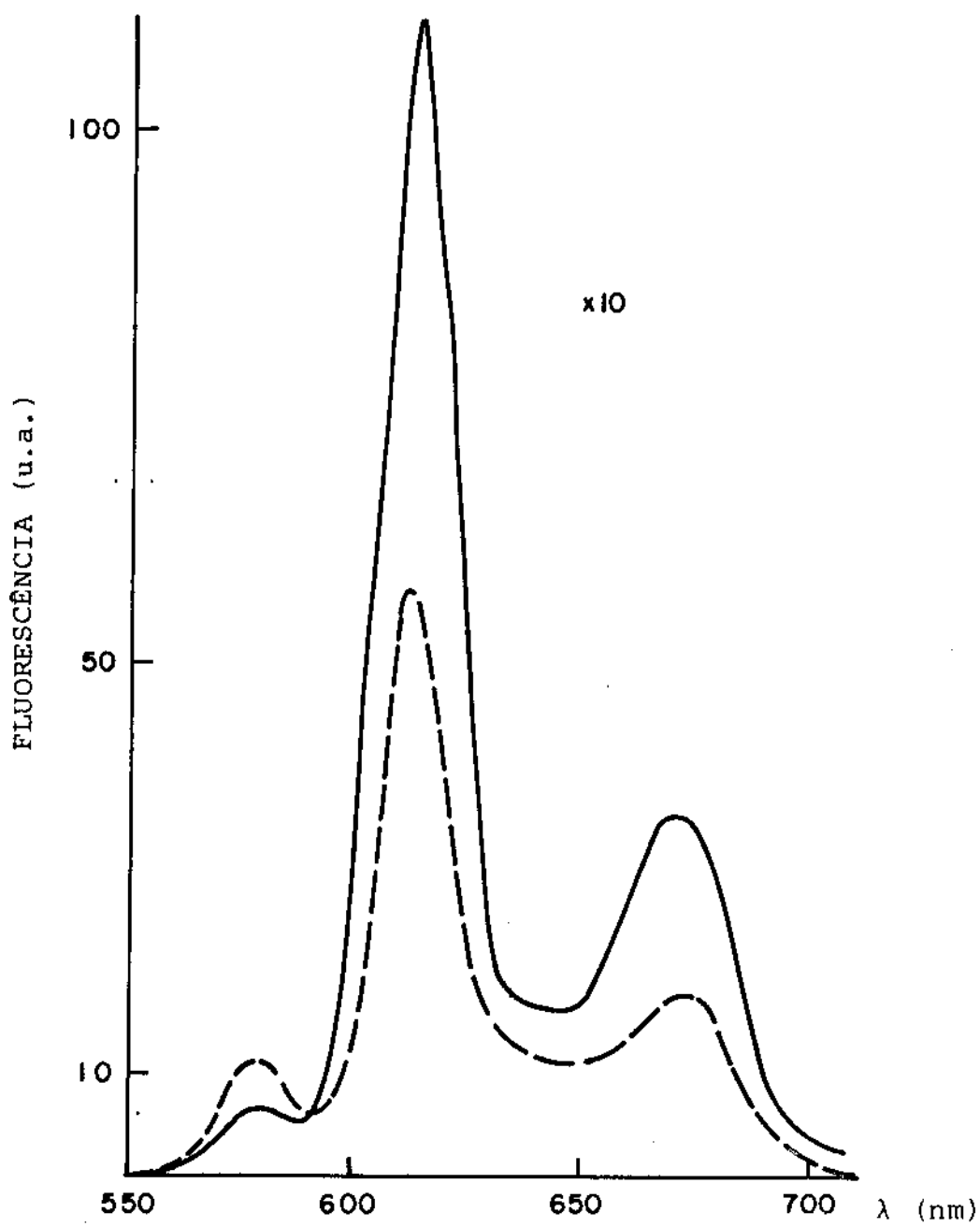


FIGURA 22- Espectro de fluorescência de solução aquosa do HpA, de preparo recente.

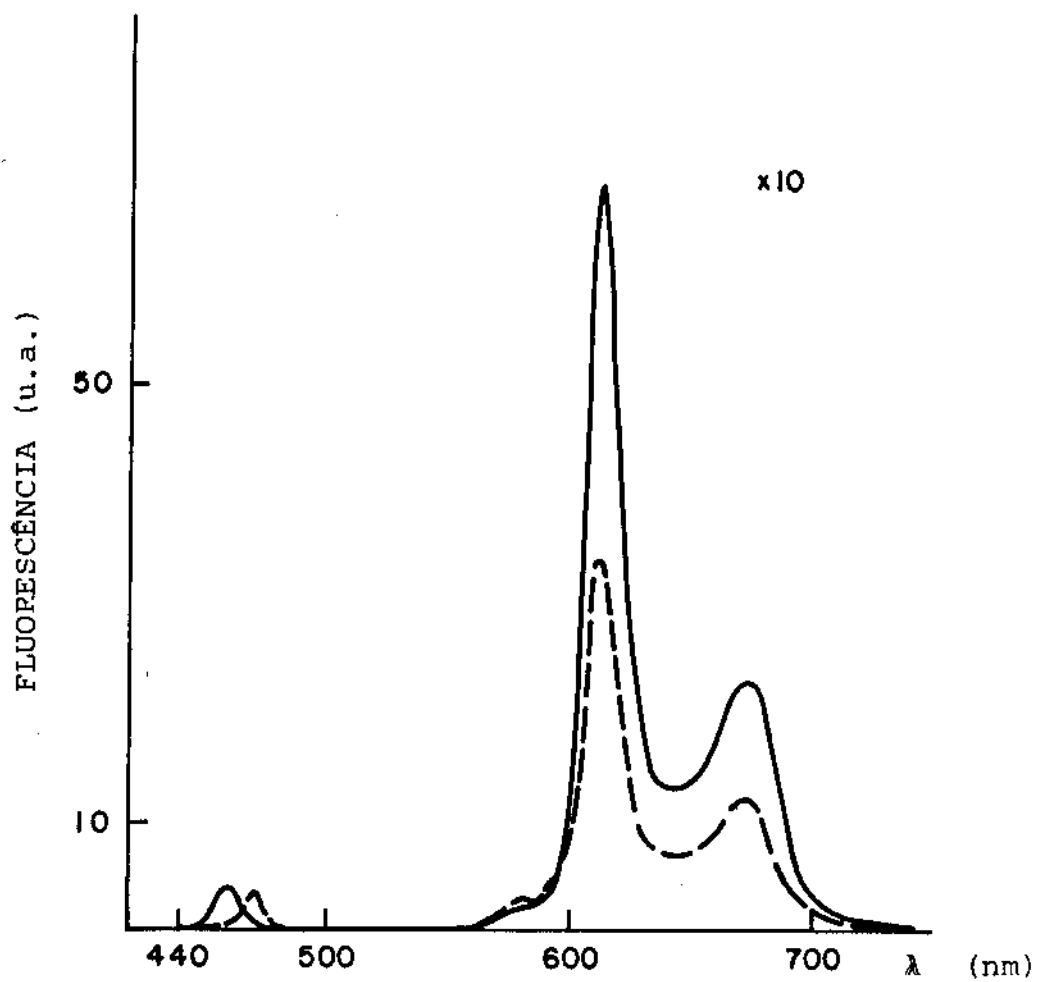


FIGURA 23- Espectro de fluorescência de solução aquosa de HpA, 1 dia depois da preparação.

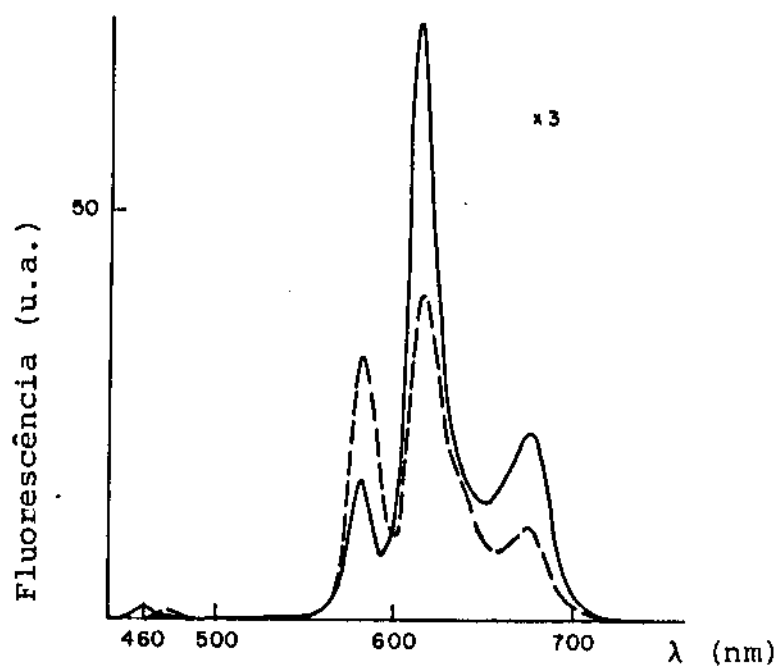


FIGURA 24- Espectro de fluorescência de solução aquosa de HpA, 2 dias depois da preparação.

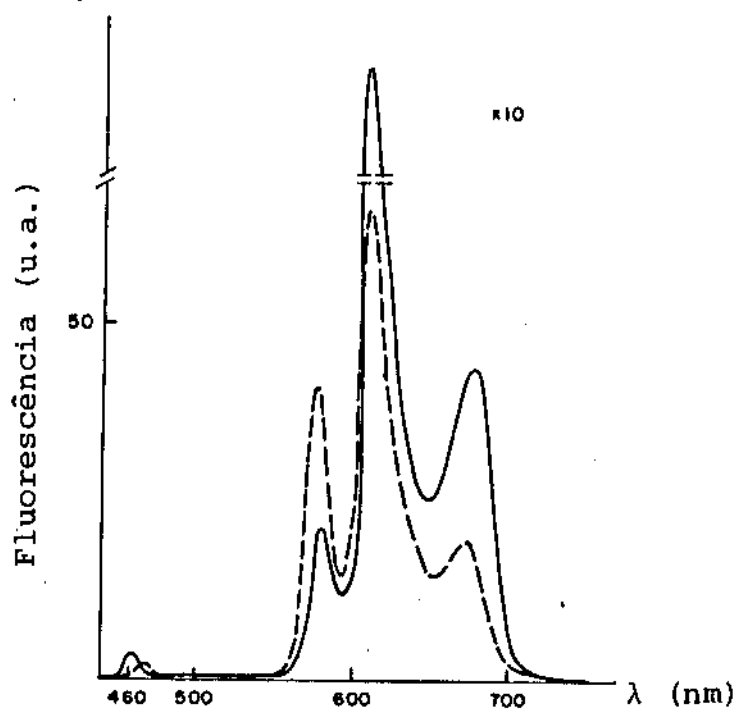


FIGURA 25- Espectro de fluorescência de solução aquosa de HpA, 3 dias depois da preparação.

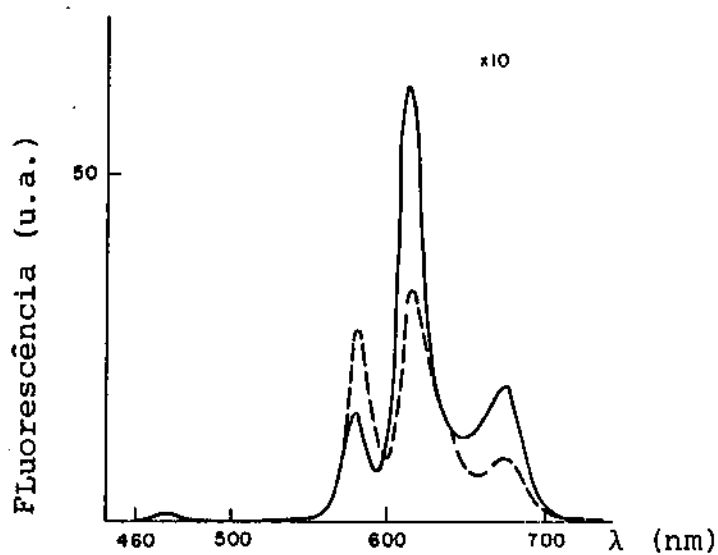


FIGURA 26- Espectro de fluorescência de solução aquosa de HpA, 4 dias depois da preparação da solução.

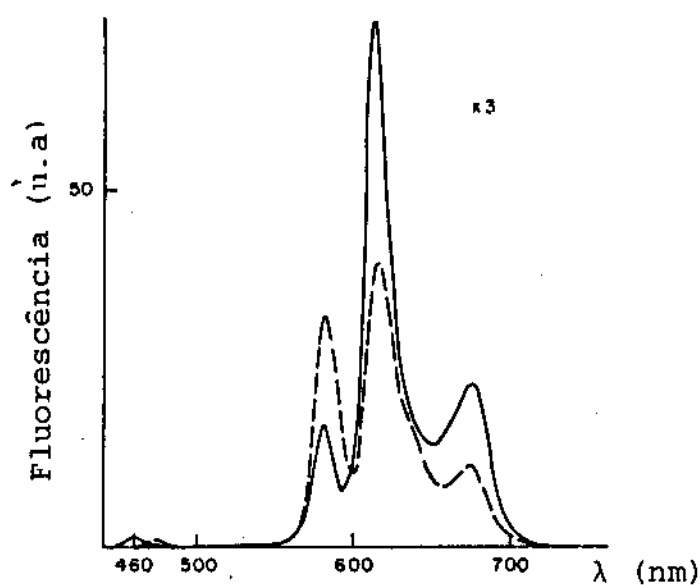


FIGURA 27- Espectro de fluorescência de solução aquosa de HpA, 5 dias depois da preparação.

Se compararmos os espectros (A) e (B) da figura 28, respectivamente espectros de absorção ultra-violeta-visível e de excitação de fluorescência (com comprimento de onda de emissão fixado em $\lambda = 614$ nm, que corresponde ao máximo de emissão fluorescente) de solução aquosa de HpA, veremos que grande parte do lado azul da banda de Soret não excita fluorescência. Esta região corresponde a absorção por espécies moleculares não fluorescentes, ou pouco fluorescentes. Segundo a literatura (ref. 80), o componente pouco fluorescente da HpA é o DHE.

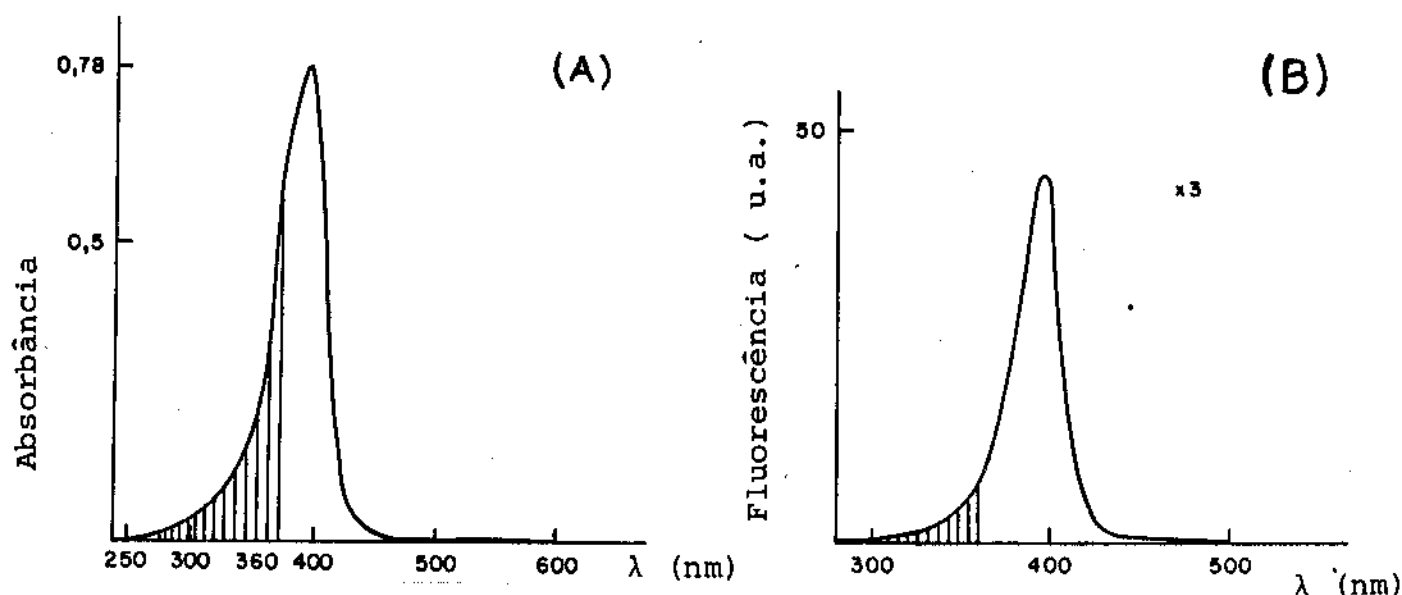


FIGURA 28- Espectros de solução aquosa de HpA 1,25 μ g/ml de preparo recente. (A)- Espectro de absorção. (B)- Espectro de excitação de fluorescência, com comprimento de onda de emissão fixado em $\lambda = 614$ nm.

Os espectros de fluorescência das soluções de Hp em ácido acético e acetona, foram registrados com comprimento de onda de excitação dos lasers de argônio e criptônio, também usados para obtenção dos possíveis espectros Raman e Raman Ressonante. São eles: $\lambda = 488,0$ nm, $\lambda = 514,5$ nm e $\lambda = 568,2$ nm.

As figuras 30-35 mostram a fluorescência acentuada na região do vermelho de todas as soluções. Um aumento da ordem de 2 na intensidade de fluorescência é observado quando a solução de Hp em ácido acético é estocada por 30 dias (figs. 30 e 32), o que não é observado no caso da acetona (figs. 33 e 35).

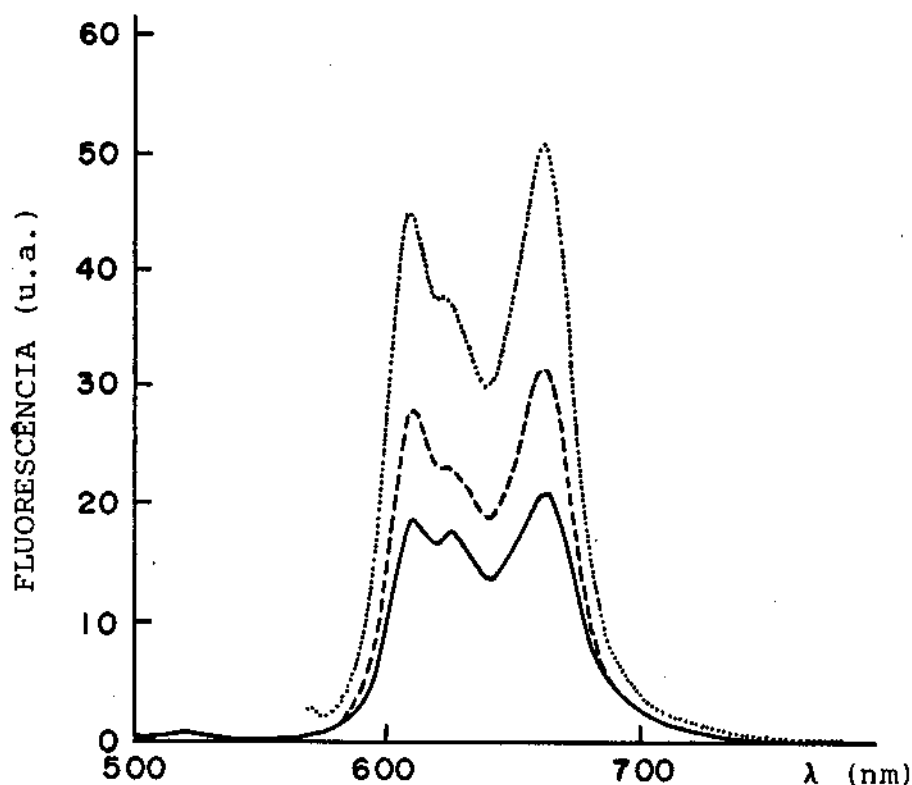


FIGURA 29- Espectros de fluorescência de solução de Hp em ácido acético 1.10^{-4} M, obtidos excitando-se com: (—) $\lambda = 488,0$ nm, (----) $\lambda = 514,5$ nm e (....) $\lambda = 568,2$ nm.

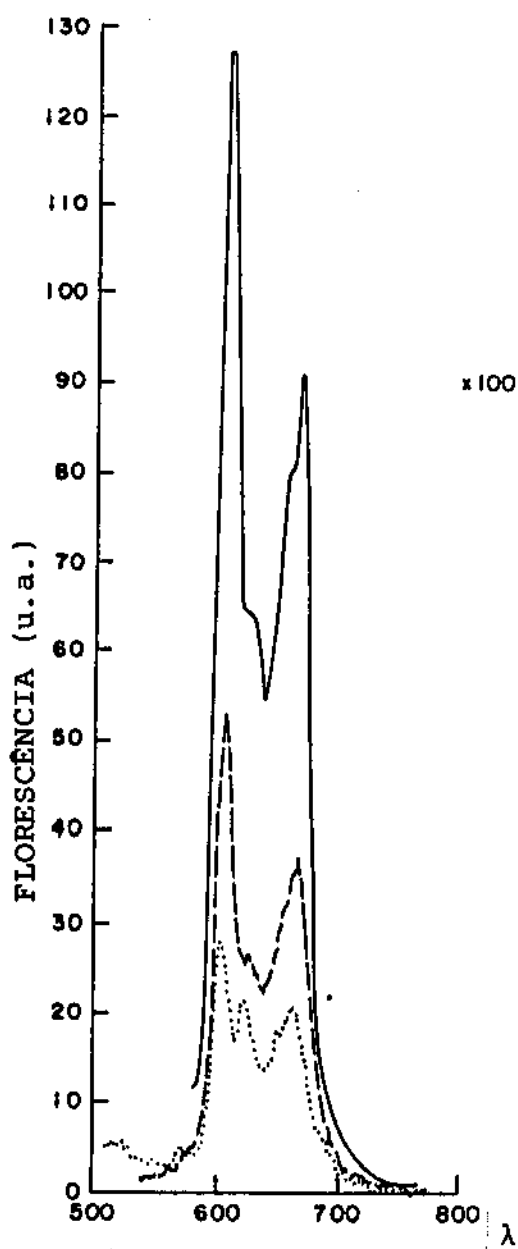


FIGURA 30- Espectros de fluorescência de solução de Hp em ácido acético 1.10^{-6} M, obtidos excitando-se com: (....) $\lambda = 488,0$ nm, (---) $\lambda = 514,5$ nm e (—) $\lambda = 568,2$ nm.

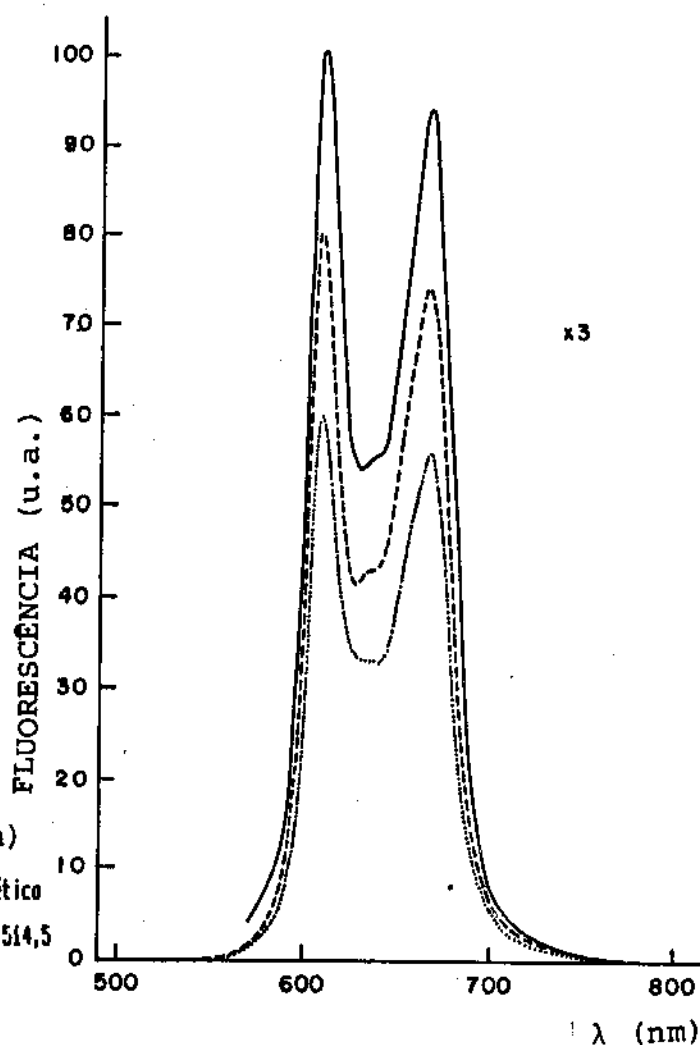


FIGURA 31- Espectros de fluorescência de solução de Hp em ácido acético 1.10^{-4} M, (depois de 30 dias da preparação), obtidos excitando-se com: (....) $\lambda = 488,0$ nm, (---) $\lambda = 514,5$ nm e (—) $\lambda = 568,2$ nm.

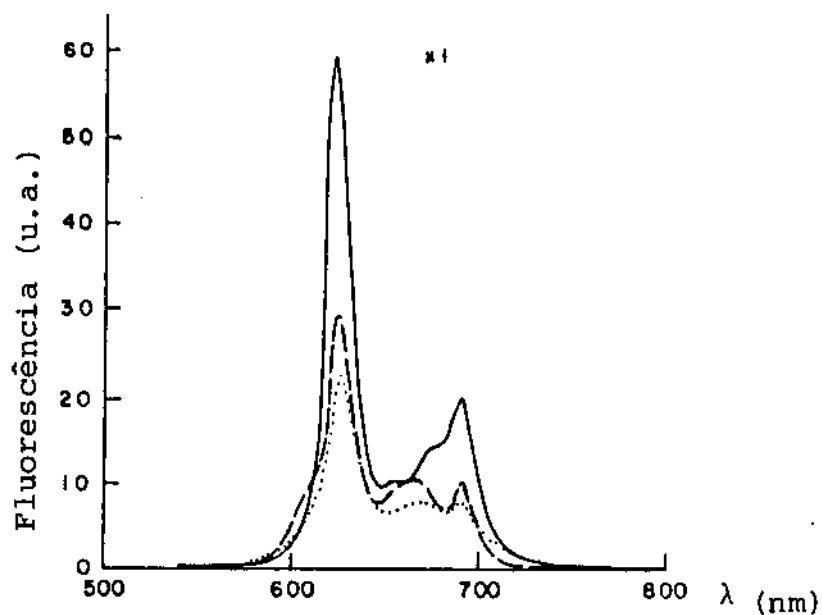


FIGURA 32- Espectros de fluorescência do solução do Hp em acetona 1.10^{-4} M, obtidos excitando-se com: (—) $\lambda = 488,0$ nm, (----) $\lambda = 514,5$ nm e (....) $\lambda = 568,2$ nm.

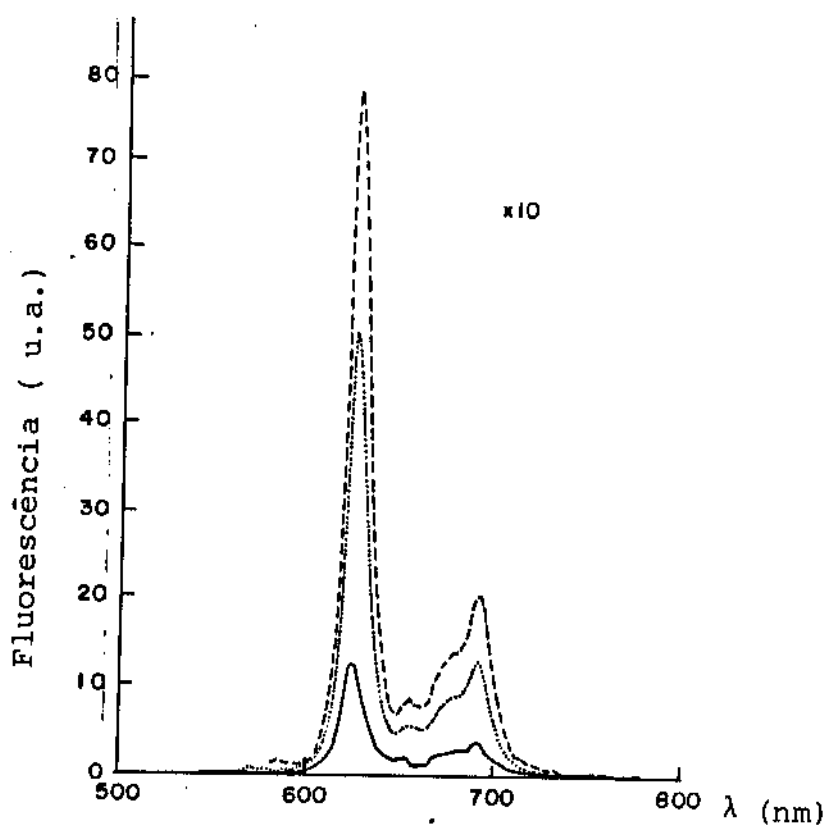


FIGURA 33- Espectros de fluorescência de solução de Hp em acetona 1.10^{-6} M, obtidos excitando-se com: (....) $\lambda = 488,0$ nm, (—) $\lambda = 514,5$ nm e (----) $\lambda = 568,2$ nm.

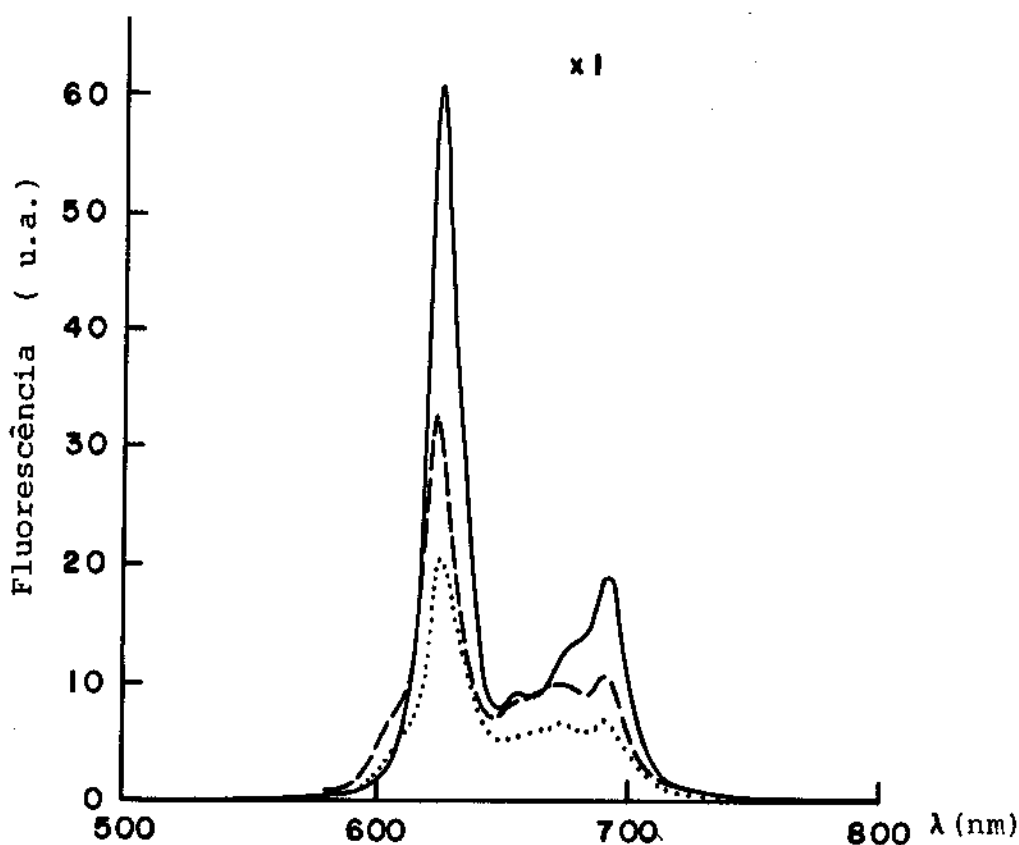


FIGURA 34- Espectros de fluorescência de solução de Hp em acetona 1.10^{-4} M (7 dias da preparação), obtidos excitando-se com: (—) $\lambda = 488,0$ nm, (....) $\lambda = 514,5$ nm e (----) $\lambda = 568,2$ nm.

As figuras 36-38 representam espectros de excitação de fluorescência com comprimento de onda de emissão fixado em $\lambda = 624$ nm. Para o caso da hematoporfirina em acetona (fig. 36), este é o comprimento de onda de máxima fluorescência e tem alta afinidade com o espectro de absorção da mesma amostra (fig.18). As figuras 37 e 38 exibem um pico na região do $\lambda = 665$ nm que não é observado nos espectros de absorção destas amostras.

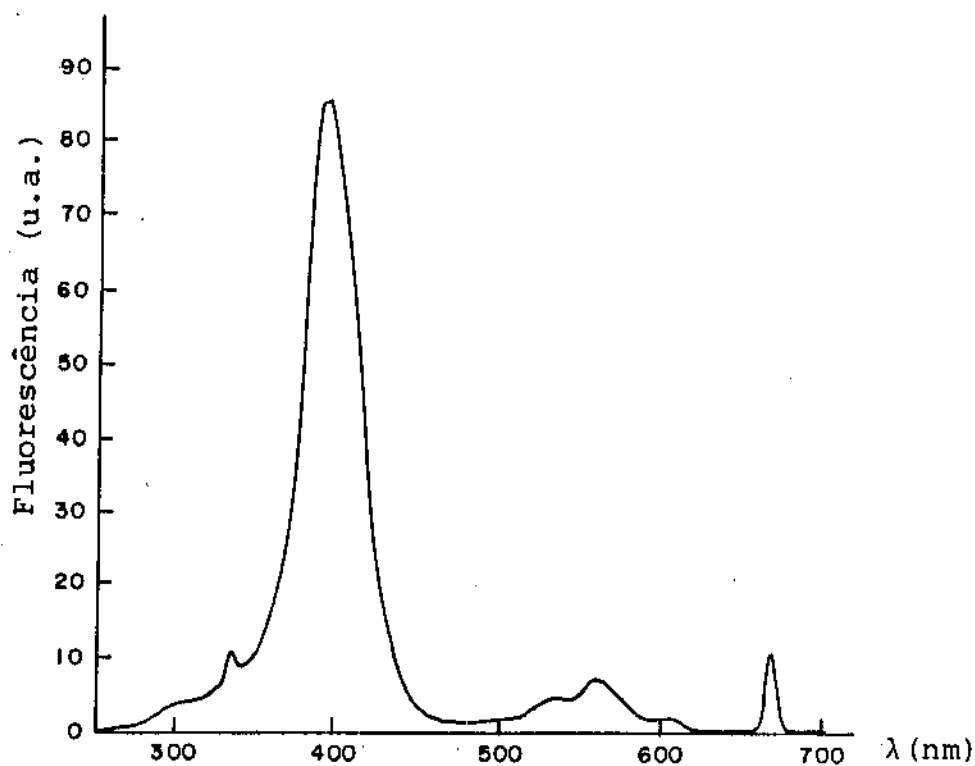


FIGURA 35- Espectro de excitação do fluorescência do solução de Hp em ácido acético 1.10^{-6} M, com comprimento de onda de emissão fixado em $\lambda = 624$ nm.

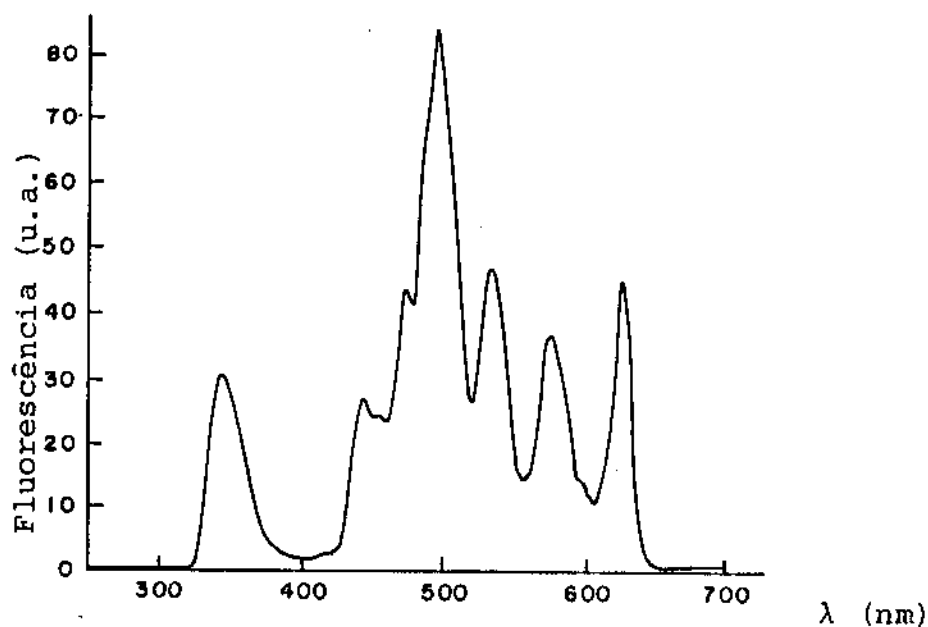


FIGURA 36- Espectro de emissão de fluorescência de solução de Hp em acetona 1.10^{-4} M, com comprimento de onda de emissão fixado em 623 nm.

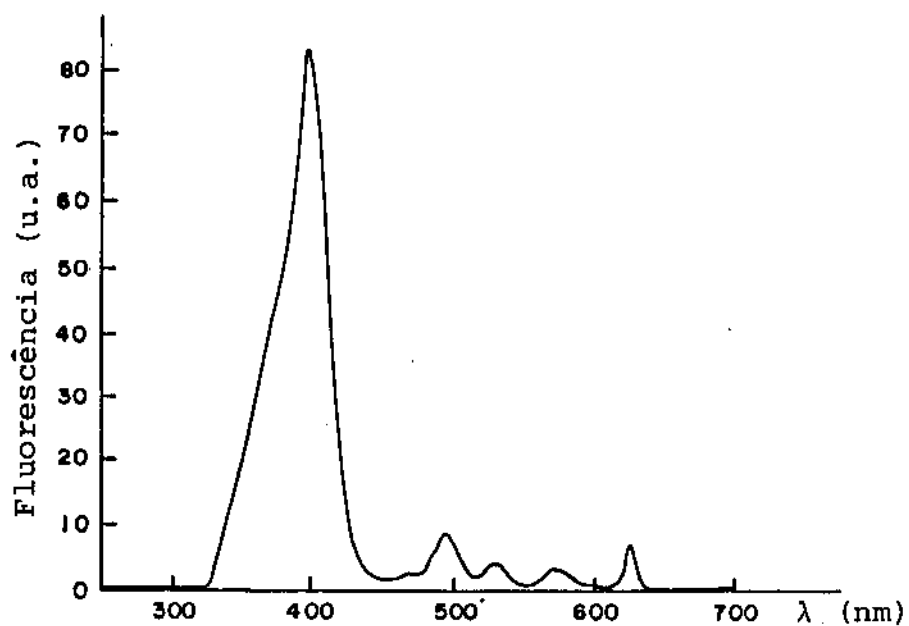


FIGURA 37- Espectro de excitação de fluorescência de solução de Hp em ácido acético 1.10^{-6} M, com comprimento de onda de emissão fixado em $\lambda = 622$ nm.

5.4- RAMAN E RAMAN RESSONANTE

A teoria do espalhamento Raman tem sido citada inúmeras vezes em outras dissertações e teses (o.g.: refs. 81, 82, 83 e 84) e uma vez que não é objetivo deste trabalho repeti-las, apresentaremos apenas alguns conceitos básicos envolvidos no efeito Raman.

Quando um fóton é completamente absorvido ou emitido espontaneamente, como na absorção visível, ultra-violeta, infravermelho normal ou na espectroscopia de emissão, a frequência da radiação incidente está em ressonância com a frequência de transição de níveis de energia da molécula durante o processo. Neste caso, são envolvidos níveis reais do sistema físico em estudo. Existe entretanto a probabilidade de ocorrência de um fenômeno físico óptico, onde não há envolvimento dos níveis reais do sistema. O efeito Raman é um exemplo deste fenômeno.

Quando um fóton incide em um sólido, líquido ou gás, há a probabilidade deste fóton ser espalhado em uma certa direção com a mesma energia que incidiu, isto é, espalhado elasticamente (Espalhamento Rayleigh). Da mesma forma, há também a probabilidade de haver um espalhamento com energia superior ou inferior à energia incidente, constituindo as chamadas linhas anti-Stokes e Stokes do espalhamento Raman (fig. 38).

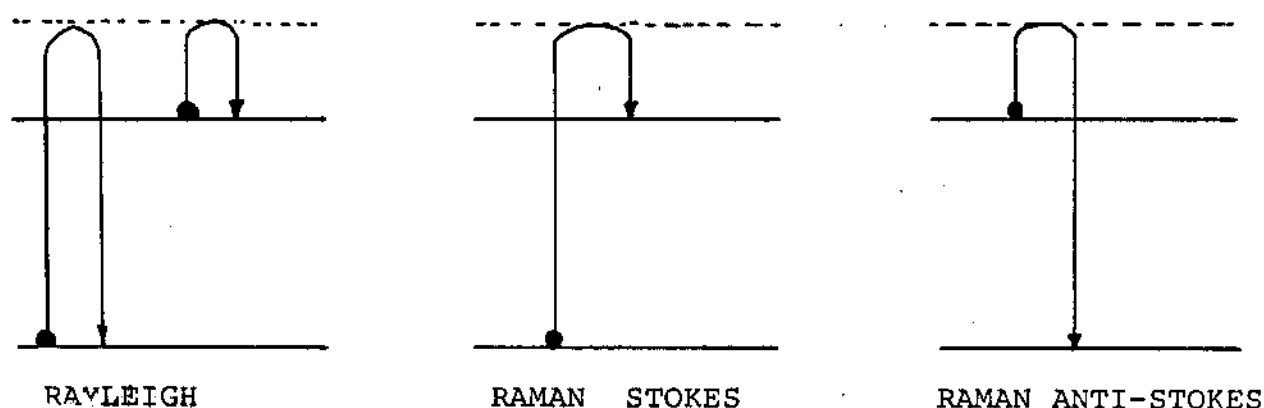


FIGURA 38- Diagrama dos diferentes tipos de espalhamento possíveis.

Como à temperatura ambiente, a maior parte das moléculas de uma amostra está no seu estado fundamental (vibracional mais baixo $v = 0$) e só uma pequena fração está em algum estado excitado; as linhas Raman Stokes de um determinado espectro são mais intensas que as linhas Raman anti-Stokes. O surgimento de linhas Raman não ressonante independe da frequência da radiação incidente.

O efeito Raman Ressonante ocorre quando uma molécula é excitada por uma radiação cuja frequência se aproxima bastante ou coincide com o valor da frequência de uma transição eletrônica desta molécula. Esta frequência é obtida através do espectro de absorção ultra-violeta visível da amostra. A principal característica do espectro Raman Ressonante reside na intensificação dos picos Raman. Para prevenir calor excessivo, efeitos de interação e absorção pela amostra é necessário o uso de baixas concentrações ($1 \cdot 10^{-3}$ M - $1 \cdot 10^{-6}$ M). Nestes casos a característica de intensificação dos picos Raman é muito importante.

Além disto, há um forte compromisso entre a concentração e a formação de agregados moleculares. Assim, para assegurar a existência do monômero, é necessário se usar soluções de concentrações menores que $1 \cdot 10^{-3}$ M. Desta forma, somente o espectro Raman Resonante poderia fornecer informações claras a respeito de nossa amostra.

A hematoporfirina é um meio altamente absorvedor e um forte calor local causa a sua decomposição térmica, levando a precipitação do produto decomposto no fundo da célula. Isto reduz drasticamente a potência do feixe laser que atravessa o fundo da célula, produzindo pontos luminosos intensos, dificultando muito a obtenção dos espectros.

Com os espectros de absorção das soluções de Hp em ácido acético e acetona (figs 14-19) pudemos localizar as frequências de ressonância, e com os espectros de fluorescência (figs. 29-37) localizamos os picos de emissão das soluções.

Excitando-se amostras de ácido acético 100% e acetona 100% com $\lambda = 514,5\text{nm}$ e $\lambda = 488,0\text{ nm}$, obtivemos os espectros Raman destes solventes. As linhas observadas concordam com a literatura (refs 85 e 86 respectivamente).

A figura 39 apresenta os espectros Raman do ácido acético. Os picos Raman estão localizados à 447 cm^{-1} , 625 cm^{-1} , 895 cm^{-1} , 1015 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} , 1367 cm^{-1} , 1433 cm^{-1} , 1672 cm^{-1} , 1700 cm^{-1} , 1720 cm^{-1} , 1760 cm^{-1} e 2942 cm^{-1} .

A figura 40 apresenta os espectros Raman da acetona. Os picos Raman estão localizados à 392 cm^{-1} , 492 cm^{-1} , 531 cm^{-1} , 784 cm^{-1} , 1067 cm^{-1} , 1220 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1425 cm^{-1} , 1705 cm^{-1} , 2700 cm^{-1} , 2844 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} e 3002 cm^{-1} .

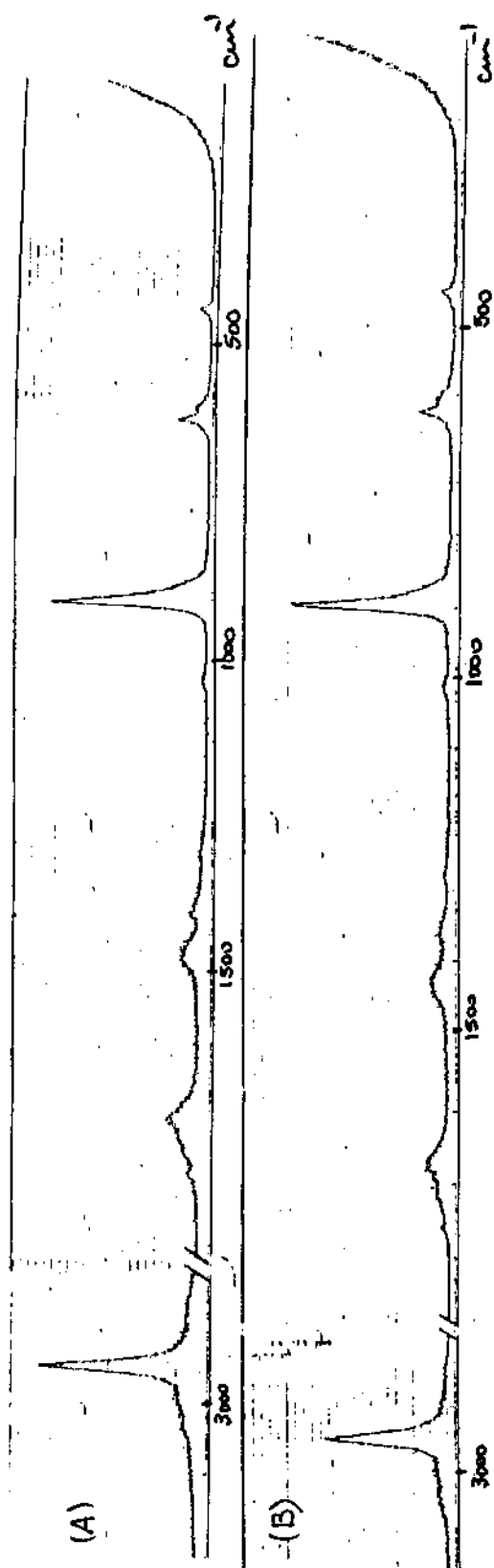


FIGURA 39- Espectro Raman do ácido acético glacial. (A) Excitação com $\lambda = 514,5$ nm. Picos máximos em 895 e 2910 cm^{-1} . (B) Excitação com $\lambda = 488,0$ nm. Picos máximos em 895 e 2942 cm^{-1} .

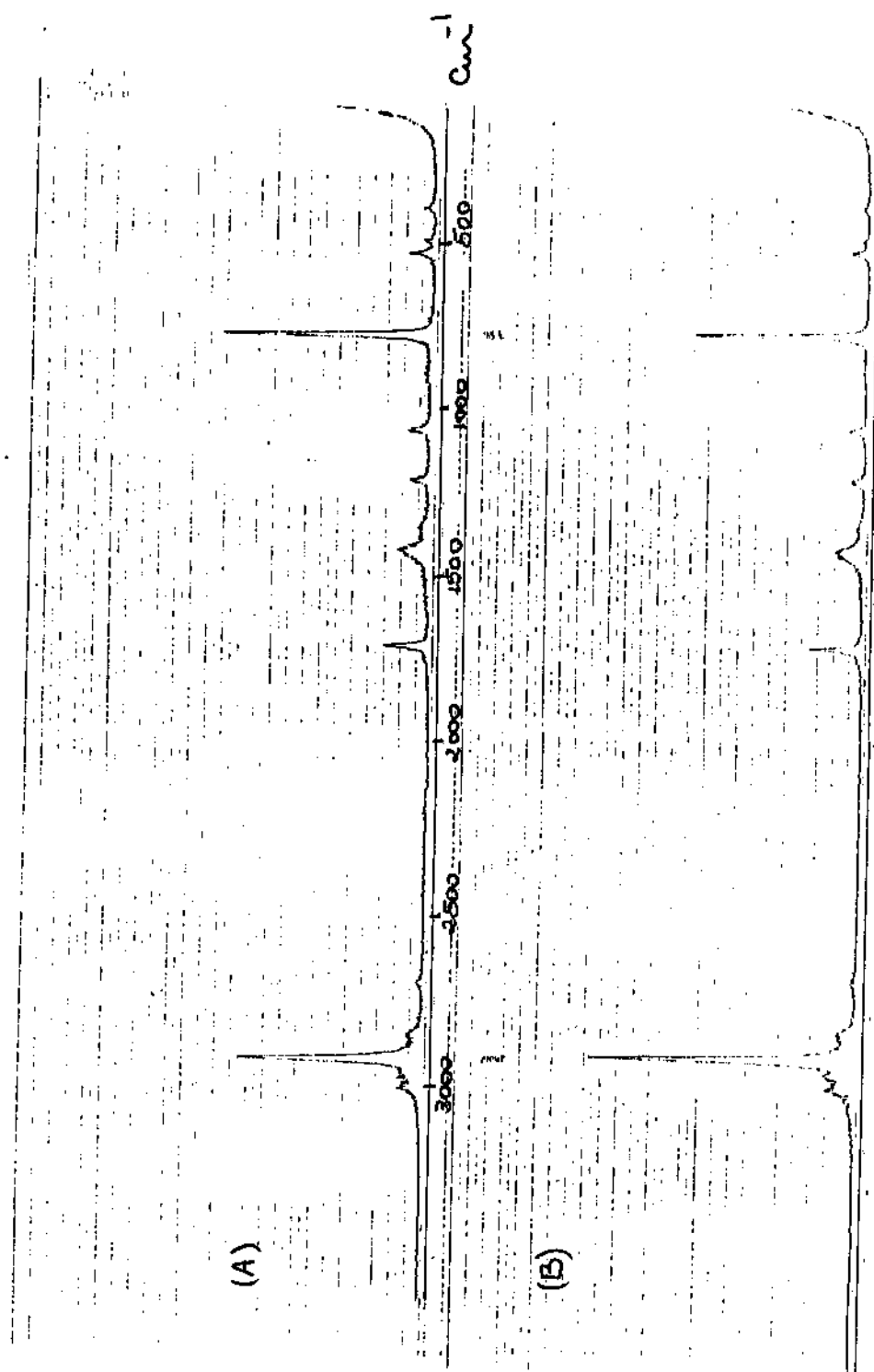


FIGURA 40- Espectros Raman da acetona. (a) Excitação com $\lambda = 514,5 \text{ nm}$. (b) Excitação em $\lambda = 488,0 \text{ nm}$. Picos máximos em 784 e 2920 cm^{-1}

A figura 41 oxibo o espectro óptico do emissão do solu-
ção de hematoporfirina em ácido acético 1.10^{-4} M, recém colocada na
célula, o excitada com $\lambda = 568,2$ nm, o a figura 42 oxibo o espectro
de solução de hematoporfirina em ácido acético 1.10^{-6} M, excitada com
 $\lambda = 514,5$ nm, depois do ter permanecido algum tempo sob a luz do la-
ser.

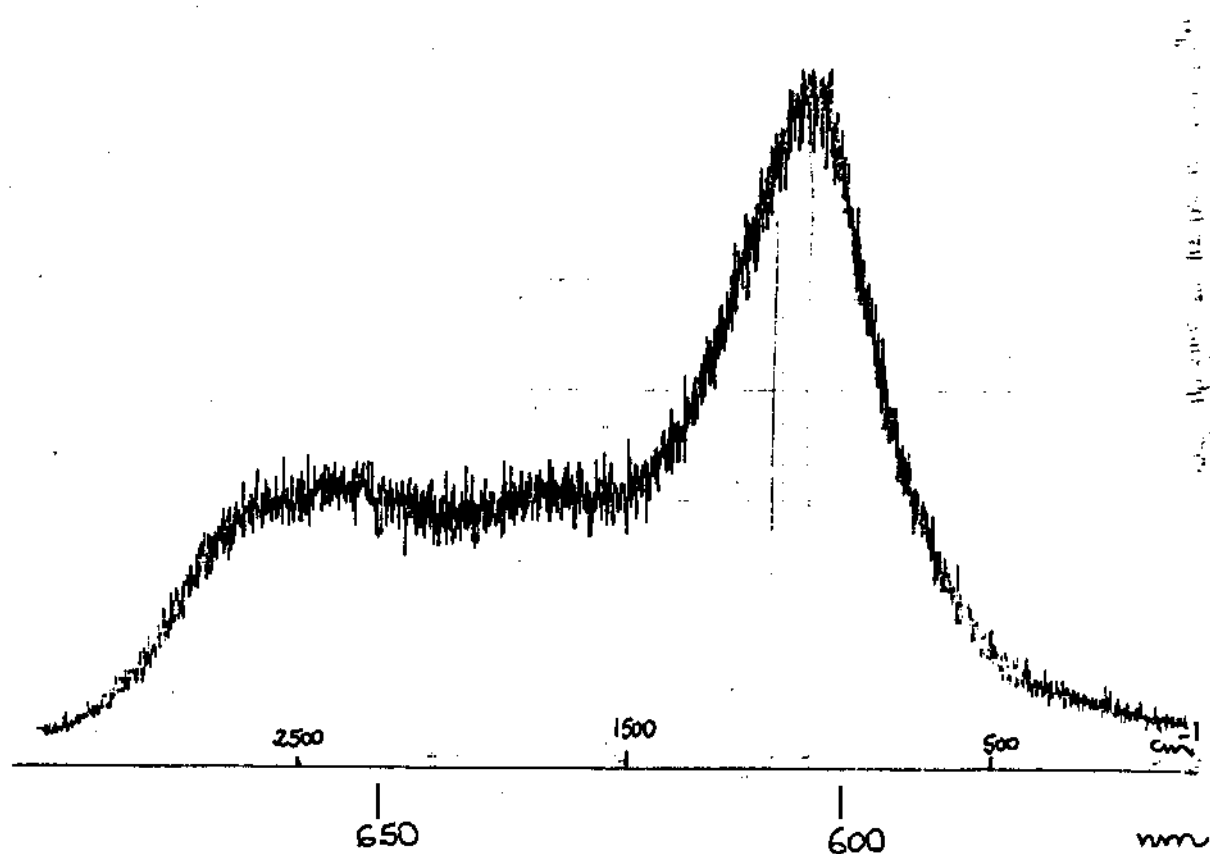


FIGURA 41- Espectro de emissão de solução de Hp em ácido acético
 1.10^{-4} M. Excitação em $\lambda = 568,2$ nm.

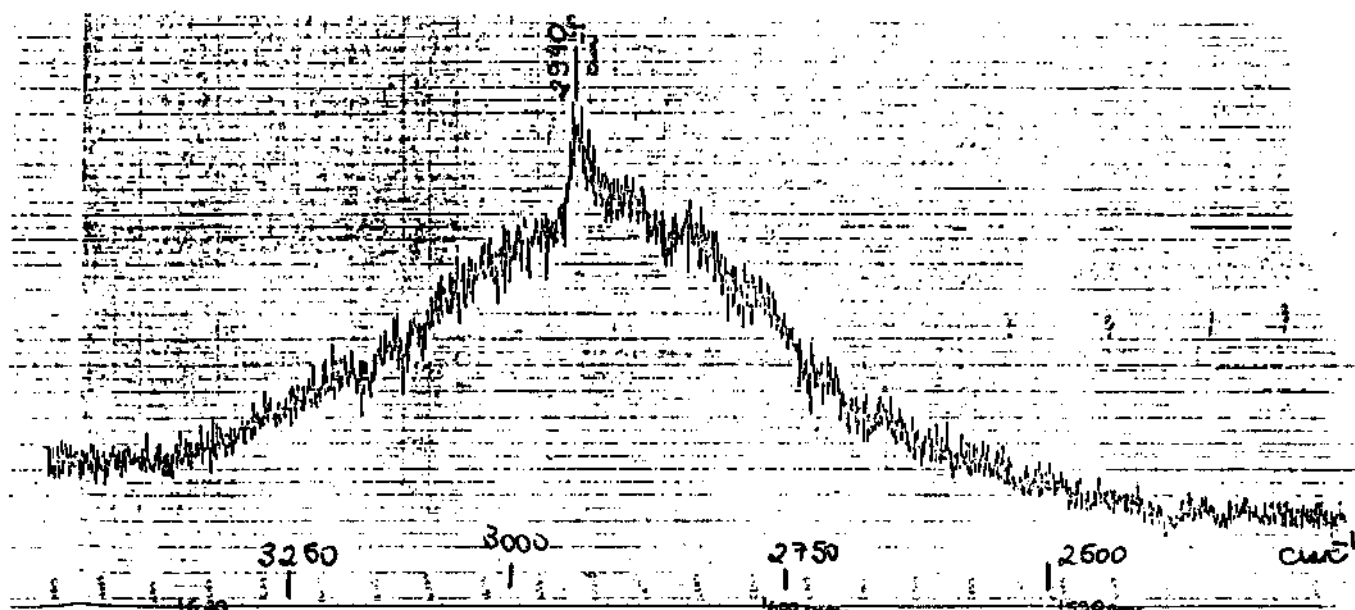


FIGURA 42- Espectro de emissão do solução do Hb em ácido acético 1.10^{-6} M. Excitação em $\lambda = 514,5$ nm.

Podemos observar que as bandas de emissão são bem largas, o não se repetem nas mesmas posições nos dois espectros, mostrando que não aparecem picos Raman do soluto (hematoporfirina). A banda mais intensa na figura 41, localizada em ≈ 1050 cm^{-1} , representa uma superposição do pico Raman do solvente ≈ 1015 cm^{-1} (fig. 39) e principalmente da banda de fluorescência em $\lambda = 608$ nm (1152 cm^{-1}). As bandas menos intensas em ≈ 1750 cm^{-1} ($\lambda = 630$ nm) e ≈ 2350 cm^{-1} ($\lambda = 655$ nm) representam as outras bandas de fluorescência da amostra, observadas na figura 29. A banda larga da figura 42 representa a superposição do pico Raman mais intenso do solvente, ≈ 2942 cm^{-1} (fig 39), e da banda mais intensa de fluorescência em $\lambda = 608$ nm (2988 cm^{-1}), observada na figura 29.

O espectro de emissão de solução de hematoporfirina em acetona 1.10^{-4} M, excitando-se com $\lambda = 514,5$ nm, está representado nas figuras 43 (até 1500 cm^{-1}) e 44 (de 1600 cm^{-1} até 4400 cm^{-1}).

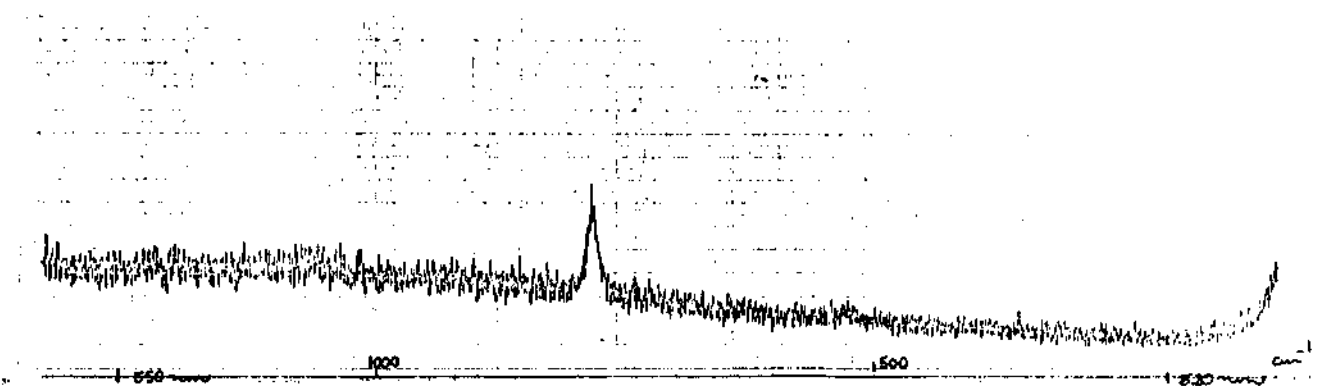


FIGURA 43- Espectro de emissão de solução de Hp em acetona 1.10^{-4} M.
Excitação em $\lambda = 514,5$ nm.

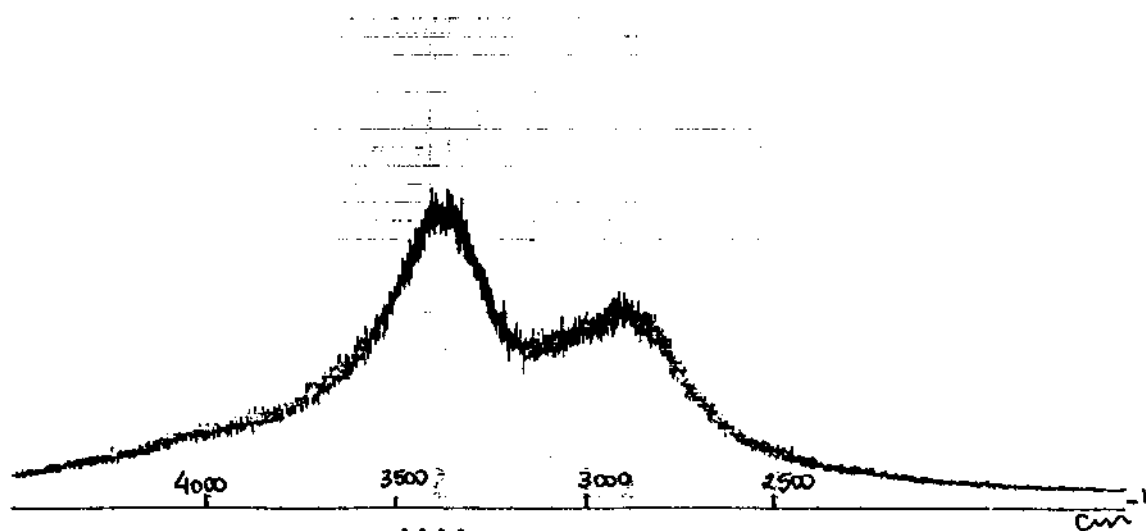


FIGURA 44- Espectro de emissão de solução de Hp em acetona 1.10^{-4} M.
Excitação em $\lambda = 514,5$ nm.

O pico observado na figura 13 em 784 cm^{-1} , é o segundo pico Raman mais intenso do solvente (fig. 40). Na figura 14 observamos dois pronunciamentos respectivamente em $\approx 2910\text{ cm}^{-1}$ e $\approx 3370\text{ cm}^{-1}$. O primeiro se refere ao pico Raman mais intenso do solvente (fig. 40), e o segundo, à localização mais intensa da fluorescência (fig. 32) $\lambda = 622\text{ nm}$ (3370 cm^{-1}).

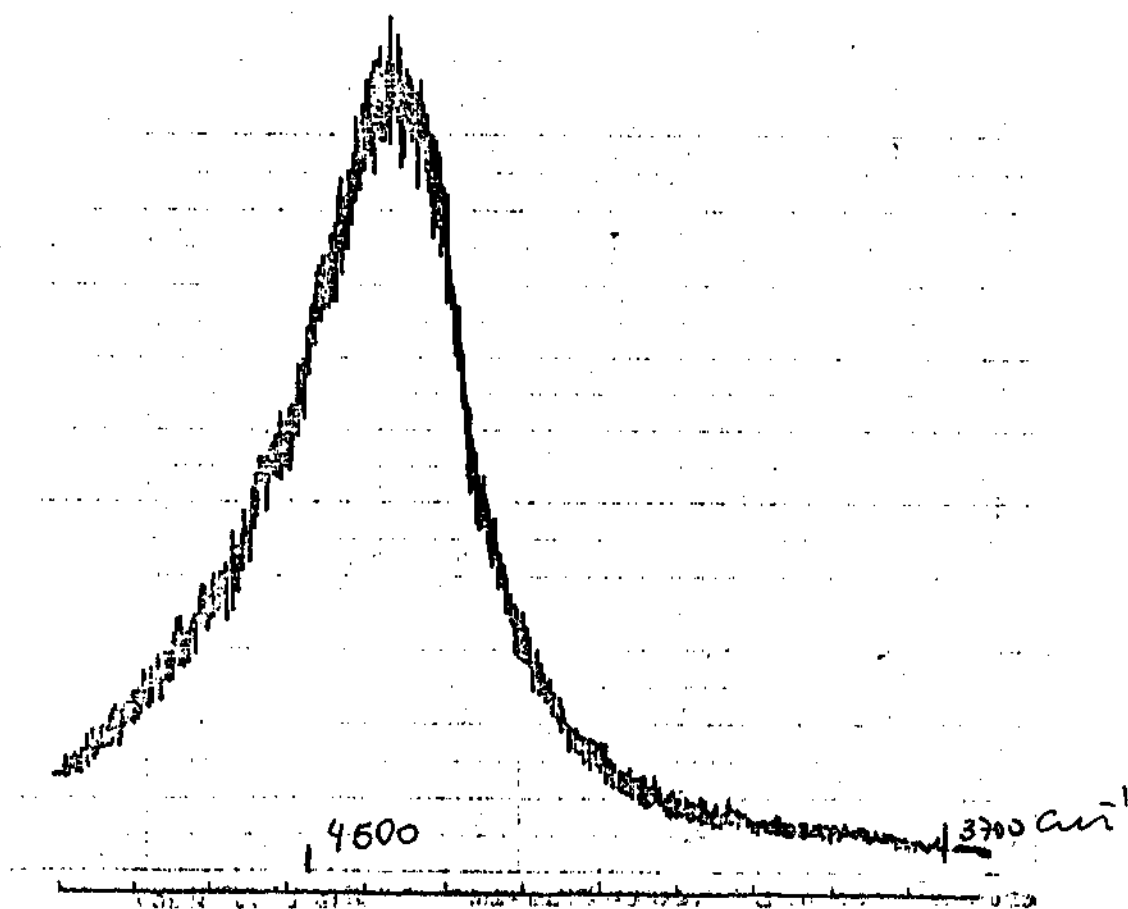


FIGURA 15- Espectro de emissão de solução de Hp em acetona 1.10^{-4} M .
Excitação em $\lambda = 488,0\text{ nm}$.

Na figura 45 observamos o espectro de emissão de solução de hematoporfirina em acetona 1.10^{-4} M, obtido excitando-se a amostra com $\lambda = 488,0$ nm. Neste espectro observamos em ≈ 1415 cm^{-1} ($\lambda = 620$ nm, fig. 32), o mesmo pico de fluorescência observado na figura anterior (44).

Nossos espectros de emissão não concordam com aqueles da única referência que trata do efeito Raman e Raman Resonante da hematoporfirina (ref. 87). A figura 46 (figura 02 da ref. 87) exibe o espectro Raman Resonante, não polarizado, de solução aquosa de Hp purificada, em acetona 1.10^{-4} M. Esta mesma referência apresenta também as frequências características do espectro Raman Resonante de solução de hematoporfirina em ácido acético 1.10^{-4} M, obtida com os diferentes comprimentos de onda de excitação provenientes do laser de argônio, sem entretanto exibir seu perfil. Estas frequências são atribuídas a determinadas vibrações do anel pirrólico, com o auxílio de uma tabela de frequências Raman características de compostos orgânicos (ref. 88).

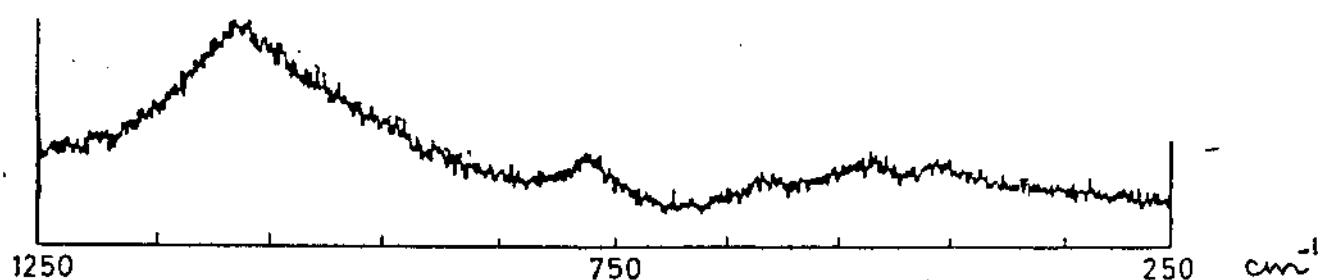


FIGURA 46- Espectro Raman Resonante de solução de Hp em acetona 1.10^{-4} M. (ref. 87).

A tabela 07 exibe os dados indicados na ref. 87 e as frequências Raman do ácido acético e acetona que determinamos (confirmadas na literatura).

FREQUÊNCIAS

RAMAN RESSONANTE (cm^{-1}) (ref. 87)	RAMAN DO SOLVENTE (cm^{-1})
---	--

solução de Hp 1.10^{-4} M em:	ácido acético
---------------------------------	---------------

443	447
-----	-----

540	
-----	--

615	625
-----	-----

1090	
------	--

solução de Hp 1.10^{-4} M em:	acetona
---------------------------------	---------

490	492
-----	-----

536	531
-----	-----

619	
-----	--

1094	1067
------	------

TABELA 07- Comparação das frequências atribuídas a picos Raman da hematoporfirina e dos picos Raman dos solventes usados .

Em nossas medidas dos espectros Raman e luminescência tivemos sérios problemas com a degradação da amostra, como queda brusca do sinal por alguns instantos e diminuição lenta da intensidade do sinal, observado com o tempo de exposição da amostra à luz. Esta degradação poderia ser minimizada se utilizássemos acessórios mais indicados para a realização da montagem das medidas ópticas com laser, como uma célula rotativa refrigerada (ref. 89).

A análise dos espectros de emissão obtidos é dificultada pela ocorrência desta degradação não controlada, e pela proximidade das linhas Raman do solvente e linhas Raman Ressonante citadas na referência 87. Além disso, em nossos experimentos dopamos sempre com a presença de bandas de emissão fluorescente na região de estudo.

Tudo isto dificulta a identificação definitiva dos espectros Raman registrados.

CONCLUSO

CONCLUSÃO

Ao planejar a presente dissertação pensávamos que, com razoável esforço poderíamos nos ater ao estudo das propriedades ópticas da hematoporfirina e alguns de seus derivados, que por si só representa um sistema físico digno de estudo: o elevado número de constituintes das moléculas de cada derivado; a variedade de derivados que mantêm entre si certas semelhanças físicas e químicas, bem como a existência de um razoável número de propriedades físicas da área óptica, certamente propiciam estudos extensivos, enriquecendo o acervo de conhecimentos físicos.

Entretanto, nosso contacto com a área médica nos levou a redimensionar o estudo, não somente pelo valor social que a Terapia Fotodinâmica do Câncer (PDT) representa, mas também pelo campo de pesquisa física que se abriu recentemente neste assunto.

Podemos então resumir como conclusões do estudo documentado aqui, duas afirmativas, a saber:

1ª- A PDT é um processo Físico-Químico-Biológico baseado em conceitos e princípios estritamente científicos. Embora os resultados práticos pareçam do cunho sensacionalista, a terapia, bem conduzida, é realmente uma poderosa arma no combate ao câncer. Devido ao seu carácter interdisciplinar, é aconselhável que a implantação em nosso país, a exemplo de outros centros, seja feita com a participação, além do médicos, de físicos e químicos com experiência no assunto.

2ª- Detendo-se agora ao ponto de vista físico do traba-

lho, principalmente das propriedades ópticas da hematoporfirina (Hp) e de seus derivados, verificamos que há muito a ser feito. A nossa principal contribuição recai na dúvida lançada e discutida sobre o espectro Raman publicado da hematoporfirina.

A primeira conclusão é autoexplicativa e justifica o cuidado que tivemos em levantar os dados históricos, o cuidado que tivemos em consultar fontes bibliográficas dignas do crédito e a felicidade que tivemos em conseguir entusiasmar profissionais de outras áreas, que nos deram subsídios para entender o processo "in totum". Acreditamos que nosso trabalho possa servir de base para a implantação definitiva da PDT no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

Complicando um pouco mais, o nosso sistema é de uma solução onde a individualidade solvente-soluto é mantida dentro de certos limites. Comparando-se os nossos resultados Raman do solvente puro com o da solução, chegamos a conclusão de que linhas anteriormente publicadas como provenientes da hematoporfirina, são na realidade, linhas do solvente.

Como todo trabalho pioneiro em um dado campo dificilmente pode ser considerado completo, essa dissertação também não o é. Deixando-se de lado as limitações laboratoriais de nosso meio, sugerimos como continuação do trabalho, o aproveitamento, pela área médica, da experiência acumulada na preparação da substância adequada e na determinação da dose de radiação laser. Na área da Física, o mais imediato seria a tentativa de obter o espectro Raman utilizando-se uma célula rotativa, possivelmente refrigerada, em condições ideais de concentração das soluções em estudo e potência de excitação, preferencialmente com o uso de um sistema laser de argônio e laser de co-

ranto (sintonizável).

REFERENCIAS

- 01- Spikes, J.D.. The historical development of an application of photosensitized reactions in the health sciences. In: Primary-photoprocesses in biology and medicine. Eds. Bensasson, R.V., Jori, G., Land, E. J., Truscott, T.G.. Plenum Publishing Co., 1985. p.209-227.
- 02- Parrish, J.A.. The scope of photomedicine. In: The science of photomedicine. Eds. Regan, J.D., Parrish, J.A.. NY, Plenum Press, 1982. Apud 01.
- 03- Morison, W.L.. Phototherapy and photochemotherapy of skin diseases. Praeger Publishers, 1983. Apud 01.
- 04- Raab, O.. Ueber die Wirkung fluorescieren der Stoffe auf Infusorien. Z.Biol., 39: 524, 1900. Apud 01.
- 05- von Tappeiner, H.. Ueber die Wirkung fluorescieren der Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O.Raab. Munch. Med. Wochenschr. 47: 5, 1900. Apud 01.
- 06- von Tappeiner, H., Jesionek, A.. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Munch.Med.Wochenschr. 50: 2042, 1903. Apud 01, 21 o 22.
- 07- Hausmann, W.. Die sensibilisierender Wirkung tierischer Farbstoffe und ihre physiologische Bedeutung. Wien. klin. Wochenschr. 21: 1527-1529, 1908. Apud 14.
- 08- Hausmann, W.. Ueber die giftige Wirkung des Haematoporphyrins auf Warmbluter bei Belichtung. Wien. klin. Wochenschr. 22: 1820-1821, 1909. Apud 14.

- 09- Meyer-Betz, F.. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Haematoporphyrins und andere Derivate des Blut und Gallenfarbstoffs. Deutsches Arch. klin. Med. 112: 476-503, 1913. Apud 14.
- 10- Pollicard, A.. Etudes sur les aspects offerts par des tumeur experimentales examinees a la lumiere de woods. CR Soc. Biol. 91: 1423, 1924. Apud 21.
- 11- Auler, H., Banzer, G.. Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulst kranken Menschen und Tieren. Z. Krebsforsch. 53: 65, 1942. Apud 01, 21 o 22.
- 12- Figge, F.H.J., Weiland, G.S., Manganicello, L.O.. Cancer detection and therapy affinity of neoplastic embryonic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins. Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 68: 640, 1948. Apud 21.
- 13- Schwartz, S.K., Absolon, H., Vermud, H.. Some relationships of porphyrins, X-ray and Tumors. Bull. Minnesota Univ. School Med. 27: 7-23, 1955. Apud 14.
- 14- Lipson, R.L., Baldes, E.J.. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. Arch. Derm. 82: 508-516, 1960.
- 15- Lipson, R.L., Gray, M.J., Baldes, E.J.. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. Proc. 9th. Int. Can. Cong. p.393, 1966. Apud 22.
- 16- Gregorie, H.B.Jr., Henger, E.O., Ward, J.L., Green, J.F., Richards, T., Robertson, H.C.Jr., Stevensen, T.B.. Hematoporphyrin derivative fluorescence in malignant neoplasms. Ann. Surg. 167: 820-828, 1968.
- 17- Diamond, I., Grannelli, A.F., McDonagh, A.F., Nielson, A.F., Wilson, C.B., Jaenicke, R.. Photodynamic therapy of malignant tumors. Lancet. 2:

1175, 1972. Apud 01 e 21.

18- Dougherty, T.J.. Activated dyes as anti-tumor agent. J. Natl. Cancer Inst. 51: 1333, 1974.

19- Dougherty, T.J., Grindey, G.B., Fied, R., Weishaupt, K.R., Boyle, D.G.. Photoradiation therapy: cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. J. Natl. Cancer Inst. 55: 115, 1975.

20- Weishaupt, K.R., Gomer, C.J., Dougherty, T.J.. Identification of Singlet oxygen as the cytotoxic agent in cancer photoinactivation of a murine tumor. Cancer Res. 36: 2326-2329, 1976.

21- Dougherty, T.J.. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. CR. Rev. Oncol./Hematol. Ed. Davis, S.. CRC Press. 2: 83-116, 1984

22- Dougherty, T.J., Weishaupt, K.R., Boyle, D.G.. Photodynamic therapy of cancer. In: Principles & Practice of Oncology. Eds. DeVita, V., Hellman, S., Rosenberg, S.A.. J.B. Lippincott. Spring, 1985. pre-print.

23- Dougherty, T.J., Kaufman, J.E., Goldfarb, A., Weishaupt, K.R., Boyle, D., Mettlemann, A.. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. Cancer Res. 38: 2628-2633, 1978.

24- Selman, S.H., Kreimer-Birnbaum, M., Klauning, J.E., Goldblatt, P.J., Keck, R.W., Britton, S.. Blood flow in transplantable bladder tumors treated with hematoporphyrin derivative and light. Cancer Res. 44: 1924-1927, 1984.

25- Selman, S.H., Kreimer-Birnbaum, M., Keck, R.W., Milligan, A.J., Goldblatt, P.J., Britton, S.. Correlation of tumor blood flow to tumor regression after hematoporphyrin derivative (HpD) photodynamic therapy to transplanted bladder tumors. In: Methods in porphyrins photosensitization. Ed. Kossel, D.. Plenum Publishing Co., 1985. p. 97-103.

26- Clezy, P.S., Hal, T.T., Henderson, R.W., van Thuc, L. The chemistry of

- pyrrolic compounds XLV. Hematoporphyrin derivative: Hp diacetate as the main product of the reaction of Hp with a mixture of acetic and sulfuric acids. Aust. J. Chem. 33: 585-597, 1980.
- 27- Dougherty, T.J., Lawrence, G., Kaufman, J.H., Boyle, D., Welshaupt, K. R., Goldfarb, A.. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 62: 231-237, 1979.
- 28- Henderson, R.W., Christie, G.S., Clezy, P.S., Lincham, J.. Hematoporphyrin diacetate: a probe to distinguish malignant from normal tissues by selective fluorescence. British J. Exp. Pathol. 61: 345-350, 1980.
- 29- Momenteau, M., Ropas, C., Rougée, M.. Purification par chromatographie d'une hematoporphyrine commerciale. J. Chem. Phys. 65:1637-1639, 1968.
- 30- Borembaum, M.C., Bonnet, R., Scourides, P.A.. In vivo biological activity of the components of hematoporphyrin derivative. British J. Cancer 45: 571-581, 1982.
- 31- Bonnet, R., Lambert, C., Land, E.J., Scourides, P.A., Sinclair, R.S., Truscott, T.G.. The triplet and radical species of hematoporphyrin and some of its derivatives. Photochem. Photobiol. 38: 1-8, 1983.
- 32- Cowled, P.A., Forbes, I.J., Swincer, A.G., Tenerry, V.C., Ward, A.D.. Separation and phototoxicity in vitro of some of the components of hematoporphyrin derivative. Photochem. Photobiol. 41: 445-451, 1985.
- 33- Dougherty, T.J., Boyle, D.G., Welshaupt, K.R., Henderson, B.A., Potter, W.R., Belnier, D.A., Wiltyk, K.E.. Photoradiation therapy- Clinical and drug advances. In: Porphyrin photosensitization. Eds. Kessel, D., Dougherty, T.J.. Plenum Publishing Co. 1983. pre-print.
- 34- Moan, J., Sommer, S.. Fluorescence and absorption properties of the components of the hematoporphyrin derivatives. Photobiochem. Photo-

biophys. 3: 93-103, 1981.

35- Moan, J., Sanderberg, S., Christensen, T., Elander, S.. Hematoporphyrin derivative: chemical composition, photochemical and photosensitizing properties. In: Porphyrin properties. Eds. Kossol, D., Dougherty, T.J.. Plenum Pressing 1983, p. 165-179.

36- Moan, J., Boyle, E., Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cells sensitized by hematoporphyrin. Photobiochem. Photobiophys. 2: 301, 1981. Apud 21.

37- Dougherty, T.J., Potter, W.R., Weiskaupt, K.R.. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. In: Porphyrin localization and treatment of tumors. Ed. Dolron, D.R. Alan Liss Inc., 1984, pre-print.

38- Braslavsky, S.. Comunicação privada.

39- Lipson, R.L., Baldes, E.J. Use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. J. Natl. Cancer Inst. 26: 1-8, 1961.

40- Moan, J., Steen, H.B., Feron, K., Christensen, T.. Uptake of hematoporphyrin derivative and sensitized photoinactivation of C3H cell with different oncogenic potential. Cancer Lett. 14: 291, 1981.

41- Chang, C., Dougherty, T.J.. Photodynamic therapy: kinetics and thermodynamics of porphyrin uptake and loss in normal and malignant cell in culture. Radiat. Res. 74: 493, 1978.

42- Moan, J., Boye, E.. Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cell sensitize by hematoporphyrin. Photobiochem. Photobiophys. 3: 93-103, 1981.

43- Moan, J., Johannesen, J.V., Christensen, T., Espevik, T., McGhie, J.B.. Porphyrin sensitized photoinactivation of human cell 'in vitro'. Am. J. Pathol. 109: 184-192, 1982

- 44- Christensen, T., Sangquist, T., Feren, K., Waksvik, H., Moan, J.. Retention and photodynamic effects of hematoporphyrin derivative in cells after prolonged cultivation in the presence of porphyrin. *British J Cancer* 48: 35-43, 1983.
- 45- Evensen, J.F., Sommer, S., Moan, J., Christensen, T.. Tumor localizing and photosensitizing properties of the main components of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.* 44: 482-486, 1984.
- 46- Moan, J., Sommer, S.. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NH1K 3025 Cells. *Cancer Res.* 45: 1608-1610, 1985.
- 47- Kessel, D., Cheng, M.. Biological and biophysical properties of the tumor localizing component of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.* 45: 3053-3057, 1985.
- 48- Kessel, D., Cheng, M.. On the preparation and properties of dihematoporphyrin ether, the tumor localizing component of HpD. *Photochem Photobiol.* 41: 277-282, 1985.
- 49- Moan, J., Rimington, C., Western, A.. The binding of dihematoporphyrin ether to human serum albumin. *Clin. Chim. Acta* 145: 227-236, 1985.
- 50- Moan, J.. Porphyrin sensitized photodynamic inactivation of cells: A review. *Laser Med. Scien.* 1: 1-11, 1986.
- 51- Moan, J., Rimington, C., Evensen, J.F., Western, A.. Binding of porphyrins to serum proteins. In: *Methods in porphyrin photosensitization*. Ed. Kessel, D.. Plenum Publishing Co., 1985, p. 193-205.
- 52- Dougherty, T.J., Thoma, R.C., Boyle, D.G., Weishaupt, K.R.. Interstitial photoradiation therapy for primary solid tumors in pet cats and dogs. *Cancer Res.* 41: 401-404, 1981.
- 53- Dougherty, T.J.. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors.

Photochem. Photobiol. 38: 377-379, 1983.

54- Bugelski, P.J., Porter, C.W., Dougherty, T.J.. Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse. Cancer Res. 41: 4606, 1981. Apud 44.

55- Hayata, Y., Okato, H., Ono, J., Matsushima, Y., Hayashi, N., Saito, T., Kawato, N.. Fluorescence fiberoptic bronchoscopy in the diagnosis of early stage lung cancer. In: Recent results in cancer research. Springer-Verlag, Berlin. vol 82, 1982. p. 121. Apud 21

56- Balchun, D.J., Dolron, D.R., Huth, G.C.. Special issue: Hematoporphyrin derivative photoradiation therapy. Laser Surg. Med. 4: 13-20, 1984.

57- King, E.G., Dolron, D., Man, G., Profio, A.E., Huth, G.. hematoporphyrin derivative as a tumor marker in the detection and localization of pulmonary malignancy. In: Recent Results in cancer research. Springer-Verlag, Berlin. vol 82, 1982, p. 90. Apud 21.

58- Cortese, D.A., Kinsey, J., Woolner, L.B., Payne, W.Q.S., Sanderson, D.R., Fontana, R.S.. Clinical application of a new endoscopic technic for detection of 'in situ' bronchial carcinoma. Mayo Clin. Proc. 54: 635, 1979. Apud 21.

59- Benson, R.C., Jr., Farrow, G.M., Kinsey, J.H., Cortese, D.A., Zincke, H., Utz, D.C.. Detection and localization of in situ carcinoma of the bladder with hematoporphyrin derivative. Mayo Clin. Proc. 57: 548, 1982. Apud 21.

60- Laser in Surgery and Medicine, Special number, 4, 1984.

61- Porphyrin Photosensitization Workshop. Wayne State University, Sheraton University City. Detroit, USA, Julho, 1986.

62- Hayata, Y., Kato, H., Konaka, C., Ono, J., Takizawa, N.. Hematoporphyrin

rin derivative in laser photoradiation in the treatment of lung cancer. Chest. 81: 269-277, 1982.

63- Hayata,Y., Kato,H., Konaka,C., Ono,J., Amemiya,R., Kinoshita,K, Sakai,H., Yamada,R.. Hematoporphyrin derivative in laser photoradiation in the therapy in early stage lung cancer. Laser Surg. Med. 4: 39-48, 1984.

64- Kato,H., Aizawa,K., Ono,J., Konaka,C., Kawate,N., Yoneyama,K., Kinoshita,K., Nishimiya,K., Sakai,H., Noguchi,M., Tomono,T., Kawasaki, S., Touda,Y., Hayata,Y.. Clinical measurement of tumor fluorescence using a new diagnostic system with hematoporphyrin derivative, laser photoradiation, and a spectroscopo. Laser Surg. Med. 4: 49-58, 1984.

65- McCaughan,J.S.Jr.. Photoradiation of malignant tumors sensitized with hematoporphyrin derivative. In: Porphyrin localization and treatment of tumors. Ed. Dolron,D.R. Alan Liss Inc.. 1984, p. 805-827.

66- McCaughan,J.S.Jr.. Process in photoradiation treatment of cancer following administration of HpD. Laser Focus : 44-56, 1983.

67- Aida,M., Kawaguchi,M.. Stomach cancer. In: Laser photoradiation for tumor detection and treatment. Ed. Hayata,Y.. Igaku-shoin, Tokio. 1983, p. 65. Apud 21.

68- Hisazumi,H., Misaki,T., Miyoshi,N.. Conditions for treatment of bladder tumors. In: Laser photoradiation for tumor detection and treatment. Ed. Hayata,Y.. Igaku-Shoin, Tokyo. 1983, p. 85. Apud 21.

69- Jochan,D., Unsold,E., Stacchier,G., Chaussy,Ch.. Use of a light dispersion medium for an integrated dye laser therapy of bladder tumors after photosensitization with HpD. In: Porphyrin localization and treatment of tumors. Eds. Dolron,D., Goner,C.. Alan Liss Inc, 1984. Apud 21.

- 70- Ohi, T., Taushiya, A., Superficial bladder tumors. In: Laser photo-radiation for tumour detection and treatment. Ed. Hayata, Y.. Igaku-Shoin- Tokyo. 1983, p. 79. Apud 21.
- 71- McPhce, M.S., Thorndyke, C.M., Thomas, G., Tulip, J., Cahpman, D., La-key, W.H.. Interstitial application of laser irradiation in hematoporphyrin derivative photosensitized dunning R3327 prostatic cancer. In: Laser Surg. Med. 4: 93-98, 1984.
- 72- Ward, B.G., Forbes, I., Cowled, P.A., McEvoy, M.M., Cox, L.W.. The treatment of vaginal recurrence of gynecologic malignancy with photo-radiation therapy following HpD pretreatment. Am. J. Obstet. Gynecol. 142(3): 356, 1982. Apud 21.
- 73- Soma, H., Akiya, K., Nutahara, S., Kato, H., Hayata, Y.. Treatment of vaginal carcinoma with laser photoradiation following administration of HpD: report of cases. Ann. Chirurgiae Gynecologiae. 71: 133, 1982.
- 74- Soma, H., Nutahara, S.. Cancer of the female genitalia. In: laser photoradiation for tumour detection and treatment. Ed. Hayata, Y.. Igaku-Shoin, Tokyo. 1983, p. 97. Apud 21.
- 75- Forbes, I., Cowled, P.A., Leong, A.S.Y., Ward, A.D., Black, R.B., Blake, A.J., Jacka, F.J.. Phototherapy of human tumours using HpD. Med. J. Aust. 2: 489, 1980.
- 76- Bruce, Jr., R.A.. Evaluation of Hp therapy to treat choroidal melanoma. Laser Surg. Med. 4: 59-64, 1984.
- 77- Murphree, A.L., Dolron, D.R., Gomer, C.J., Zirth, B., Fountain, S.W.. HpD photoradiation treatment of ophthalmic tumors. In: Potoradiation localization and treatment of tumors. Eds. Dolron, ., Gomer, C. Alan Liss. Inc. 1984. pre-print.
- 78- Bruce, R.A.. An approach to the treatment of ocular malignant mela-

- noma. In: Porphyrin localization and treatment of tumors. Eds. Delfron, D., Gomors, C.. Alan Liss Inc., 1984. Apud 21.
- 79- Andreoni, A., Cubeddu, R.. Properties of the blue-shifted emission of Hp and related derivatives in aqueous solution. Chem. Phys. Lett. 100: 503-507, 1983.
- 80- Ricchelli, F., Grossweiner, L.I.. Properties of a new state of hematoporphyrin in dilute aqueous solution. Photochem. Photobiol. 40: 599-606, 1984.
- 81- Nicola, J.H.. Efeitos de polaritons no espalhamento Raman Ressonante em CdS e ZnSe. Tese de doutorado. IF-UFRGS. Brasil, 1974.
- 82- Couto, R.M.. Espalhamento Raman eletrônico do Sm²⁺ em CaF₂. Tese de doutorado. IFGW-UNICAMP. Brasil, 1981.
- 83- Yamada, H.. Resonance Raman Spectroscopy of absorbed species on solid surfaces. Appl. Spectrosc. Rev. 17(2): 227-277, 1981.
- 84- Compaan, A.. Resonance Raman scattering with tunable lasers. Appl. Spectrosc. Rev. 13(2): 295-369, 1977.
- 85- Koteswaran, P.. Über die molekulare Assoziation des Essigsäure. Zeitschr. Phys. 110: 118-133, 1938.
- 86- Edsall, J., Wilson, E.. J. Chem. Phys. 6: 124-127, 1938
- 87- Cataliotti, R.S., Murgia, S.M., Pallani, G., Pasqua, A., Poletti, A.. Resonant Raman effect of hematoporphyrin IX in the alfa, beta absorption band of the Q(pi-pi*) electronic transition. Nuovo Cim. 2(5): 1261- 1271, 1983.
- 88- Dollish, F.R., Fateley, G., Bentley, F.F.. Characteristic Raman frequencies of organic compounds. New York. 1974, p. 220. Apud 87.
- 89- Kiefer, W., Bernstein, H.J.. A cell for resonance raman excitation with lasers in liquids. Appl. Spectrosc. 25(4): 500-501, 1971.

with lasers in liquids. Appl. Spectrosc. 25(4): 500-501, 1971.

APÉNDICE BIBLIOGRÁFICO

- Alfano, R.R. ; Tata, D.B. ; Cordero, J. ; Tomashefsky, P. ; Longo, F.W. ; Alfano, M.A.
"Laser Induced Fluorescence Spectroscopy from Native Cancerous and Normal Tissue"
IEEE Journal of Quantum Electronics, (1984) QE20, 1507-1511
- Andreoni, A. ; Cubeddu, R. ; De Silvestre, S. ; Laporta, P.
Hematoporphyrin Derivative: Experimental Evidence for Aggregated Species
Chemical Physics Letters, (1982) 88, 33-36
- Andreoni, A. ; Cubeddu, R. ; De Silvestre, S. ; Laporta, P. ; Svelto, O.
"Two-Step Laser Activation of Hematoporphyrin Derivative"
Chemical Physics Letters, (1982) 88, 37-39
- Andreoni, A. ; Cubeddu, R. ; De Silvestre, S. ; Jori, G. ; Laporta, P. ; Reddi, E.
"Time-Resolved Fluorescence Studies of Hematoporphyrin in Different Solvent Systems"
Zeitschrift für Naturforsch., (1983) 38c, 83-89
- Asher, S. ; Sauer, K.
Resonance Raman Spectroscopy of K₃(111)etioporphyrin I at the π - π^* and Charge Transfer Bands: The Use of Charge Transfer Bands to Monitor the complexation state of metalloporphyrins
The Journal of Chemical Physics, (1976) 64, 4115-4125
- Bejlinier, D.A. ; Dougherty, T.J.
Membrane Lysis in Chinese Hamster Ovary Cells Treated With Hematoporphyrin Derivative Plus Light
Photochemistry and Photobiology, (1982) 36, 43-47
- Berns, M.W. ; Dahlman, A. ; Johnson, F.H. ; Burns, R. ; Sperling, D. ; Guittinan, K. ; Siemens, A. ; Walter, R. ; Wirth, W. ; Hammer-Wilson, M. ; Wile, A.
"In Vitro Cellular Effects of Hematoporphyrin Derivative"
Cancer Research, (1982) 42, 2325-2329
- Berns, M.W.
"Laser Programs at the University of California, Irvine"
Laser Focus, May (1983)
- Berns, M.W. ; Wilson, M. ; Rentzepis, P. ; Burns, R. ; Wile, A.
"Cell Biology of Hematoporphyrin Derivative"
Lasers in Surgery and Medicine, (1983) 2, 261-266
- Berns, M.W.
"Hematoporphyrin Derivative Photoradiation Therapy"
Lasers in Surgery and Medicine, (1984) 4, 1-4
- Berns, M.W. ; Rettenmaier, K. ; McCullough, J. ; Coffey, J. ; Wile, A. ; Berman, M. ; Di Sala, P. ; Weinstein, G.
Response of Psoriasis to Red Laser Light (630 nm) Following Systemic Injection of Hematoporphyrin Derivative
Lasers in Surgery and Medicine, (1984) 4, 73-78
- Berns, M.W. ; Coffey, J. ; Wile, A.
"Laser Photoradiation Therapy of Cancer: Possible Role of Hyperthermia"
Lasers in Surgery and Medicine, (1984) 4, 87-92
- Berns, M.W. ; Berns, G.S. ; Coffey, J. ; Wile, A.G.
Exposure (Dose) Tables for Hematoporphyrin Derivative Photoradiation Therapy
Lasers in Surgery and Medicine, (1984) 4, 107-132
- Boggan, J.E. ; Edwards, M.S.B. ; Berns, M.W. ; Walter, R.J. ; Bolger, C.A.
Hematoporphyrin Derivative Photoradiation Therapy of the Rat 9L Gliosarcoma Brain Tumor Model
Lasers in Surgery and Medicine, (1984) 4, 99-106
- Bohandy, J. ; Kim, B.F.
"A Normal Mode Analysis of the Free Base Porphin"
Spectrochimica Acta, (1980) 36a, 463-466
- Bohandy, J. ; Kim, B.F.
"Temperature Dependence of Hg Porphin, Cu Porphin, and Pd Porphin"
Journal of Chemical Physics, (1980) 73, 5477-5481
- Brynner, H. ; Sussner, H.
Resonance Raman Scattering on Haemoglobin
Biochimica et Biophysica Acta, (1973) 310, 20-31
- Bugtner, G.R.
"101 Free Radical Production with Hematoporphyrin Derivative, Cysteine and Light: a Spin-Trapping Study"
FEBS Letters, (1984) 122, 295-299
- Bugtner, G.R. ; Need, M.J.
Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Free Radical Production by Hematoporphyrin Derivative, Ascorbate and Light
Cancer Letters, (1985) 25, 297-304
- Bugtner, G.R.
Hematoporphyrin Derivative and Light Produces the Vitamin E Radical
Primary Photo-Processes in Biology and Medicine
Ed. Bensasson, R.V. ; Jori, G. ; Land, E.J. ; Truscott, J.G.
Plenum Publishing Corporation, (1985)
- Cannistraro, S. ; Jori, G. ; Van der Vorst, A.
"Photosensitization of Amino Acids by Di-Cyan-Hemin: Kinetic

- and EPR Studies"
Photochemistry and Photobiology, (1978) 22, 517-521
- Cataliotti, R.S. ; Paliani, G.
"Vibrational Spectrum of Cristaline Ciclopentanone"
Chemical Physics Letters, (1973) 20, 280-283
 - Cataliotti, R.S. ; Murgia, S.M. ; Paliani, G. ; Pasqua, A. ; Poletti, A.
"Resonant Raman Effect of Hematoporphyrin IX in the Absorption Band of the Q() Electronic Transition"
Il Nuovo Cimento D, (1983) 20, 1261-1271
 - Cataliotti, R.S. ; Paliani, G. ; Poletti, A.
"Anomalous Blue Shift of the Resonant Raman Excitation Profile of Hematoporphyrin IX in Methanol"
Journal Chemical Physics, (1983) 28, 93-96
 - Cataliotti, R.S. ; Murgia, S.M. ; Poletti, A. ; Zgierski, M.Z.
"Resonance Raman Scattering in Dyes Derived from Azobenzene"
Journal of Raman Spectroscopy, (1985) 16, 251-257
 - Cauzzo, G. ; Gennari, G. ; Jori, G. ; Spikes, J.D.
"The Effect of Chemical Structure on the Photosensitizing Efficiencies of Porphyrins"
Photochemistry and Photobiology, (1977) 25, 389-395
 - Chantrell, J. ; McWhiliffe, C.A. ; Munn, R.W. ; Pratt, A.C.
"The Status of Molecular Orbital Calculations on Porphyrins and Their Complexes"
Coordination Chemistry Reviews, (1975) 16, 259-284
 - Coffey, J.H. ; Nile, A.G. ; Mosier, M.A. ; Mason, G.R. ; Berns, M.W.
"Evaluation of Visual Acuity During Laser Photoradiation of Cancer"
Lasers in Surgery and Medicine, (1984) 4, 65-72
 - Das, M. ; Dixit, R. ; Mukhtar, H. ; Bickers, D.R.
"Role of Active Oxygen Species in the Photodestruction of Mitochondrial Cytochrome P-450 and Associated Monooxygenases by Hematoporphyrin Derivative in Rats"
Cancer Research, (1985) 45, 608-615
 - Dixit, R. ; Mukhtar, H. ; Bickers, D.R.
"Destruction of Mitochondrial Cytochrome P-450 by Reactive Oxygen Species Generated During Photosensitization of Hematoporphyrin Derivative"
Photochemistry and Photobiology, (1983) 22, 173-176
 - Docchio, F. ; Ramponi, R. ; Sacchi, C.A. ; Bottiroli, G. ; Freitas, I.
"Time Resolved Fluorescence Microscopy of Hematoporphyrin Derivative in Cells"
Laser in Surgery and Medicine, (1982) 2, 21-28
 - Doi, J.D. ; Lavalley, D.K. ; Srivastava, S.C. ; Prach, J. ; Richards, P.
"Preparation of (109)Pd-Hematoporphyrin for Selective Lymphatic Ablation Using N-Methyl-hematoporphyrin"
International Journal of Applied Radiation and Isotopes, (1981) 32, 877-880
 - Dougherty, T.J. ;
"Hematoporphyrin Derivative for Detection and Treatment of Cancer"
Journal of Surgical Oncology, (1980) 15, 209-210
 - Dougherty, T.J.
"Variability in Hematoporphyrin Derivative Preparations"
Cancer Research, (1982) 42, 1183
 - Dougherty, T.J.
"The Future of Photoradiation Therapy in the Treatment of Cancer"
Laser Focus, (1983), 55-57
 - Dougherty, T.J.
"An Overview of the Status of Photoradiation Therapy"
Porphyrin Localization and Treatment of Tumors, 75-87
Ed. Doiron, D.R.
Alan R. Liss Inc.; NY (1981)
 - Edsall, J.L. ; Wilson, E.B. Jr.
"A Simple Method for Determining the Polarization of Raman Lines"
Journal of Chemical Physics, (1938) 6, 124-127
 - Ehrenberg, B. ; Malik, Z. ; Nitzan, Y.
"Fluorescence Spectral Changes of Hematoporphyrin Derivative Upon Binding to Lipid Vesicles, Staphylococcus aureus and Escherichia Coli Cells"
Photochemistry and Photobiology, (1985) 41, 429-435
 - Emilian, C. ; Delmelle, M. ; Cannistraro, S. ; Van de Vorst, A.
"Solubility of Hematoporphyrin and Photodynamic Damages in Liposomal Systems: Optical and Electron Spin Resonance Studies"
Photobiocchemistry and Photobiophysics, (1983) 5, 119-128
 - Evensen, J.F. ; Moan, J.
"Photodynamic Action and Chromosomal Damage: A Comparison of Hematoporphyrin Derivative (HpD) and Light With X-Irradiation"
British Journal of Cancer, (1982) 45, 456-465
 - Felix, C.C. ; Reszka, K. ; Sealy, R.C.
"Free Radicals from Photoreduction of Hematoporphyrin in Aqueous Solution"
Photochemistry and Photobiology, (1983) 32, 141-147

- Fuller, T.A.
"The Physics of Surgical Lasers"
Lasers in Surgery and Medicine, (1980) 1, 5-14
- Gomer, C. ; Dougherty, T.J.
"Determination of [H₂] and [O₂] Hematoporphyrin Derivative
Distribution in Malignant and Normal Tissue"
Cancer Res., (1979) 39, 146-151
- Gouterman, M.
"Spectra of Porphyrins"
Journal of Molecular Spectroscopy, (1961) 4, 138-163
- Gouterman, M.
"Radiationless Transition: A Semiclassical Model"
The Journal of Chemical Physics, (1962) 36, 2846-2853
- Gouterman, M. ; Stryer, L.
"Fluorescence Polarization of Some Porphyrins"
The Journal of Chemical Physics, (1962) 37, 2260-2266
- Gouterman, M. ; Wagniere, G.H.
"Spectra of Porphyrins- Part II. Four Orbital Model"
Journal of Molecular Spectroscopy, (1963) 11, 108-127
- Gouterman, M. ; Khalil, G.
"Porphyrin Free Base Phosphorescence"
Journal of Molecular Spectroscopy, (1974) 53, 89-100
- Grossweiner, L.I. ; Patel, A.S. ; Grossweiner, J.B.
"Type I and Type II Mechanisms in the Photosensitized Lysis
of Phosphatidylcholine Liposomes by Hematoporphyrin"
Photochemistry and Photobiology, (1982) 36, 159-167
- Kessel, D.
"Determinants of Hematoporphyrin-Catalyzed Photosensitization"
Photochemistry and Photobiology, (1982) 36, 99-101
- Kessel, D. ; Chou, T.
"Tumor-Localizing Components of Porphyrin Preparation Hematoporphyrin Derivative"
Cancer Research, (1983) 43, 1994-1999
- Kohn, K. ; Kessel, D.
"On the Mode of Cytotoxic Action of Photoactivated Porphyrins"
Biochemical Pharmacology, (1979) 28, 2465-2470
- Krinsky, M.I.
"Biology and Photobiology of Singlet Oxygen"
Oxygen Radicals in Chemistry and Biology, 433-464
Ed. Bors, W. ; Saran, M. ; Iait, D.
Walter de Gruyter & Co. - Berlin (1984)
- Lewis, A. Spoonhower, J.
"Tunable Dye Laser Resonant Raman Spectroscopy in Biology"
Academic Press, (1974), 347-376
- Li, J.R. ; Chen, Y.P. ; Zhao, S.D. ; Zhang, L.L. ; Song, A.Z.
"Application of Hematoporphyrin Derivative and Laser-Induced
Photodynamical Reaction in the Treatment of Lung Cancer: A
Preliminary Report on 21 Cases"
Lasers in Surgery and Medicine, (1984) 4, 31-38
- Ligson, R.L. ; Balde, E.J. ; Gray, J.H.
"Hematoporphyrin for Detection and Management of Cancer"
Cancer, (1967) 20, 2255-2257
- Marchesini, R. ; Zunino, F. ; Melloni, E. ; Pezzoni, G. ; Savi, G. ; Locati, L. ; Bandierawante, G. ; Spinelli, P. ; Emanuelli, H. ; Fava, G.
"Study of Irradiation Parameters in HpD Phototherapy of K-2
Tumor Model"
Porphyrins in Tumor Phototherapy, 221-225
Ed. Andreoni, A. ; Cubeddu, R.
Plenum Publishing Co. (1984)
- Melloni, E. ; Marchesini, R. ; Emanuelli, H. ; Fava, G. ; Locati, L. ; Pezzoni, G. ; Savi, G. ; Zunino, F.
"Hyperthermal Effects in Phototherapy with Hematoporphyrin
Derivative Sensitization"
Tumori, (1984) 70, 321-325
- Mendelsohn, R. ; Sunder, S. ; Verma, A.L. ; Bernstein, H.J.
"Resonance Raman Spectra of Cu-etioorphyrins I, I-meso-d₄,
and IV"
The Journal of Chemical Physics, (1975) 62, 37-44
- McCaughan, J.S. Jr.
"Process in Photoradiation Treatment of Cancer Following Administration of HpD"
Laser focus, (1983) 44, 44-56
- Moan, J.
"The Photochemical Yield of Singlet Oxygen From Porphyrins in
Different States of Aggregation"
Photochemistry and Photobiology, (1984) 32, 445-449.

- Murgia, S.M. ; Poletti, A. ; Pasqua, A.
"Laser Flash Photolysis Studies on Hematoporphyrin IX in Aqueous and Miscellar Systems"
Médecine Biologie Environnement, (1982) 10, 279-284
- Murgia, S.M. ; Pasqua, A. ; Poletti, A.
"Laser Photolysis Study of the Hematoporphyrin IX-1-Tryptophan System in Solvent Mixtures at Different Polarity"
Chemical Physics Letters, (1983) 98, 179-183
- Parker, J.G. ; Willian, D.S.
"Energy Transfer Processes Accompanying Laser Excitation of Hematoporphyrin In Various Solvents"
John Hopkins APL technical Digest, (1981) 2, 196-199
- Pasqua, A. ; Poletti, A. ; Murgia, S.M.
"Ultrafiltration technics as a Tool for the Investigation of Hematoporphyrin Aggregates in Aqueous Solution"
Médecine Biologie Environnement, (1982) 10, 287-291
- Poletti, A. ; Murgia, S.M. ; Cannistraro, G.
"Laser Flash Photolysis of the Hematoporphyrin-Carotene System"
Photobiocchemistry and Photobiophysics, (1981) 2, 167-172
- Poletti, A. ; Murgia, S.M. ; Pasqua, A. ; Reddi, E. ; Jori, G.
"Photophysical and Photosensitizing Properties of Photorhinol Porphyrins in Tumor Phototherapy, 37-43"
Ed. Andreoni, A. ; Cubeddu, R.
Plenum Publishing Co. (1984)
- Persad, S. ; Menon, I.A. ; Haberman, H.F.
"Comparison of the Effects of UV-Visible Irradiation of Melanins and Melanin-hematoporphyrin Complexes from Human Black and Red Hair"
Photochemistry and Photobiology, (1983) 32, 63-68
- Phillips, C.A. ; Taylor, D.M.
"The Effect of Haematoporphyrin Derivative on the Uptake of Ga, Fe and Zn in Tumours"
Nuclear Medicine, (1978) 12, 262-265
- Profio, A.E.
"Laser Excited Fluorescence of Hematoporphyrin Derivative for Diagnosis of Cancer"
IEEE Journal of Quantum Electronics, (1984) QE-20, 1502-1506
- Putten, W.J.M. ; Gemert, M.J.C.
"Hematoporphyrin Derivative Fluorescence 'in Vitro' and in an Animal Tumor"
Physic, Medicine and Biology, (1983) 28, 633-638
- Putten, W.J.M. ; Gemert, M.J.C.
"A Modeling Approach to the Detection of Subcutaneous Tumours by Hematoporphyrin Derivative Fluorescence"
Physic, Medicine and Biology, (1983) 28, 639-645
- Salet, C. ; Moreno, G. ; Vinzens, F.
"Photodynamic Effects Induced By Furocoumarins on a Membrane System. Comparison with Hematoporphyrin"
Photochemical and Photobiology, (1982) 36, 291-296
- Sandberg, S. ; Rowslo, I. ; Hovding, G. ; Bjorndal, T.
"Porphyrin Induced Photodamage as related to Subcellular Localization of the Porphyrins"
Acta Dermatovener (Suppl.), (1982) 100, 75-80
- Serbănescu, B.
"The Energy Spectrum of Haematoporphyrin Complexes with Cloranyl and Cryptophane"
Rev. Roum. Phys., (1979) 24, 983-991
- Shelnutt, J.A.
"The Raman Excitation Spectra and Absorption Spectrum of a Metalloporphyrin in a Environment of Low Symmetry"
Journal Chemical Physics, (1980) 72, 3948-3958
- Slifkin, M.A.
"Charge Transfer Interactions of Biomolecules, 118-131"
Academic Press, (1970) cap 6.
- Smith, G.J.
"The Effects of Aggregation on the Fluorescence and the Triplet State Yield of Hematoporphyrin"
Photochemistry and Photobiology, (1985) 41, 123-126
- Spikes, J.D. ; Straight, R.C.
"Photodynamic Behavior of Porphyrins in Model Cell, Tissue and Tumor Systems"
Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases, 46-53
Ed. Jori, G. ; Perria, C.
Libreria Progetto, Italia (1985)
- Spikes, J.D.
"The Historical Development of Ideas on Applications of Photosensitized Reactions in the Health Sciences"
Primary Photoprocesses in Biology and Medicine, 209-227
Ed. Bensasson, R.V. ; Jori, G. ; Land, E.J. ; Aruscott, T.G.
Plenum Publishing Co. (1985)
- Spiro, T.G. ; Strekas, T.C.
"Resonance Raman Spectra of Heme Proteins. Effects of Oxidation and Spin State"
Journal of the American Society, (1974) 86, 338-345
- Spiro, T.G.
"Hemoglobin Structural Dynamics as Monitored by Resonance Raman Spectroscopy"
Israel Journal of Chemistry, (1981) 21, 81-86

- Strekas, T.C. ; Spiro, G.
"Cytochrome c : Resonance Raman Spectra"
Biochimica Biophysica Acta, (1972) 228, 188-192
- Sunder, S. ; Bernstein, H.J.
"Resonance Raman Spectra of Cu-tetrapyrroline" *Can. J. Chem.*, (1974) 52, 2851-2856
- Swincer, A.G. ; Ward, A.D. ; Howlett, G.J. -
"The Molecular Weight of Haematoporphyrin Derivative, Its Gel Column Fractions And Some of Its Components in Aqueous Solution"
Photochemistry and Photobiology, (1985) 41, 47-50
- Timmis, K. ; Early, P.W. ; Marvin, D.A.
"Filamentous Bacterial Viruses IX. Protein Synthesis Inhibitors and DNA Replication"
Biochemical and Biophysical Research Communications, (1974) 52(1).
- Tsuchiya, A. ; Obara, M.B. ; Kiwa, M. ; Ohi, T. ; Kato, H. ; Hayata, Y.
"Haematoporphyrin Derivative and Laser Photoradiation in the Diagnosis and Treatment of Bladder Cancer"
The Journal of Urology, (1982) 128, 79-83
- Valenzo, D.P.
"The Stoichiometry of Creation Membrane Lesion By Hematoporphyrin Derivative and Light"
IEEE Journal of Quantum Electronics, (1984) QE20, 1439-1441
- Verma, A.L. ; Bernstein, H.J.
"Resonance Raman Spectra of Metal-Free Porphin and Some Porphyrins"
Biochemical and Biophysical Research Communication, (1974) 52(1), 2560-2565
- Verma, A.L. ; Bernstein, H.J.
"Resonance Raman Spectra of Copper-Porphin"
The Journal of Chemical Physics, (1974) 61, 2564-2565
- Verma, A.L. ; Mendelsohn, R. ; Bernstein, H.J.
"Resonance Raman Spectra of the Nickel, Cobalt and Copper Chelate of Mesoporphyrin IX Dimethyl Ester"
The Journal of Chemical Physics, (1974) 61, 383-390
- Volden, G. ; Christensen, T. ; Moan, J.
"Photodynamic Membrane Damage of Hematoporphyrin Derivative Treated NIH3T3 Cells 'In Vitro'"
Photobiology and Photobiophysics, (1981) 2, 105-111
- Wajdow, S.M. ; Henderson, B.W. ; Dougherty, T.J.
"Enhanced Tumor Control Following Sequential Treatments of Photodynamic Therapy (PDT) and Localized Microwave Hyperthermia 'In Vivo'" *Laser Sur. Med.* (1984), 4, 29-36.

-Weiss, C. ; Kobayashi, H. ; Gouterman, M.
"Spectra of Porphyrins: Part III"

Journal of Molecular Spectroscopy, (1965) 16, 415-450

-Wile, A.G. ; Coffey, J. ; Mahabedian, M.Y. ; Baghdassarian, R. ; Mason, G.R. ; Burns, M.W.

"Laser Photoradiation Therapy of Cancer: An Update of the Experience at the University of California, Irvine"
Lasers in Surgery and Medicine, (1984) 4, 5-12

-Wile, A.G. ; Dahlman, A. ; Burns, R.G. ; Burns, M.W.
"Laser Photoradiation Therapy of Cancer Following Hematoporphyrin Sensitization"
Lasers in Surgery and Medicine, (1982) 2, 163-168

-Yamashita, M. ; Mowura, M. ; Kobayashi, S. ; Sato, T. ; Aizawa, K.
"Picosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Hematoporphyrin Derivative"
IEEE Journal of Quantum Electronics, QE(20), 1363-1369, (1984)

108 -Zgierski, M.Z.

"Depolarization Dispersion Curves of Resonance Raman Fundamentals of Metalloporphyrins and Metallophthalocyanines Subject to Asymmetric Perturbation"
Chemical Physics, (1982) 65, 335-367