



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Físico-Química

**Preparação e avaliação de nanoesferas de PLGA (50:50)
contendo porfirinas anfifílicas para uso em terapia
fotodinâmica**

Aluna: Juliana Machado da Silveira Alves

Orientador: Prof. Dr. Renato Atílio Jorge

Campinas, 30 de junho de 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

AL87p	Alves, Juliana Machado da Silveira. Preparação e avaliação de nanoesferas de PLGA (50:50) contendo porfirinas anfífilas para uso em terapia fotodinâmica / Juliana Machado da Silveira Alves. -- Campinas, SP: [s.n], 2010. Orientador: Renato Atilio Jorge. Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 1. Terapia fotodinâmica. 2. Porfirinas. 3. LNCaP. I. Jorge, Renato Atilio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.
-------	--

Título em inglês: Preparation and avaliation of PLGA (50:50) nanospheres containing amphiphilic porphyrins to be used in photodynamic therapy

Palavras-chaves em inglês: Photodynamic therapy, Porphyrins, LNCaP

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora: Renato Atilio Jorge (orientador), Yassuko Iamamoto (FFCL-USP-Ribeirão Preto), Nelson Eduardo Duran Caballero (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 30/06/2010

A minha família, toda, inteira, pelo apoio dado mesmo em frente aos
maiores sustos, e ao amor dado sempre.

Ao Pedro, por ter surgido na hora certa e por ter permanecido,
mostrando que tudo sempre tem como melhorar.

Agradecimentos:

Ao professor Renato Atílio Jorge pelos anos de dedicação e por ter acreditado em mim.

Ao companheiro de laboratório, base do meu trabalho e fonte de esclarecimentos, André Romero da Silva.

A toda a dedicação e paciência da técnica Claudia Martelli e Aline Dalmolin.

Prof. Mathias Senge, School of Chemistry, Trinity College, Ireland, por ceder as porfirinas

Mariana Ozello Baratti – Doutorando do Hemocentro/UNICAMP - pelas excelentes micrografias de confocal

A Karina Zeghin – pós-doc – Núcleo de Medicina Experimental da FCM/UNICAMP - pelo treinamento de cultura de células

Rony Nunes – IB/Unicamp – pela ajuda fundamental com a cultura de células na etapa final do trabalho.

Aos profs. Anibal Vercesi, Hernandes F. Carvalho e Sara Olalla Saad por permitir a utilização de seus laboratórios no aprendizado inicial da cultura de células e micrografias de confocal.

Ao prof. Rogério Custódio pelo cálculo da Estrutura tridimensional das porfirinas e seus respectivos momentos dipolares.

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

Março 2002 Julho 2006	Bacharelado em Química Universidade Estadual de Campinas – Unicamp Instituto de Química - IQ
Março 1997 Dezembro 200	Técnico em Química Centro Paula Souza Escola Técnica Estadual Trajano de Barros Camargo

Iniciação Científica

Agosto 2003 a Julho 2004	<u>Título:</u> “Influência do pH na foto-oxidação do triptofano por azul de toluidina” <u>Orientador:</u> Prof. Dr. Renato Atílio Jorge <u>Local:</u> Instituto de Química, Unicamp <u>Área:</u> Físico-Química <u>Instituição Financiadora:</u> Pibic/CNPq
Agosto 2004 a Julho 2005	<u>Título:</u> “Influência do pH na foto-oxidação de albumina bovina por azul de toluidina” <u>Orientador:</u> Prof. Dr. Renato Atílio Jorge <u>Local:</u> Instituto de Química, Unicamp <u>Área:</u> Físico-Química <u>Instituição Financiadora:</u> Pibic/CNPq
Agosto 2005 a Julho 2006	<u>Título:</u> “Constante de Associação entre fenotiazinas e mitocôndrias e foto-oxidação de mitocôndrias por fenotiazinas” <u>Orientador:</u> Prof. Dr. Renato Atílio Jorge

Local: Instituto de Química, Unicamp

Área: Físico-Química

Instituição Financiadora: Pibic/CNPq

Congressos

Evento: Congresso da Soc. Bras. de Bioquímica e Biologia Molecular

Título: “Influência do pH na foto-oxidação do triptofano por azul de toluidina”

Autores: Juliana Machado da Silveira Alves, Renato Atílio Jorge

Local e período da apresentação: Caxambu (MG) maio de 2004

Evento: Simpósio Brasileiro de Terapia fotodinâmica

Local e período da realização: São Pedro (SP) julho de 2007

Evento: Congresso da Soc. Bras. de Bioquímica e Biologia Molecular

Título: “Encapsulation of amphiphilic porphyrins in 50:50 PLGA nanoparticles”

Autores: Juliana M. S. Alves, André Romero da Silva, Renato A. Jorge

Local e período da apresentação: Águas de Lindóia (SP) maio de 2008

Evento: Congresso da Soc. Bras. de Bioquímica e Biologia Molecular

Título: “Effects of PLGA nanospheres-preparation parameters on the entrapment and recovery percentages”

Autores: André Romero da Silva, Juliana M. S. Alves, Renato A. Jorge

Local e período da apresentação: Águas de Lindóia (SP) maio de 2008

RESUMO

PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE NANOESFERAS DE PLGA (50:50) CONTENDO PORFIRINAS ANFIFÍLICAS PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

As porfirinas 5,10,15,20(3-hidroxifenil)porfirina (m-THPP), 5-hexil-10,20-bis(3hidrofenil)porfirina (hex-m-bisHPP) e 5-hexil-10,15,20-tris(3-hidroxifenil)porfirina (hex-m-triHPP), têm o mesmo rendimento quântico de oxigênio singlete e foram encapsuladas em nanopartículas (NPs) poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) 50:50, preparadas através do método de emulsão e evaporação. As NPs obtidas têm diâmetros médios na faixa de submicrometros (<240 nm) e pequena dispersividade. O potencial zeta medido mostrou uma pequena variação (de -21.6 mV a -19.3 mV). A porcentagem de encapsulação das porfirinas obtidas foram: 93 ± 2 ; 97 ± 2 and 69 ± 1 para m-THPP, hex-m-bisHPP e hex-m-triHPP respectivamente. A eficácia fotodinâmica e a internalização das porfirinas foi investigada a 37°C utilizando células humanas cancerígenas de próstata (LNCaP). Após 2 horas de incubação com as NPs contendo a porfirina as porcentagens de internalização celular foram iguais para todas as porfirinas. As três porfirinas causam morte celular e dão a mesma viabilidade quando se varia o tempo de incubação (30-120 min), concentração da porfirina ($2,5$ a $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e dose de luz incidente (33 a 99 J cm^{-2}). Análise das células por microscopia confocal mostrou que as porfirinas encapsuladas nas NPs foram localizadas no citoplasma, sempre na região perinuclear. Estes resultados mostram que porfirinas com estruturas semelhantes e anfifilicidades diferentes, com igual rendimento quântico de rendimento singlete e internalizadas nas células em concentrações iguais, tem a mesma eficácia fotodinâmica.

ABSTRACT

PREPARATION AND AVALIATION OF PLGA (50:50) NANOSPHERES WITH AMPHIPHILIC PORPHYRINS FOR PHOTODYNAMIC THERAPY.

Porphyrins (5,10,15,20-tetra(3-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP), 5-hexyl-10,20-bis(3-hydroxyphenyl) porphyrin (hex-m-bisHPP) and 5-hexyl-10,15,20-tris(3-hydroxyphenyl)porphyrin (hex-m-triHPP)) with different amphiphicities and equal singlet oxygen quantum yield in ethanol, were encapsulated into 50:50 poly(lactide-co-glycolide,) (PLGA) nanoparticles (NPs) prepared by the emulsion/evaporation technique. The NPs obtained had submicron average diameters (<240 nm) with low polydispersity. The zeta potential measurements showed slight variations in negativity (from -21.6 mV to -19.3 mV). Particle recovery (%) was determined with results of 93 ± 2 ; 97 ± 2 and 69 ± 1 for m-THPP, hex-m-bisHPP and hex-m-triHPP porphyrins, respectively. The photodynamic efficacy of the porphyrin-loaded nanoparticles and their cellular uptake at 37°C was investigated with LNCaP prostate tumour cells. After 2 h incubation with porphyrin-loaded nanoparticles the percents of intracellular uptake were the same for all porphyrins. The three porphyrins cause cell death and gave the same cell viability with variations of incubation time (30–120 min), drug concentration (2.5 to $7.5 \mu\text{mol L}^{-1}$) and incident light dose (33 to 99 J cm^{-2}). Confocal laser scanning microscopy data showed that the porphyrin-loaded nanoparticles, were localized in the cells, always in the perinuclear region. These results show that porphyrins with similar structures and equal singlet oxygen quantum yields and internalized in equal concentrations in the cells, but different amphiphilicities, have equal photodynamic efficacy.

ÍNDICE

	Índice de abreviaturas	XVIII
	Índice de tabelas	XX
	Índice de figuras	XXII
1	Introdução	1
1.1	Breve histórico da terapia fotodinâmica	10
1.2	Mecanismo de ação do fotossensibilizador	14
1.3	As propriedades de um fotossensibilizador ideal	16
1.4	Classificação dos fotossensibilizadores	17
1.4.1.	A pró-droga ALA	18
1.4.2	Porfirinas, clorinas e bacterioclorinas	19
1.4.3	Texafirinas	22
1.4.4	Ftalocianinas	23
1.4.5	Porfírenos	25
1.4.6	Terapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT)	26
1.5	Sistemas carreadores de fármacos e PDT	28
2	Objetivo e justificativa	30
3	Materiais e métodos	31
3.1	Reagentes e equipamentos	31
3.2	Determinação do comprimento de onda de emissão e excitação	35
3.3	Cálculos de propriedades das porfirinas	35
3.4	Preparação das partículas de PLGA utilizando-se o planejamento fatorial fracionário 2^{3-1}	35
3.4.1.	Preparação das partículas de PLGA utilizando-se o planejamento fatorial fracionário 2^2	37
3.5	Análise da morfologia das partículas por Microscopia eletrônica de varredura	38
3.6	Determinação do tamanho da partícula	38
3.7	Determinação da porcentagem de encapsulação e de recuperação das partículas	39
3.8	Medida do potencial zeta	40
3.9	Estudo de liberação <i>in situ</i> das porfirinas encapsuladas	40

3.10	Determinação da distribuição das porfirinas nas nanoesferas de PLGA através de microscopia eletrônica de varredura confocal a laser	41
3.11	Cultivo de células LNCaP	41
3.11.1	Descongelamento de células	42
3.11.2	Cultivo de células	42
3.11.3	Tripsinização	42
3.11.4	Contagem de células	43
3.11.5	Congelamento de células	44
3.12	Determinação da localização das porfirinas nas células LNCaP	44
3.13	Determinação da viabilidade celular por MTT	45
3.14	Foto-oxidação de células humanas de câncer de próstata da linhagem LNCaP utilizando as porfirinas encapsuladas	46
3.14.1	Efeito do tempo de internalização	46
3.14.2	Efeito da concentração	46
3.14.3	Efeito do tempo de irradiação	47
3.15	Quantificação da internalização das porfirinas encapsuladas nas células LNCaP	48
3.16	Estatística	48
4	Resultados e discussão	49
4.1	Espectros de absorção dos fotossensibilizadores	49
4.2	Propriedades das porfirinas	51
4.3	Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} aplicado à preparação das nanopartículas de LNCaP	54
4.4	Planejamento fatorial fracionário 2^2 aplicado ao preparo das nanopartículas de PLGA	58
4.4.1	Tamanho das partículas e potencial zeta obtidos no planejamento fatorial 2^2	59
4.5	Porcentagem de encapsulação e de recuperação das porfirinas nas nanoesferas preparadas a partir de 15% de etanol na fase aquosa e 1 mg de porfirina	66
4.6	Liberção das porfirinas encapsuladas sem separação das partículas do meio de liberação	68
4.7	Distribuição qualitativa das porfirinas nas esferas de PLGA utilizando a microscopia eletrônica de varredura a laser confocal	71

4.8	Internalização celular das porfirinas	74
4.9	Atividade fotodinâmica das porfirinas encapsuladas em PLGA	76
4.9.1	Determinação da viabilidade celular por MTT	76
4.9.2	Viabilidade celular em função do tempo de incubação das porfirinas	77
4.9.3	Viabilidade celular em função da concentração das porfirinas	79
4.9.4	Viabilidade celular em função da dose de luz aplicada nas células	81
4.9.5	Quantificação das porfirinas internalizadas nas células LNCaP	82
4.9.6	Análise da atividade fotodinâmica das três porfirinas	83
5	Conclusão	88
6	Referencias bibliográficas	89

Índice de abreviaturas

ALA	ácido 5-aminolevulínico
ANOVA	análise de variância
BCC	carcinoma basal
Bchl	Bacterioclorofila a
CEC	carcinoma espinocelular
Cel	células
dms	diferença significativa mínima
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERD	espectroscopia de refletância difusa
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	food and drug administration
HeLa	linhagem de câncer cervical epitelial humano
hex-m-bisHPP	5-hexil-10,20-bis(3-hidroxifenil)porfirina
hex-m-triHPP	5-hexil-10,15,20-tris(3-hidroxifenil)porfirina
Hp	hematoporfirina
HpD	derivado hematoporfirínico
HPPH	2-(1-hexiloxetil)-2-devinil pirofcoforbide-a
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LNCaP	células humanas cancerígenas de próstata
M-ALA	ácido metil aminolevulônico
m-THPP	5,10,15,20(3-hidroxifenil)porfirina
MET	microscopia eletrônica de transmissão
MEV	microscópio eletrônico de varredura

MQ	quadrado médio
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NP	nanopartícula
PACT	terapia fotodinâmica antimicrobial
PAD	desinfecção foto-ativada
PBS	tampão fosfato
PD	fotodiagnóstico
PDI	inativação fotodinâmica
PDT	terapia fotodinâmica
PEG	polietilenoglicol
PLGA	poli(láctico-co-glicólico)
PP	protoporfirina
PS	fotosensibilizador
PVA	álcool polivinílico
q	valor critico de distribuição
QMR	quadrado médio do resíduo da análise de variância
r	numero de repetições de cada tratamento

Índice de tabelas

Tabela 1– Tipo de câncer, fotossensibilizador aprovado, país de aprovação e fabricante ¹¹⁻¹³	5
Tabela 2– Tipo de câncer, fotossensibilizador sendo testado em ensaios clínicos, países do ensaio e solicitante	6
Tabela 3: Constituição do meio de cultura RPMI 1600	32
Tabela 4: Fatores, níveis e matriz do planejamento fatorial 2^{3-1} para a preparação de partículas de PLGA encapsuladas com as porfirinas	36
Tabela 5: Fatores, níveis e matriz do planejamento fatorial 2^2 para a preparação de partículas de PLGA encapsuladas com as porfirinas	38
Tabela 6: Valores de ϵ para as porfirinas m-THPP, hex-m-bisHPP e hex-m-triHPP	51
Tabela 7: Propriedades das porfirinas	52
Tabela 8: Fatores utilizados em cada ensaio no planejamento fatorial 2^{3-1}	55
Tabela 9: Tamanho das esferas obtidos pelas micrografias através do software ImageTool	55
Tabela 10: Tamanho das esferas para as diferentes preparações utilizando o equipamento Zetasizer	59
Tabela 11: Efeito da % álcool na fase aquosa no tamanho de esferas através dos cálculos obtidos pelo software Chemomatrix para o planejamento fatorial 2^2	60
Tabela 12: Influência dos fatores estudados no planejamento fatorial 2^2 no potencial zeta	63
Tabela 13: Porcentagem de encapsulação e de recuperação das porfirinas m-THPP, Hex-m-bisHPP e Hex-m-triHPP. Os experimentos foram realizados em triplicata.	67

Tabela 14: Porfirinas internalizadas nas células LnCAP 83

Tabela 15: Concentração das clorinas internalizadas após incubação das células de Jurkat por 72 horas. S é o solvente (etanol ou DMSO) e L é o liposoma. A concentração intracelular foi calculada considerando um raio médio celular de 6 μm . A morte celular foi medida 24 h após a aplicação da luz⁷⁰. 86

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura química de alguns fotossensibilizadores	9
Figura 2: Diagrama de Jablonski para mecanismo do tipo I	14
Figura 3: Diagrama de Jablonski para mecanismo do tipo II	15
Figura 4: Estrutura química de ALA	19
Figura 5: Estrutura da macrociclos tetrapirrólicos. Porfirina (A), clorina (B) e bacterioclorina (C)	20
Figura 6: Nomenclatura IUPAC-IUB para o anel pirrólico	20
Figura 7: Texafirinato de gadolínio (III) ligado ao acetato	23
Figura 8: Estrutura básica da ftalocianina	23
Figura 9: Estrutura de porfíceno	25
Figura 10: Estruturas de representativos PSs utilizados em PACT.	28
Figura 11: 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)porfirina, 5-hexil-10,20-bi(3-hidroxifenil)porfirina e 5-hexil-10,15,20-tri(3-hidroxifenil)porfirina	31
Figura 12: Laser de comprimento de onda de 645 nm utilizado nos experimentos	34
Figura 13: Camara de Neubauer	44
Figura 14: Espectros eletrônicos de absorção das porfirinas. m-THPP (A), Hex-m-bisHPP (B) e Hex-m-triHPP(C) em diclorometano	50
Figura 15: Estrutura tridimensional da porfirina Hex-m-triHPP	52
Figura 16: Microscopias de varredura dos ensaios 1 a 4 da 5-hexil-10,20-bi(3-hidroxifenil)porfirina (Hex-m-bisHPP). As escalas não são iguais em todas as figuras.	56
Figura 17: Microscopias de varredura dos ensaios 1 a 4 da 5-hexil-10,15,20-tri(3-hidroxifenil)porfirina (Hex-m-triHPP). As escalas não são iguais em todas as figuras.	57

- Figura 18: Microscopias de varredura dos ensaios 1 a 4 da 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)porfirina (m-THPP). As escalas não são iguais em todas as figuras. 57
- Figura 19: Potencial zeta de uma partícula. 62
- Figura 20: Micrografia eletrônica de varredura de nanoesferas de PLGA preparadas com 0,5 mg porfirina e 30 % etanol. (A) m-THPP, (B) hex-m-bis-HPP, (c) hex-m-tris-HPP. 65
- Figura 21: Curvas analíticas construídas para as porfirinas m-THPP, Hex-m-bisHPP e Hex-m-triHPP. As concentrações da porfirinas variaram entre 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 66
- Figura 22: Solubilidade das porfirinas em diferentes concentrações de Tween 20. 68
- Figura 23: Solubilidade das porfirinas em diferentes concentrações de etanol em solução aquosa. 69
- Figura 24: Perfil de liberação em isobutanol das porfirinas encapsuladas em PLGA. 70
- Figura 25: Imagens de microscopia confocal das porfirinas encapsuladas em esferas e os seus cortes (imagens à direita) usando um aumento gradual na profundidade de 0,1 μm . (A) m-THPP, (B) hex-m-triHPP e (C) hex-m-bisHPP. Nas imagens dos cortes há um fundo de cor vermelha, que é um efeito do ajuste de cor do confocal. 73
- Figura 26: Células sem incubação de porfirina encapsulada em esferas. 75
- Figura 27: Células incubadas com nanoesferas contendo m-THPP e seu corte. 75
- Figura 28: Células incubadas com nanoesferas contendo Hex-m-bisHPP e seu corte. 75

Figura 29: Células incubadas com nanoesferas contendo Hex-m-triHPP e seu corte. 76

Figura 30: Curva padrão de número de células por absorvância de ensaio de MTT, com leituras no comprimento de onda de 570 nm. 77

Figura 31: de viabilidade celular versus tempo de incubação para as porfirinas ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) encapsuladas em PLGA 50:50 na ausência e presença de luz (luz na legenda da figura). As células LNCaP foram irradiadas por 40 minutos, o que representou dose de luz de 66 J cm^{-2} . Cada valor é a média ($\pm \text{dp}$) de quatro medidas. Cel representa as células. 78

Figura 32: Porcentagem de viabilidade celular versus concentração de porfirinas encapsuladas em PLGA na ausência e presença de luz (luz na legenda da figura). As células LNCaP foram incubadas por 90 minutos com as porfirinas encapsuladas e foram irradiadas por 40 minutos, o que representou uma dose de luz de 66 J cm^{-2} . Cada barra é a média ($\pm \text{dp}$) de quatro medidas. 80

Figura 33: Porcentagem de viabilidade celular em função da dose de luz incidente sobre células LNCaP contendo porfirinas encapsuladas em PLGA. As células foram incubadas por 120 minutos e a concentração das porfirinas extracelular foi $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. As doses de 33, 66 e 99 J cm^{-2} correspondem a 20, 40, 60 minutos de aplicação de luz, respectivamente. O controle (0 J cm^{-2}) corresponde às células ou células + porfirinas encapsuladas no escuro por 120 minutos. Na figura o controle contém as células e células + m-THPP. O resultado do controle para as outras duas porfirinas foram estatisticamente equivalentes ao mostrado para o m-THPP e por isto foram omitidos. Cada valor é a média ($\pm \text{dp}$) de quatro medidas. Cel representa células na figura. 81

Figura 34: Estrutura das clorinas utilizadas no trabalho de Rancan e colaboradores⁷⁰ 86

1. Introdução

A fototerapia utiliza luz para aplicações clínicas e pode ser dividida em dois grupos: a) aplicação direta, quando somente a energia proveniente da luz é utilizada no tratamento de enfermidades (icterícia neonatal, por exemplo); b) terapia fotodinâmica (PDT), quando a luz é aplicada em conjunto com um fotossensibilizador (PS) e na presença de oxigênio ^{1,2}.

A terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica usada no tratamento de doenças neoplásicas ^{3, 4} e em outras aplicações tais como infecções localizadas causadas por microorganismos ^{5,6} e fungos ⁷, tratamento de ceratose actínica ⁸, neovascularização de macula degenerada e miopia patológica ⁹. A ativação fotodinâmica também é usada no tratamento de águas residuais ¹⁰, em herbicidas e inseticidas ativados por luz solar ¹¹ e esterilização de sangue ⁶.

O uso de PDT tem aumentado e a principal aplicação clínica desta modalidade é o tratamento de doenças neoplásicas superficiais. ¹¹ Foram aprovados os tratamentos dos seguintes tipos de neoplasias por PDT em vários países: ceratose actínica, carcinoma basocelular, doença de Bowen, câncer de cabeça e pescoço, degeneração macular relacionada com a idade e miopia patológica, esôfago de Barret com alto grau de displasia, câncer cervical, câncer endobronquial, câncer do esôfago, câncer gástrico, câncer recorrente da bexiga e câncer pulmonar de estágio atrasado e avançado ^{9, 11-14}. Estão em testes clínicos os seguintes tratamentos: câncer de próstata localmente recorrente, câncer de pulmão avançado devido à obstrução endobrônquica, estágio I ou II de micoses fungicas, sarcoma de Kaposi cutâneo relacionado à AIDS, a doença cutânea mancha de vinho do Porto, tumores no ducto biliar,

vesícula biliar, pâncreas, cérebro, aplicação de PDT em carcinoma da próstata recorrente ou persistente após o fracasso da terapia de radiação ^{11, 13, 15, 16}.

Têm sido destacadas várias vantagens de PDT comparado com as terapias convencionais para o tratamento de câncer ^{15, 17}. As vantagens gerais podem ser resumidas em ¹⁵: a) plataforma tecnológica com amplo espectro de aplicação, b) a PDT é minimamente invasiva, c) baixa toxicidade, d) mecanismos de múltiplos efeitos biológicos, e) a repetição pode ser realizada sem a indução de resistência significativa ou hipersensibilidade, f) tecnologia de baixo custo e altamente portátil. As vantagens para os tumores sólidos podem ser resumidas em ¹⁵: a) efeito rápido em um único tratamento, b) o tratamento pode ser preventivo, paliativo ou curativo. Para a degeneração macular relacionada à idade a vantagem da PDT é que ela reduz ou paralisa a progressão da doença ¹⁵. Para infecção localizada, o tratamento é eficaz para um amplo espectro de microorganismos, incluindo cepas resistentes a antibióticos ¹⁵. Apesar destas vantagens sobre os tratamentos convencionais, a PDT tem sido aplicada em poucas clínicas ¹¹, indicando que esta modalidade terapêutica ainda não ganhou a aceitação clínica geral ¹⁷, porém, a aceitação está aumentando lentamente ¹⁷.

Este avanço lento da PDT pode estar relacionada com algumas limitações desta modalidade. As limitações gerais são ^{15, 17}: a) a penetração da luz no tecido é pequena (alguns milímetros), limitando a PDT ao tratamento superficial de neoplasias e lesões. A superação desta limitação irá depender do avanço tecnológico da fibra ótica para chegar a lugares mais profundos dos tecidos ¹⁷; b) a técnica é complexa para aperfeiçoar, devido a múltiplos fatores ¹⁵. A limitação para a aplicação em tumor sólido está relacionada com ¹⁵: dependência da PDT com o oxigênio e a dificuldade de se encontrar um

tratamento adequado para tumores com grandes massas. A limitação para degeneração macular está relacionada com o dano colateral gerada pela aplicação incorreta da luz em alguma área sensível ¹⁵. Duas outras desvantagens relacionam-se com a dificuldade de preparar formulações que permitam a administração sistêmica, devido às propriedades hidrofóbicas da maioria dos fotossensibilizadores (PSs), e também a acumulação seletiva do PS em tecidos doentes não é suficiente para o uso clínico ¹⁷. Estas desvantagens podem ser superadas se o PS for anfifílico, isto é, reunir na mesma molécula propriedades hidrofílicas e lipofílicas. A hidrofilicidade é importante porque permite que o PS viaje no sistema sanguíneo sem agregação ou degradação. A lipofilicidade se relaciona com a habilidade do PS entrar ou se ligar ao tumor ou à sua vasculatura. A lipofilicidade é importante porque os tumores têm receptores para substâncias lipofílicas ¹². Estas desvantagens também podem ser superadas utilizando-se PSs adsorvidos ou ligados covalentemente às nanopartículas (NPs). Elas oferecem as vantagens da hidrofilicidade e o tamanho adequado para viajar no sistema sanguíneo e se ligar ao tumor. A acumulação seletiva pode ser aumentada usando modificação da superfície para que se ligue à nanopartículas (NP) anticorpos monoclonais específicos ou moléculas que buscam o tumor ¹⁷. Outra forma de diminuir a hidrofobicidade do PS é inserir no seu macrociclo biomoléculas, tais como aminoácidos ou outras moléculas contendo o grupo amino, peptídeos e açúcares ^{18, 19}. Estas biomoléculas podem aumentar a solubilidade dos PSs, reduzir agregação no meio biológico, aumentar a afinidade do PS com as membranas, aumentar absorção pelas células, gerar uma localização subcelular seletiva e aumentar a atividade fotodinâmica.

Também tem sido relatado na literatura vantagens da PDT na relação custo-eficácia para algumas neoplasias, quando se compara com os tratamentos convencionais. Estas vantagens foram observadas comparando-se PDT com quimioterapia paliativa, cirurgia paliativa extensiva ou nenhum tratamento para o câncer avançado de cabeça e pescoço utilizando-se Foscan®²⁰. Foi observado que PDT aumenta a expectativa de vida quando comparado com a cirurgia para pacientes com esôfago de Barret com algo grau de displasia²¹.

Além disso, PDT pode ser combinado com cirurgia^{22, 23}. O tumor pode ser operado até o tamanho tratável por PDT, ou a PDT pode ser aplicada para remover possíveis restos microscópicos do tumor após a cirurgia. Ele também pode ser combinado com quimioterapia, radiação ou hipertermia. Pode ser usado como paliativo, onde o objetivo é reduzir o tamanho do tumor e então aliviar os sintomas e aumentar a expectativa de vida de pacientes terminais². Os fotossensibilizadores utilizados clinicamente no tratamento de vários tipos de neoplasias estão listados na tabela^{1, 11-13}. Na tabela 2 estão listados os fotossensibilizadores que estão em testes clínicos¹¹⁻¹³. A estrutura de alguns fotossensibilizadores usados clinicamente é mostrada na figura 1.

Tabela 1– Tipo de câncer, fotossensibilizador aprovado, país de aprovação e fabricante ^{11-13,}

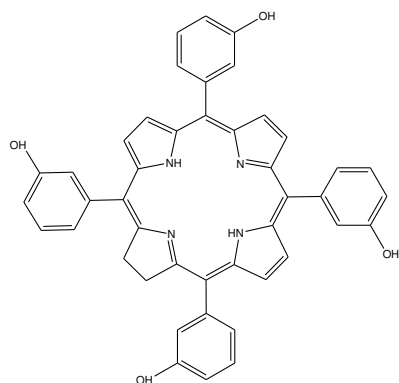
Tipo de câncer	Droga	Substância/Mistura	Grupo químico	País	Fabricante
Câncer de cabeça e pescoço	Foscan®	Termoporfina	clorina	Islândia, Noruega, US	Biolitec Pharm Ltd
Câncer do Esôfago	Photofrin®	HpD purificada	porfirina	Canadá, Dinamarca, Finlândia, França, Holanda,Irlanda, Japão, UK, US	Axcan Pharm Inc
Câncer endobronquial	Photofrin®	HpD purificada	porfirina	Alemanha, Canadá, Dinamarca, Finlândia, França, Holanda,Irlanda, Japão, UK, US	Axcan Pharm Inc
Câncer gástrico	Photofrin®	HpD purificada	porfirina	Japão	Axcan Pharm Inc
Câncer recorrente da bexiga	Photofrin®	HpD purificada	porfirina	Canadá	Axcan Pharm Inc
Carcinoma baso celular	Metvix®	ALA	porfirina	US, EU	PhotoCure ASA
Carcinoma baso celular	Photogem®	HpD purificada	porfirina	Rússia	Moscow Research
Carcinoma baso celular	Photolon®	Clorina e6-PVP	Clorina	Bielo Rússia, Rússia	Belmed Preparatory
Ceratose actínica	Levulan®	ALA	porfirina	US, EU	DUSA
Ceratose actínica	Metvix®	ALA	porfirina	US, EU	PhotoCure ASA
Degeneração macular relacionada com a idade, miopia patológica	Visudyne®	Verteporfina	porfirina	Canadá,EU, Japão, US	Novartis Pharmaceuticals
Displasia cervical	Photofrin®	HpD purificada	porfirina	Japão	Axcan Pharm Inc
Esôfago de Barret com alto grau de displasia	Photofrin®	HpD purificada	porfirina	Eua, Canadá, UK	Axcan Pharm Inc
Esôfago de Barret com alto grau de displasia	PhotoBarr®	HpD purificada	porfirina	EU	Axcan Pharm Inc
Vários tipos, vide texto.	Photosens®	Ftalocianina	Ftalocianina	Rússia	General Physics Institute
Pulmão	Laserphyrin®	Taloporfina	clorina	US	Light Sciences

ALA, ácido 5-aminolevulínico, EU, União Europeia, UK, Reino Unido, US, Estados Unidos da América

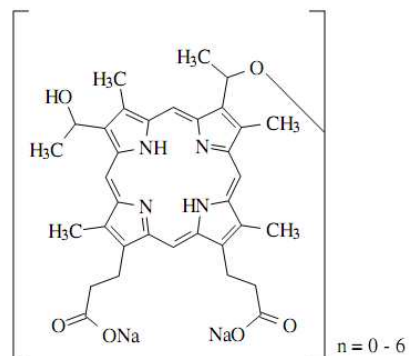
Tabela 2– Tipo de câncer, fotossensibilizador sendo testado em ensaios clínicos, países do ensaio e solicitante

Tipo de câncer	Droga	Substância/Mistura	grupo químico	País	Solicitante
Câncer recorrente de próstata, neoplasia cervical intra-epitelial	Antrin (Lu-Tex) ®	Texafirina	Texafirina	US	Pharmacylics
Ceratose actínica, doença de Bowens, câncer de pele, micose fúngica	Pc4®	Ftalocianina	Ftalocianina	US	Case Comprehensive Cancer Center
Colangiocarcinoma	Photosan®	HpD purificada	Porfirina	US	Technische Universität München
Colangiocarcinoma	Photofrin®	HpD purificada	Porfirina	US	University Hospital, Angers e Jonsson Comprehensive Cancer Center, e University College London Hospitals
Colangiocarcinoma	WST-11®	Pd-bacteriopheophorbide	Bacterioclorina	US	Steba Biotech S.A.
Duto biliar, vesícula biliar, pâncreas	Photofrin®	HpD purificada	Porfirina	US	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
Estágio III ou IV de melanoma	Verteporfin®	Verteporfina	Porfirina	US	QTL Inc
Hiperplasia prostática benigna	Litx®	Talaporfina	Clorina	US	Light Sciences
Mancha de vinho do porto	BPD-MA® (Visudyne)	Benzoporfirina	Porfirina	US	Novartis Pharmaceuticals
Próstata	Tookad (WST-9) ®	Pd-bacteriopheophorbide	Bacterioclorina	US	Steba France
Pulmão	Photochlor®	HPPH	Clorina	US	Roswell Park Cancer Institute
Sarcoma de Kaposi cutâneo relacionado com AIDS	SnET2®	Benzoclorina	Clorina	US	Clinical Solutions
Tumor maligno intra-cranial	Photosan®	HpD purificada	Porfirina	US	National Twain University Hospital
Tumor do cérebro e do sistema nervoso central	Verteporfin®	Verteporfina	Porfirina	US	Medical College of Wisconsin
Tumor do cérebro e do sistema nervoso central	Photofrin®	HpD purificada	Porfirina	US	Case Comprehensive Cancer Center

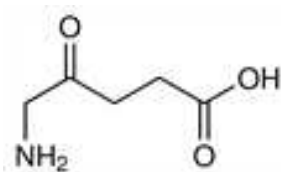
HPPH, 2-(1-hexiloxetil)-2-devinil pirofeoforbide-a



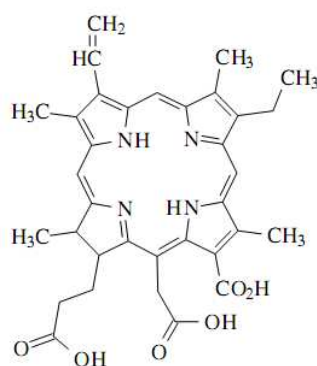
Foscan ®



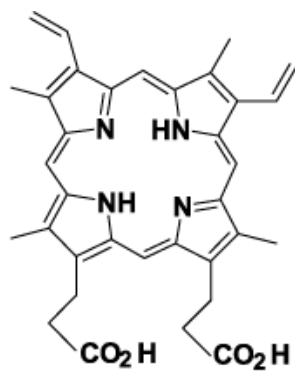
Photofrin ® ou Photobarr ®



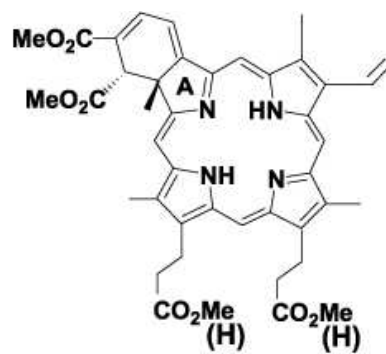
ALA



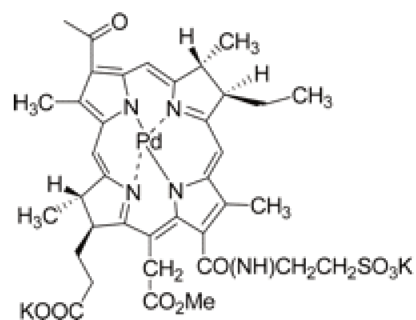
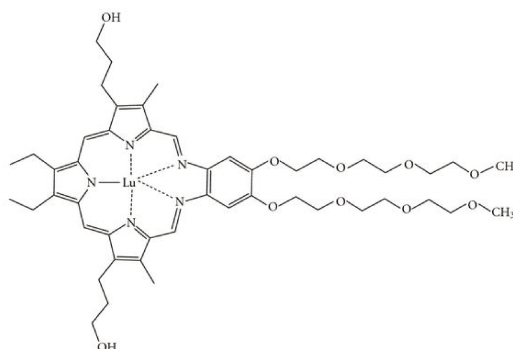
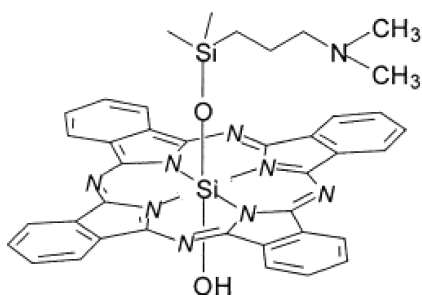
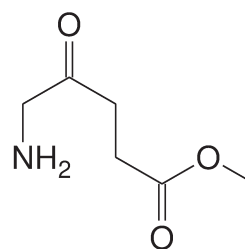
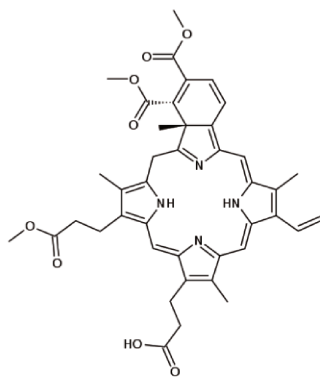
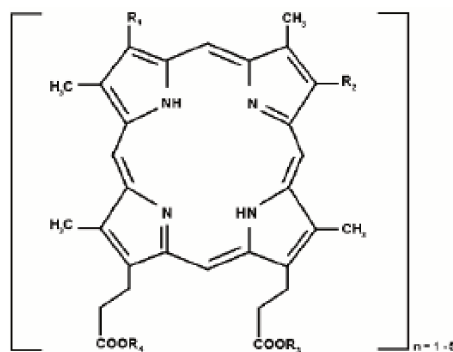
clorina e6



Levulan ®



Visudyne ®

**WST11 ®****Texafirinato de lutécio (Lu-Tex ®)****Pc4 ®****Metvix®****Verteporfin ®****Photogem ®**

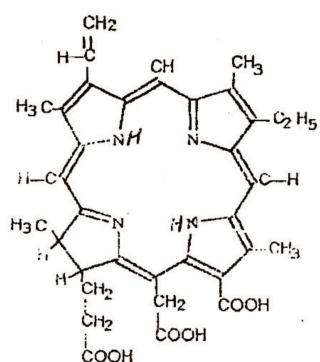
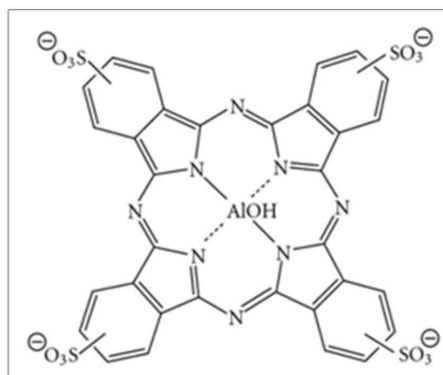
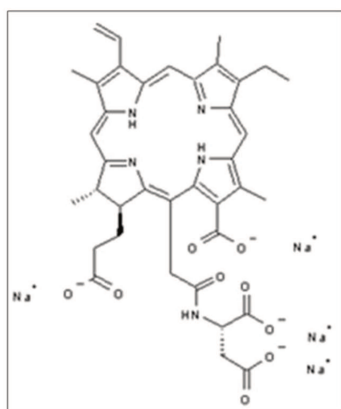
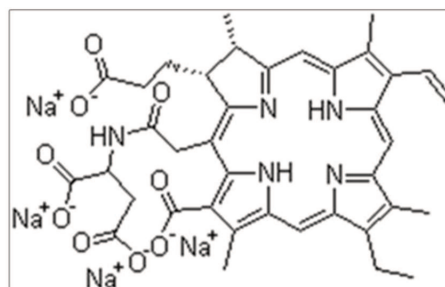
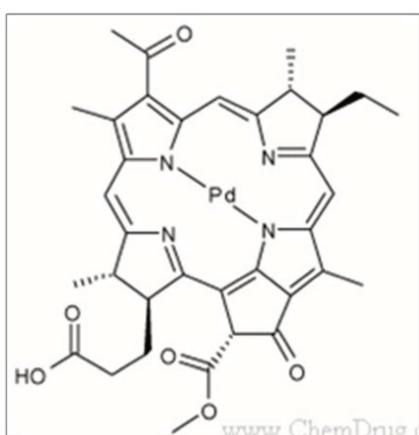
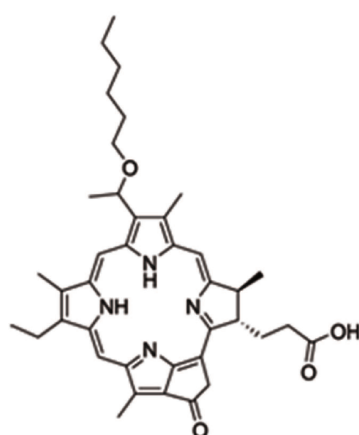
**Photolon®****Photosens®****Laserphyrin®****Litx®****Tookad®****Photochlor®**

Figura 1: Estrutura química de alguns fotossensibilizadores

1.1. Breve histórico da Terapia Fotodinâmica

Vários artigos e revisões abordam a história da PDT ^{12, 24-28}. Foram utilizadas estas publicações além das referências citadas nesta seção para preparar este resumo histórico.

Luz sozinha ou combinada com compostos químicos tem sido usada há tempos para induzir efeitos terapêuticos. Psoralenos e luz foram usados desde a antiguidade pelos indianos, egípcios e chineses para tratamento de vitiligo, assim como luz foi usada para o tratamento de psoríase. Outros fatos importantes da antiga história que contribuíram para a PDT foram: em 1841 a hematoporfirina (Hp) foi sintetizada por Scherer ²⁹ e em 1867 a fluorescência de Hp foi descoberta por Thudichum ³⁰. Considera-se que a fototerapia teve início em 1890 com Niels Finsen, que tratou tuberculose cutânea (*lupus vulgaris*) de modo direto com luz ³¹. Apesar do prêmio Nobel para Finsen em 1903 a fototerapia foi pouco desenvolvida nos anos subsequentes. Em 1900 Oscar Rab, que era estudante de medicina e trabalhava com o Prof. Herman von Tappeiner (Universidade de Munique, Alemanha) descobriu que a solução de vermelho de acridina sob o efeito de luz provocava um efeito letal sobre a Infusoria, uma espécie de paramécio ³². Em 1903 von Tappeiner e Jesionek publicaram os primeiros resultados clínicos do tratamento de carcinoma basocelular com eosina aplicada topicamente e luz ³³. von Tappeiner e Jodlbauer demonstraram o requerimento de oxigênio nas reações de fotossensibilização ³⁴. E em 1907 eles definiram a ação da luz, oxigênio e fotossensibilizador como ação fotodinâmica e introduziram o termo “photodynamic therapy” ³⁵.

Hausmann em 1911 publicou a destruição de células vermelhas de sangue e paramécio por ação de Hp e luz. Descreveu também os efeitos

colaterais de Hp e luz na pele. Em 1912 Fischer descreveu a química das porfirinas com ênfase sobre porfirias ³⁶. Em 1913 Myer-Betz realizou o primeiro experimento da ação de um fotossensibilizador em humanos. Fez-se de cobaia, injetando 200 mg de Hp em si mesmo (a dose de Photofrin® é de 2 mg por kg) e notou dor prolongada e inchaço nas áreas exposta à luz ³⁷. Em 1924 Policard publicou o primeiro trabalho na literatura utilizando a emissão de fluorescência de Hp para localizá-la em um sarcoma experimental em ratos, iluminado com luz ultravioleta ³⁸. Somente em 1942 houve uma nova publicação, quando Auler e Banzer mostraram a localização e a fluorescência de Hp administrada exogeneamente em tumores malignos de humanos ³⁹. Em 1948 os resultados deste trabalho inspiraram Figge e Weiland a investigar a possibilidade da aplicação da fluorescência no diagnóstico e tratamento de tumores. Eles injetaram Hp, cuproporfirina e hematoporfirina de zinco em 240 ratos com tumor induzido e transplantado e 50 camundongos normais. A localização foi dependente do tumor e da porfirina. Em 1955, Rassmussan-Taxdal e colaboradores mostraram que foi observada a emissão de fluorescência de Hp em sete dos oito tumores malignos de humanos mas em nenhuma das três lesões benignas. Além disto, com doses mais elevadas, foi possível detectar um câncer superficial na mama e de um carcinoma do cólon na parede intestinal. Os autores concluíram que a emissão de fluorescência de Hp é importante para o diagnóstico de tumor em tecidos doentes ⁴⁰.

Considera-se que a era atual (ou moderna) da PDT inicia-se a partir dos trabalhos do grupo de Schwartz em 1955 ⁴¹ e dos trabalhos de Lipson e Baldes em 1960 ⁴². A dose necessária de Hp para detectar tumores era muito grande, levando a uma foto-toxicidade prejudicial ao paciente. Em 1955 Schwartz e colaboradores demonstraram que Hp era uma mistura de porfirinas, cada uma

com diferentes propriedades. Após uma purificação parcial, a mistura líquida produzia uma fluorescência pequena, sendo inútil para a detecção de tumores. Porém, o resíduo tinha grande afinidade para o tecido tumoral. Entre várias tentativas de purificação, a Hp foi tratada com ácidos acético e sulfúrico, filtrada, neutralizada e dissolvendo o precipitado com acetato de sódio e obtendo uma mistura de porfirinas chamada por eles de derivado hematoporfirínico (“hematoporphyrin derivative”) (HpD) ⁴³. Lipson, da Clinica Mayo, foi convencido por Schwartz a abandonar os seus trabalhos com Hp e concentrá-los com HpD ²⁵. Em 1960 Lipson e Baldes usando tumores induzidos em animais experimentais mostraram que HpD foi mais eficaz na localização do tumor e também na diferenciação com os tecidos normais. Além disso, a dose necessária de Hp era muito menor ⁴².

Até 1972 HpD era utilizado exclusivamente em fotodiagnose (PD) de tumores em tecidos doentes. Somente em 1972, quase 70 anos após o trabalho de von Tappeiner e Jesionek em 1903, Diamond e colaboradores publicaram um trabalho mostrando que a combinação de PD e PDT de HpD poderia ser explorada para produzir um eficaz tratamento para câncer ⁴³. Foi utilizado glioma de rato, *in vivo* e *in vitro* (usando cultura de células de glioma). Os autores concluíram que PDT oferece uma nova possibilidade para o tratamento de tumores cerebrais e outras neoplasias resistentes as formas de tratamento convencionais. O artigo destes autores é considerado um marco para PDT ²⁵.

Outros marcos importantíssimos para o desenvolvimento de PDT são relatados neste parágrafo. Em 1975, Dougherty e colaboradores no Roswell Park Cancer Institute em Buffalo, relataram o primeiro caso de sucesso na completa cura de tumor em animais experimentais, após a administração de

HpD e a ativação com luz vermelha ⁴⁴. Em 1976, Kelly e Sneell obtiveram sucesso tratando cinco pacientes com câncer de bexiga com HpD e PDT ⁴⁵. Em 1978, Dougherty relatou o tratamento com PDT e HpD de 25 pacientes com 113 tumores primários ou secundários. Noventa e oito lesões regrediram completamente, 13 apresentaram uma regressão parcial e apenas duas lesões foram resistentes ao tratamento. Os tumores primários que regrediram foram o carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma basal (BCC) e melanomas malignos. As lesões metastáticas foram de tumores primários de mama, cólon e endométrio. Os resultados indicaram que PDT pode ser utilizada com sucesso em vários tumores malignos ⁴⁵.

Em 1983, Dougherty mostrou que quando Hp é convertida a HpD por acetilação produz porfirinas, tais como protoporfirina (PP) e hidroxietilvinildeuteroporfirina ⁴⁶. Em 1984, Dougherty e colaboradores, propuseram que o composto ativo de HpD é composto por duas unidades de porfirinas ligadas por uma unidade de éter ⁴⁷. Estudos analíticos posteriores realizados por Kessel e colaboradores, sugeriram que o componente ativo de HpD compreende uma mistura de anéis porfirínicos, entre 5 e 8, ligados por ligações de éter e éster ⁴⁸. Em 1985, Dougherty obteve concessão da patente do primeiro fotossensibilizador comercial ²⁸, denominado Photofrin ® (porfimer sodium), que é uma mistura de porfirinas, comercializado atualmente pela empresa Axcan Pharma, Montreal, Canadá. A primeira licença para uso clínico do Photofrin ® foi concedida pelo Canadá em 1993 para o tratamento de esôfago.

Nos últimos 30 anos PDT tem sido empregada com sucesso em vários tipos de tumores, que foram relatados na introdução.

1.2. Mecanismo de ação do fotossensibilizador

No tratamento clínico da neoplasia inicialmente há a administração local ou sistêmica da droga (PS) no paciente. Para que haja a biodistribuição do PS aguarda-se um intervalo de tempo (minutos ou dias). A ativação do PS por luz visível ou no infravermelho próximo irá excitar a molécula do PS para o estado singlete ($^1\text{PS}^*$)^{1, 4, 12}. São possíveis dois mecanismos^{1, 4, 11}:

Mecanismo tipo I

$\text{PS} + h\nu \rightarrow ^1\text{PS}^* \rightarrow ^3\text{PS}^* + \text{transferência de H ou } e^- \rightarrow \text{PSH ou } \text{PS}^- + ^3\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2^-$
ou $\text{HO}_2^- + \text{PS}$

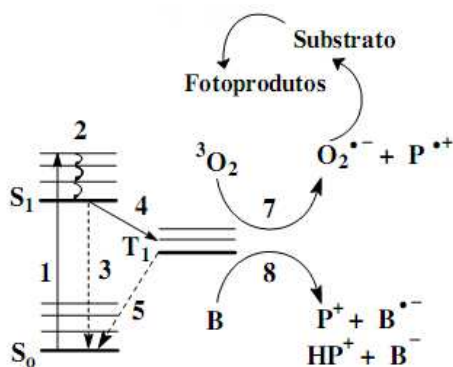


Figura 2: Diagrama de Jablonski para mecanismo do tipo I

Mecanismo tipo II (também apresentado na figura abaixo)

$\text{PS} + h\nu \rightarrow ^1\text{PS}^* \rightarrow ^3\text{PS}^* + ^3\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2 + \text{PS}$

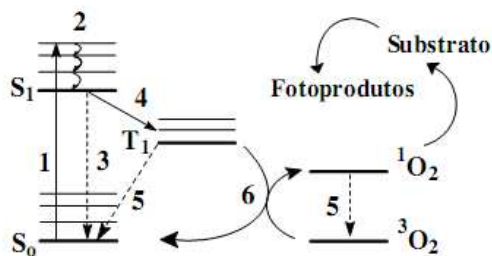
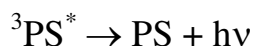


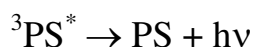
Figura 3: Diagrama de Jablonski para mecanismo do tipo II

Outros processos que podem ocorrer:

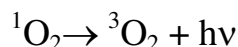
Fluorescência de $^3\text{PS}^*$:



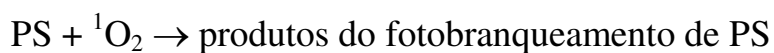
Fosforescência de $^3\text{PS}^*$:



Fosforescência de $^1\text{O}_2$:



Fotobranqueamento de PS e $^3\text{PS}^*$



O oxigênio singlete e os radicais gerados nos dois mecanismos irão danificar as células tumorais. O resultado da PDT depende destes dois mecanismos e a contribuição relativa de ambos depende do PS, substrato, concentração de oxigênio e da ligação de PS com o substrato ^{11, 49, 50}. Entretanto, consideráveis evidências indicam que o oxigênio singlete é a principal espécie reativa em PDT ^{4, 12, 50, 51}.

O PS acumula-se preferencialmente no tecido neoplásico do que no tecido normal, mas o mecanismo envolvendo esta distribuição preferencial

não é totalmente entendido^{50, 52}. A maior acumulação nos tecidos tumorais é porque estes tecidos possuem alta concentração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que formam ligações com o PS⁵³. No entanto, as células neoplásicas nem sempre são os alvos diretos do PS; elas podem ser indiretamente destruídas devido à danificação de outras células, tais como as células endoteliais vasculares¹¹. O tipo de morte celular depende do PS: quando ele se localiza na mitocôndria ou que é produzido na mitocôndria tende a induzir apoptose (morte geneticamente programada), enquanto PS localizado na membrana plasmática tende a causar necrose (geralmente ocorre por lesões físicas) durante a irradiação.

1.3 As propriedades de um fotossensibilizador ideal

Um PS ótimo para a PDT deve apresentar as seguintes propriedades^{1, 12, 50}:

a) Preferencialmente ser uma substância simples e não uma mistura.

Existem muitas variáveis a serem consideradas na aplicação da PDT, como o intervalo de tempo entre a ingestão da droga e a irradiação, o comprimento de onda utilizado, a dosimetria, a anfilicidade e a localização do PS. Se o PS for uma substância simples e estável, e não uma mistura de diferentes compostos, a interpretação da relação dose-resposta no sistema *in vivo* será facilitada.

b) Parâmetros fotofísicos

Ter uma alta absorção na região do visível ou do infravermelho próximo (600 a 850 nm), para que a luz possa penetrar com maior profundidade nos tecidos. Também deve ter um alto rendimento quântico de

formação do oxigênio singlete, de formação do tripleto, e uma alta energia do estado tripleto.

c) Citotoxicidade e estabilidade

Deve ser estável na presença de luz (fotobranqueamento) e ter uma mínima citotoxicidade na ausência de luz.

d) Seletividade, anfifilicidade, solubilidade e eliminação do organismo

O esqueleto de um PS é hidrofóbico. A introdução de substituintes polares no esqueleto é desejável porque confere ao PS a anfifilicidade, uma maior seletividade e uma maior solubilidade no meio biológico. É desejável também que o PS seja eliminado mais rapidamente do organismo para eliminar o efeito do PS na fotossensibilidade dos tecidos, principalmente da pele.

1.4 Classificação dos fotossensibilizadores

Existem maneiras diferentes de classificar os PS ¹²: a geração, a pureza sintética, alvo ou estrutura química.

Os PSs de primeira geração incluem a hematoporfirina e seu derivado purificado o Photofrin®. Nos últimos anos têm sido realizadas muitas pesquisas com o objetivo de sintetizar novos fotossensibilizadores que apresentam propriedades melhores do que o Photofrin®. Um dos motivos é que este PS tem uma pequena absorção, tem um período muito longo de permanência no corpo do paciente, resultando em uma fotossensibilidade na pele por várias semanas ^{1, 4, 12}. Apesar destas limitações, Photofrin® tem sido utilizado extensivamente nas clínicas, conforme pode ser visto na tabela 1, e é utilizado como PS de referência para testar a eficácia de novos PSs. Os PSs de segunda geração são compostos quimicamente sintetizados e puros, muitos dos quais se originam na modificação estrutural do anel tetrapirrólico das

porfirinas^{54, 55}. Os principais grupos dos PSs da segunda geração são: porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, texafirinas, ftalocianinas, porfícenos e fenotiazinas (que foram os primeiros PSs de primeira geração)^{12, 50}. PSs de terceira geração contém PSs de primeira e segunda geração associados a várias substâncias (biológicas, anticorpos, por exemplo) ou encapsulados em NPs. Teoricamente os PSs de terceira geração seriam melhores do que os de segunda e estes melhores do que os de primeira. Os PSs de terceira geração não foram aprovados, não estão em uso clínico e portanto não é possível avaliar esta suposição.

A classificação pela pureza química pressupõe que PSs que são compostos de misturas de vários componentes são inferiores aos PSs puros¹². Os seguintes exemplos podem ser usados na classificação pelo alvo: clorina e é levado aos lisossomas por endocitose^{56, 57}, ftalocianinas acumulam-se nas mitocôndrias⁵⁸, derivados de benzoporfirinas acumulam-se no complexo de Golgi⁵⁹, ALA liga-se às membranas celulares, lisossomas e mitocôndrias⁶⁰. O alvo pode ser alterado quando os PSs são associados a carregadores, tais como NPs^{61, 62}. A maior parte dos PSs são tetrapirroles cíclicos e são derivados de porfirinas, clorinas e bacterioclorinas¹². A classificação pode ser feita por estas estruturas químicas (porfirina, clorina, etc), modificadas ou não pela inserção de substituintes ou metais.

1.4.1 A pró droga ALA

A pró droga ALA é uma molécula pequena (figura 4), solúvel em água é um dos PS mais estudados e a sua aplicação gera *in vivo* a síntese de protoporfirina IX, o qual é convertido à heme. ALA pode ser aplicada topicamente ou injetada diretamente na lesão ou administrada oralmente ou sistemicamente. Quando administrada sistemicamente pode causar problemas

gastrointestinais. A iluminação é feita 18 horas após a administração tópica e pode ser feita em 410 nm, 510 nm e 635 nm. A produção de $^1\text{O}_2$ é elevada em 410 nm e o tratamento é rápido neste comprimento de onda. O tratamento cutâneo é doloroso porém eficaz ¹². Na maioria dos pacientes toda a ceratose actínica e o carcinoma baso- celular pode ser eliminada sem a internação do paciente. Tumor baso-celular mais nodular requer mais do uma sessão para a eliminação. ALA-PDT tem sido utilizado com sucesso para tumor de pescoço e cabeça, esôfago de Barret, tumor da bexiga e câncer de próstata ¹². A tabela 1 mostra os produtos comerciais de ALA autorizados para uso clínico. Ácido metil aminolevulônico (M-ALA) também é uma pró-droga, é o ALA metilado, tem uma maior lipofilicidade e maior penetração no tecido (2 mm de penetração, comparado a 1 mm de ALA) ¹². Estudos clínicos mostram que esta droga é eficiente para o tratamento de câncer superficial de pele ¹⁴.

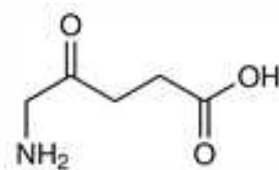


Figura 4: Estrutura química de ALA

1.4.2 Porfirinas, clorinas e bacterioclorinas

Porfirinas, clorinas e bacterioclorinas (Figura 5) são formados por quatro subunidades de pirrol unidas por 4 pontes de metila.

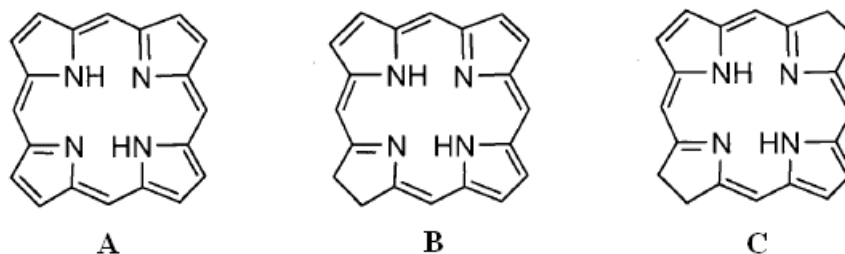


Figura 5: Estrutura da macrociclos tetrapirrólicos. Porfirina (A), clorina (B) e bacterioclorina (C)

Estas três classes de substâncias são aromáticas e obedecem a regra de Hückel pois possuem $4n + 2$ elétrons π delocalizados no macrociclo. A figura 6 indica a nomenclatura da IUPAC-IUB.

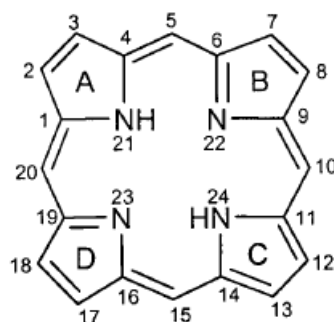


Figura 6: Nomenclatura IUPAC-IUB para o anel pirrólico

As posições 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 são também chamadas de posições α e as posições 5, 10, 15 e 20 de posições meso.

Têm sido sintetizadas porfirinas anfifílicas contendo substituintes hidrofílicos, tais como hidroxilas⁶³, açúcar⁶⁴, polietilenoglicol (PEG)⁶⁵ com o objetivo de aumentar a incorporação das porfirinas em células, aumentar a sua

solubilidade, aumentar o rendimento quântico de oxigênio singlete ou aumentar a sua eficácia para uso em PDT. Em um trabalho foi analisada a relação entre a estrutura e a atividade de 24 glicoconjugados de porfirinas, zinco porfirinas e clorinas em células HeLa ⁶⁶. Uma das conclusões foi que o glicoconjugado na posição meso é muito mais fotoativo do que na posição para ⁶⁶. Utilizando microscopia confocal a laser, os autores mostraram que os fotossensibilizadores substituídos na posição meso não foram facilmente desativados do estado excitado no microambiente celular. Foi também observado que a fototoxicidade aumentou na ordem: zinco porfirina < porfirina < clorina ⁶⁶. No entanto, foi também observado que a incorporação de flúor no anel de porfirina influencia as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos compostos. Sem a presença de flúor foi observado que a entrada do PS nas células e a atividade fotodinâmica aumentaram com a presença de um grupo fenil na posição meta em comparação com a posição para. Com a presença de flúor ocorre o inverso ⁶⁷. Em um trabalho com clorinas, foi observada que a incorporação de substituintes em dihidroxiclorinas assimétricas reduziu a agregação, aumentou a internalização dos PSs nas células de Jurkat, influenciou a localização subcelular e aumentou a velocidade da morte por necrose após a radiação. Estes efeitos foram correlacionados com o aumento de anfifilicidade da molécula do PS ⁶⁸.

A tabela 1 indica que até abril de 2010, a porfirina comercial de segunda geração aprovada para uso clínico foi o Visudyne ®, que é uma verteporfina. Também indica que foram aprovadas para uso clínico três clorinas de segunda geração: Foscan ®, Photolon ® e Laserphyrin ®. E existem três novas clorinas em testes clínicos: Litx ® que é uma taloporfina, SnET2 que é uma benzoclorina e Photochlor ® que é um HPPH.

Há na literatura poucos trabalhos com as bacterioclorinas, quando se compara com outras substâncias que apresentam atividade fotodinâmica. Tookad ® (WST09), um PS em teste clínico, atua ocluindo as artérias que alimentam e as veias de drenagem de tumores, levando a hipoxia, necrose e erradicação de tumores sólidos ^{69, 70}. Isto é incomum porque os PSs de uso clínico atuam nas células do tumor ⁵⁰. A fototoxicidade de Tookad ® na pele é de apenas algumas horas, porque a concentração no sangue é desprezível em 2 horas após a infusão, o que é como vantagem em relação a outros PSs ⁷¹. WST11®, atualmente em testes clínicos, conforme mostrado na tabela 2, é um derivado solúvel em água obtido do pigmento fotossintético Bacterioclorofila a (Bchl). Foi observado que WST11® gera em água o radical hidroxila (OH[•]) e superóxido (O₂^{-•}) e não foi detectado oxigênio singlete ⁷². Isto é novidade porque tem sido considerado que o oxigênio singlete é a principal espécie reativa em PDT ^{4, 12, 50, 51}.

1.4.3 Texafirinas

Existem poucos trabalhos na literatura sobre esta classe de substâncias. São macrociclos aromáticos sintetizados pela primeira vez em 1988 ⁷³ e são solúveis em água. Pela tabela 2, motexafin lutécio (Lu-Tex ®) está em teste clínico, é altamente fluorescente e absorve em 732 nm. Motexafin gadolínio (Gd-Tex ®) também está em teste clínico ¹³. Este composto é utilizado em conjunto com outras técnicas para o tratamento de câncer e não se inclui PDT

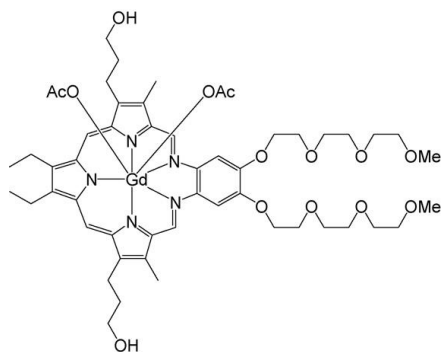


Figura 7: Texafirinato de gadolínio (III) ligado ao acetato

1.4.4 Ftalocianinas

A ftalocianina é uma classe de composto relacionada à porfirina, a diferença é que esta molécula contém 4 átomos de nitrogênio (na porfirina são 4 átomos de C) unindo as subunidades pirrólicas (Figura 8)

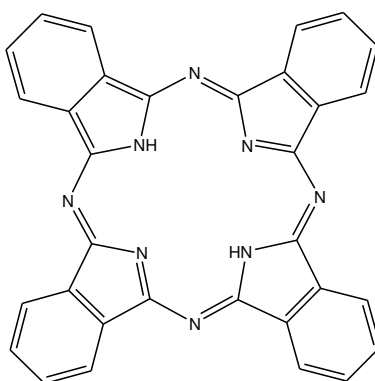


Figura 8: Estrutura básica da ftalocianina

As metaloftalocianinas (Zn, Si e Al) têm uma elevada produção de oxigênio singlete. A banda de absorção utilizada em PDT tem o máximo

geralmente em 670 nm e são ativadas clinicamente utilizando-se uma densidade de energia de 100 J cm^{-2} ¹². Como as ftalocianinas são altamente hidrofóbicas, elas têm sido encapsuladas com lipossomas ou são preparadas ligando-se substituintes nas posições alfa ou beta ^{18, 50}, ou substituintes ligados diretamente à estrutura do anel ¹⁹ para aumentar a sua anfifilicidade e diminuir a agregação em solução aquosa. Os PSs resultantes das ftalocianinas acumulam-se na mitocôndria e aparentemente a morte celular ocorre por apoptose ¹². Os Ps podem ser usados topicamente ou sistemicamente, o tratamento em geral se inicia uma hora após a aplicação e dependendo da formulação a droga pode sofrer autobranqueamento no corpo em aproximadamente 24 horas ¹². Pc4 contém silício como átomo central e está em testes clínicos para ceratose actínica, doença de Bowens, câncer de pele e micose fúngica, conforme indicado na tabela 1. Tem uma toxicidade muito pequena e tem aplicação tópica ou intravenosa ¹². Photosens ® é uma ftalocianina sulfonada, é comercialmente produzida e licenciada para aplicação clínica na Rússia e pode ser usada com aplicação intravenosa, injeção direta na lesão e na forma de aerossol. Têm sido usada com sucesso no tratamento para a fase inicial e no câncer recorrente de lábio, faringe, laringe e lesões da língua. Também tem sido bem sucedida no tratamento de neoplasia do pulmão e tumor recorrente do esôfago ^{12, 75}. Sulftalan zinc ® é uma ftalocianina solúvel, está em testes clínicos (início de 2008) na China e a sua estrutura anfifílica promove a sua absorção seletiva por células tumorais ⁷⁶.

1.4.5 Porfícenos

Porfíceno é um isômero estrutural da porfirina (Figura 9). Comparado com as porfirinas, porfícenos possuem uma menor simetria molecular e portanto uma maior absorção na região acima de 630 nm⁷⁷.

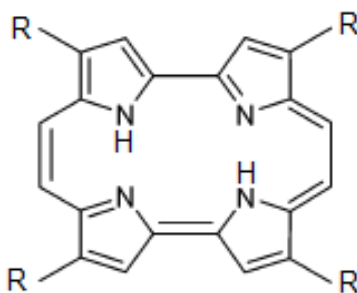


Figura 9: Estrutura de porfíceno

O espectro dos porfícenos possui duas bandas que são imediatamente observadas: a banda de Soret e a banda Q, sendo que esta última apresenta duas transições eletrônicas Q_1 e Q_2 do estado fundamental para o estado excitado singlete S_1 e S_2 . A transição Q_2 apresenta estrutura vibracional que resulta em uma terceira banda. Além disso, a banda de Soret pode ser dividida em dois termos (B_1 e B_2) que correspondem a duas transições eletrônicas do estado fundamental para o estado singlete excitado S_3 e S_4 . Porfícenos também são compostos muito fluorescentes, com Φ_F próximo a 0,3, um indicativo da alta taxa de decaimento radioativo. Além disso, são caracterizados por ser muito eficientes nos processos de conversão interna, um processo que ainda não é totalmente compreendido⁷⁸.

1.4.6 Terapia fotodinâmica antimicrobial (PACT)

PACT utiliza uma substância química específica (PS) para atacar o micróbio, e este PS exibe uma alta atividade fotodinâmica quando iluminada⁷⁹. A oxidação da biomolécula não é específica, a morte celular pode ser resultante da danificação da parede celular da bactéria, ribossomos, DNA e ou enzimas⁷⁹. Este ataque em muitas funções celulares dificulta a criação de uma resistência por parte do micróbio. Portanto, PACT é excelente para superar a rápida resistência que os microorganismos adquirem dos antibióticos^{50, 79}. PACT é uma terapia fotodinâmica para infecções localizadas e também tem denominações específicas: PDI (inativação fotodinâmica), quando as células a serem mortas são microorganismos patogênicos; PAD (desinfecção fotoativada), quando os microorganismos a serem erradicados pertencem ao organismo bucal⁶.

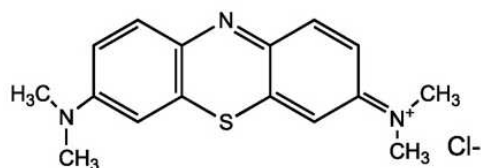
Em geral, PS neutro, catiônico ou aniônico pode eficientemente danificar bactérias Gram-positivas. Porém, somente PS catiônico foram hábeis em danificar bactérias Gram-negativas. Esta diferença de sensibilidade está relacionada com as diferentes membranas celulares⁸⁴. Bactéria Gram-positiva tem uma membrana citoplasmática circundada por uma parede celular relativamente porosa, composta pelos ácidos teichuronico e lipoteichoico, que permite o PS atravessar a membrana. O envelope celular de bactéria Gram-negativa consiste de uma membrana citoplasmática interna e uma externa. Estas duas membranas são separadas por um periplasma contendo peptioglycan. A membrana externa, que é negativa forma uma barreira física e funcional entre a célula e seu ambiente, resistindo à entrada de PS aniônicos^{50, 6, 84}. A parede celular de fungos tem uma camada relativamente compacta de

beta-glucano e quitina, que conduz a uma barreira de permeabilidade intermediária entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ⁶.

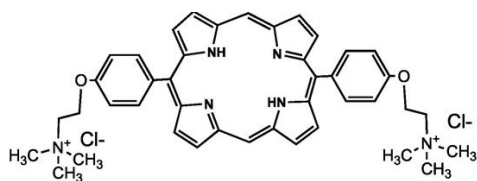
Como PSs catiônicos são mais eficientes para uso em PACT eles são preferencialmente utilizados. Por exemplo, são utilizados os corantes da classe das fenotiazianas, tais como, azul de toluidina, azul de metileno tem sido utilizados na PACT de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e células de fungos ⁸⁵. São também utilizados porfirinas catiônicas ^{86, 87}, ftalocianinas catiônicas ^{88, 89}, fulerenos catiônicos ⁹⁰ e PS não catiônicos, tal como clorina (e6) ligada covalentemente a uma molécula de polímero contendo grupos amino, tais como polilisina ^{91, 92} ou polietilenamina ⁹³. A figura 10 mostra a fórmula estrutural de 6 compostos que possuem grupos catiônicos ou básicos e que altamente ativos como PSs antimicrobiais ⁶.



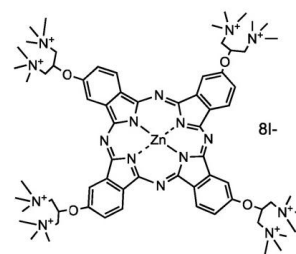
Azul de toluidina⁸⁵



azul de metileno⁸⁵



Porfirina catiônica (XF73)⁸⁷



Ftalocianina catiônica⁸⁸

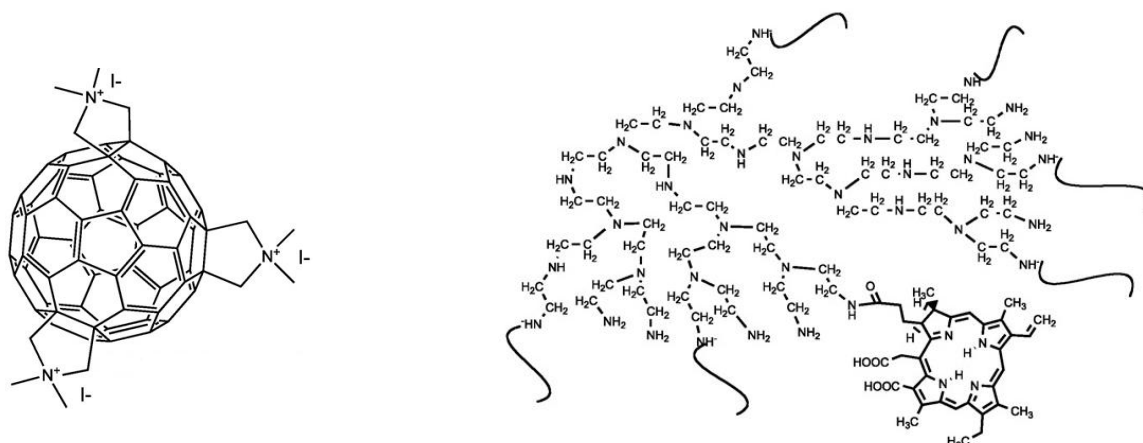
Fulereo catiônico ⁹⁰Clorina e-6 conjugada de polietilenamina
(PEI-ce6) ⁹³

Figura 10: Estruturas de representativos PSs utilizados em PACT.

1.5 Sistemas carreadores de fármacos e PDT

A hidrofobicidade é uma propriedade da maioria dos fotossensibilizadores e é um dos fatores importantes para a afinidade do PS para tecidos neoplásicos. No entanto, a hidrofobicidade diminui a solubilidade das moléculas do PS no meio fisiológico e a administração *in vivo* do PS deve ser feita por meio de sistemas de distribuição (ou carreador). Estes sistemas podem ser os lipossomas ⁹⁴ micelas poliméricas ⁹⁵, emulsão Cremophor ⁹⁶, microesferas e nanopartículas ⁹⁷. As formulações lipossomais podem melhorar significativamente a eficácia dos fotossensibilizadores, mas geralmente são incapazes de estabelecer elevadas razões do PS no tecido do tumor/PS no tecido normal. Micelas poliméricas mostram aumento da fototoxicidade *in vitro* comparado como emulsões Cremophor, mas experimentos *in vivo* têm

mostrado pequena regressão do tumor e aumento do acúmulo da micela em tecidos normais ^{98, 99}. As NPs têm despertado grande interesse por que: a) apresenta um transporte eficiente de drogas hidrofóbicas, b) a sua grande área superficial pode ser modificada pela adição de grupos funcionais com o objetivo de adicionar propriedades bioquímicas à NP, c) o seu grande volume permite uma boa distribuição dos PSs, d) é internalizada eficientemente pelas células, e) é possível a liberação controlada da droga, f) existem inúmeras estratégias de preparação disponíveis ¹⁷. Outras vantagens das NPs quando comparadas com outros sistemas de distribuição são: (1) armazenamento por um período de tempo longo, porque as suas propriedades físico-químicas permanecem inalteradas em um grande intervalo de tempo (2) a administração pode ocorrer de diferentes formas (oral, intravenosa, ou subcutânea), dependendo da sua composição (3) podem ser produzidas em escala industrial ¹⁰⁰. A maior desvantagem das nanopartículas é sua propensão a ser internalizada pelos macrófagos após a administração intravenosa e sua acumulação no baço e no fígado. Esta dificuldade pode ser contornada pela adição de grupos funcionais na NP, tal como o revestimento com polietilenoglicol (PEG) que aumentará o tempo circulação sanguínea da NP, permitindo uma acumulação do PS em maior quantidade no tecido neoplásico ¹⁷.

Tem sido amplamente demonstrado que a eficiência dos PS em induzir citotoxicidade depende da natureza do polímero. Ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) tem mostrado varias vantagens comparados com outros polímeros biodegradáveis que são rotineiramente usados nos sistemas carreadores de PSs ⁸⁰.

PLGA é um polímero biodegradável e biocompatível que tem despertado um grande interesse na formulação de partículas, que é aprovado pelo FDA para o uso em humanos^{81, 82, 83}. Pela variação da taxa de ácido glicólico/lático das moléculas de PLGA é possível controlar a taxa de degradação^{82, 83}.

A encapsulação de drogas na matriz de PLGA causa liberação numa taxa relativamente baixa através do tempo, a liberação controlada permite administrações menos frequentes, permitindo um maior bem estar do paciente. Para drogas anticancerígenas, injeção intratumoral é preferível por reduzir a toxicidade sistêmica, manter a concentração de droga constante na região alvo e prolongar a atividade farmacológica⁸¹.

2. Objetivos e justificativa

O objetivo geral deste trabalho foi comparar *in vitro* a eficácia fotodinâmica de três porfirinas, que diferem em anfifilicidade, em causar morte celular em células humanas de câncer de próstata, LNCaP. As porfirinas utilizadas foram a 5-hexil-10,20-bis(3-hidroxifenil)porfirina (Hex-m-bisHPP) e 5-hexil-10,15,20-tris(3-hidroxifenil)porfirina (Hex-m-triHPP) e 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)porfirina (m-THPP) (figura 11).

Os objetivos específicos estão relacionados com as características destas porfirinas e do sistema carreador. Os objetivos específicos foram subdivididos em:

- a) Encapsulação das três porfirinas em poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) (50:50).
- b) Preparação das nanopartículas com tamanho e potencial zeta muito próximos.

- c) Internalização das três porfirinas na mesma concentração nas células.
- d) Determinação da dependência da fototoxicidade das porfirinas em relação ao tempo de incubação, concentração das porfirinas e dose de luz.
- e) Análise da distribuição das três porfirinas nas NPs.
- f) Análise da distribuição das porfirinas nas células

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes e equipamento

As porfirinas 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)porfirina (m-THPP), 5-hexil-10,20-bi(3-hidroxifenil)porfirina (Hex-m-bisHPP) e 5-hexil-10,15,20-tri(3-hidroxifenil)porfirina (Hex-m-triHPP) cujas estruturas se encontram na figura 11 foram cedidas pelo grupo do Prof^o Mathias Senge, da Escola de Química do Trinity College Dublin.

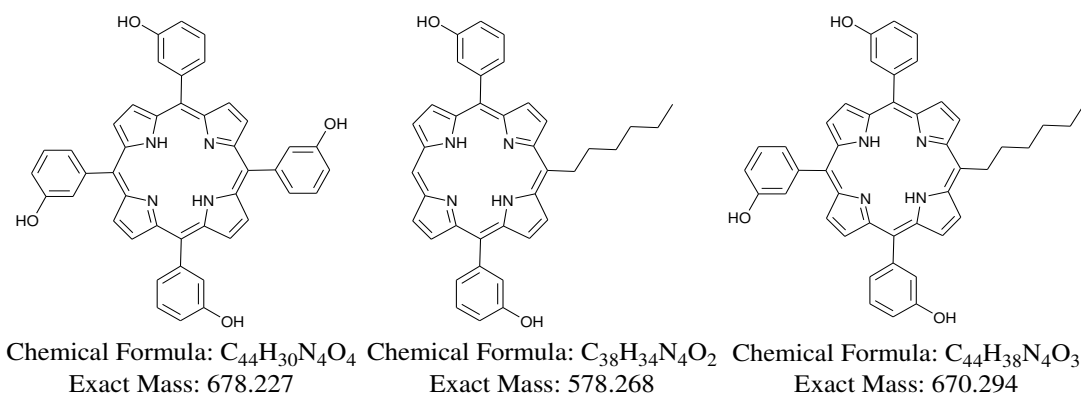


Figura 11: 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)porfirina, 5-hexil-10,20-bi(3-hidroxifenil)porfirina e 5-hexil-10,15,20-tri(3-hidroxifenil)porfirina

Células LNCaP foram fornecidas pelo Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas (Campinas, SP, Brasil). O poli-lactídio-co-glicolídio (PLGA 50:50, massa molar média por peso, Mw, 50-70 kDa), o álcool polivinílico (PVA, massa molar média por peso, Mw, 13-23 kDa, 87-89% hidrolisado), foram comprados da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Clorofórmio, diclorometano e etanol foram comprados da empresa Merck (Whitehouse Station, NJ, USA). O meio de cultura RPMI 1600 (tabela 3), o soro fetal bovino, o tampão fosfato (PBS) estéril pH 7,4 e a tripsina foram comprados da empresa Vitrocell e Embriolife (Campinas, SP, Brazil). Faloidina 635 (Alexa Fluor[®] 635) e ProLong[®] Gold com 4,6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi comprado da empresa Invitrogen (São Paulo, SP, Brasil). Annexin V-FITC foi comprado do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil), D-trealose da VETEC (Duque de Caxias, RJ, Brasil). A água usada nos experimentos foram primeiro bi-destilada e então desionizada (Millipore). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico e usados sem purificação.

Tabela 3: Constituição do meio de cultura RPMI 1600

constituente	g/mL	constituente	g/mL
L-arginina (base livre)	0,200	biotina	0,002
L-arginina (anidra)	0,050	D-pantotênico	0,00025
L-aspartico, ac.	0,020	colina, cloreto de	0,003
L-cistina . 2HCl	0,0652	fólico, ac.	0,001
L-glutâmico, ac.	0,020	mioinositol	0,035

L-glutamina	0,300	niacinamida	0,001
glicina	0,010	PABA	0,001
L-histidina (base livre)	0,015	piridoxina HCl	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	vitamina B12	0,000005
L-lisina . HCl	0,040	nitrato de cálcio x H ₂ O	0,100
L-metionina	0,015	cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	cloreto de sódio	6,000
		sulfato de magnésio	
L-prolina	0,020	anidro	0,04884
		fosfato de sódio dibásico	
L-serina	0,030	anidro	0,800
L-treonina	0,020	D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005	glutamina, reduzida	0,001
L-tirosina . 2Na	0,02883	vermelho fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		

Espectros na região UV/Visível foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro UV-Visível Hewlett Packard ® 8452A - diode array. O tamanho das esferas e do potencial zeta foram medidos no equipamento

Zetasizer 3000 HAS da Malvern Instruments, no laboratório da Prof^a. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli do Departamento de Físico-química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP. O microscópio confocal Zeiss LSM 510, equipado com um laser de Ar ($\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm) (Carl Zeiss Microimaging, Inc., Thornwood, NY, USA), do laboratório da Prof^a Sara Teresinha Olalla Saad do Hemocentro da Unicamp foi utilizado para se observar a distribuição das porfirinas nas nanopartículas e das nanopartículas nas células. A emissão de fluorescência das porfirinas a partir de 610 nm foram selecionadas utilizando um filtro RP 590. Para a irradiação das células foi utilizado um laser de 645 nm (criptônio) (M. A. C. Morgon, Curitiba, Brasil) com comprimento de onda de 645 nm e potência de 30 mW/cm² (a distância de 2 cm do alvo), conforme mostrado na figura 12. A potência sofre uma redução de 5,75 % por centímetro linear.

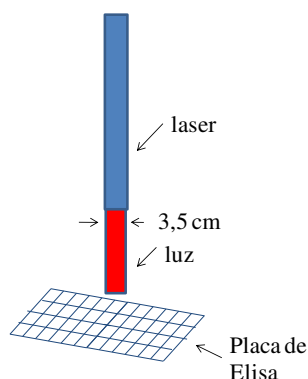


Figura 12: Laser de comprimento de onda de 645 nm utilizado nos experimentos

Também foram utilizados a balança analítica Mettler AE200, a microbalança Perkin Elmer AD-6 Autobalance, o dispersor Turrax ® T 18 (IKA), o liofilizador Freezone ® 4.5 da LabConco, o microscópio eletrônico

de varredura JSM 6360 LV (JEOL), o microscópio eletrônico de transmissão Philips CM 200.

3.2. Determinação do comprimento de onda de emissão e excitação

Para determinação do comprimento de onda de emissão e excitação solubilizou-se as porfirinas em clorofórmio.

3.3. Cálculos de propriedades das porfirinas

O cálculo de pKa foi feito utilizando o programa: <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html>, e o volume utilizando o programa: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Os valores da solubilidade (S) e do coeficiente da partição (P) foram obtidos no endereço: <http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html>. O momento de dipolo foi calculado usando o programa AM1 (Autin Model 1).

3.4. Preparação das partículas de PLGA utilizando-se o planejamento fatorial fracionário 2^{3-1}

A utilização de planejamento fatorial na preparação de partículas é importante porque o número de experimentos necessários para se obter uma preparação desejada é menor. Por exemplo, se formos fazer um planejamento fatorial com 3 fatores (velocidade de agitação, número de lavagens e relação: massa de porfirina/massa PLGA) e dois níveis (menor e maior intensidade dos fatores) precisamos realizar oito (2^3) experimentos. O número de experimentos pode ser diminuído se for feito um planejamento fracionário 2^{3-1} que exige 4 ensaios, conforme é mostrado na tabela 4.

Tabela 4: Fatores, níveis e matriz do planejamento fatorial 2^{3-1} para a preparação de partículas de PLGA encapsuladas com as porfirinas

Fatores		Níveis	
Estudados		+	-
A	Velocidade de agitação/ RPM	18000	22000
B	Etapas de lavagem	3	6
C*	$m_{\text{porfirina}}/m_{\text{PLGA}} / \%$	0,6	6

Ensaio	Fatores		
	A	B	C**
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+

* As massas foram respectivamente 0,3 mg e 3 mg para 0,6% e 6% de porfirina/PLGA.

** Os sinais atribuídos ao fator C foram obtidos através do produto das colunas A e B.

O cálculo dos efeitos de cada fator sobre o diâmetro da esfera foi realizado utilizando-se o software Chemomatrix desenvolvido pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Roy E. Bruns (IQ-UNICAMP). Os sinais (+) e (-) foram usados para identificar os níveis superiores e inferiores, respectivamente, de cada fator estudado.

As partículas foram preparadas pelo método de emulsão/evaporação⁹⁸. Tipicamente, PLGA (50 mg) e cada uma das porfirinas (0,3 ou 3,0 mg) foram dissolvidas conjuntamente em 10 mL de diclorometano. Esta solução foi adicionada gota a gota através de seringa a uma solução aquosa contendo 45 mL de álcool polivinílico (PVA) (1% m:v), na taxa de 0,5 mL/s. Durante e após a adição a emulsão formada foi agitada continuamente em um béquer com diâmetro interno de 5,6 cm, por 20 minutos a 10 °C a velocidade de 18.000 ou 22.000 RPM, utilizando-se um dispersor com haste modelo S18N-

19G ($\varnothing = 1,9$ cm). A distância entre a parte final da haste em relação ao fundo do béquer foi 0,6 cm e em relação ao menisco da fase aquosa foi de 1,4 cm. A emulsão resultante foi mantida sob agitação magnética por 24 horas. para evaporação do diclorometano. As esferas obtidas foram lavadas com água deionizada e centrifugadas por 3 ou 6 vezes a 20.000G por 20 minutos a 10°C, sendo o sobrenadante descartado a fim de eliminar o excesso de PVA presente em solução, bem como, a porfirina não encapsulada. As esferas foram posteriormente liofilizadas por 48 horas usando trealose como crioprotetor na proporção 1:2 (massa de trealose:massa de PLGA).

3.4.1. Preparação das nanopartículas de PLGA utilizando-se o planejamento fatorial fracionário 2^2

Foram necessárias várias alterações na preparação das partículas porque o diâmetro das mesmas obtidas no planejamento fatorial 2^{3-1} foi na ordem de micrometros. Foi utilizado o mesmo método de emulsão/evaporação⁹⁹. Mas nesta nova preparação a fase orgânica foi composta por uma solução de clorofórmio contendo 5 % de etanol ao invés de diclorometano, na fase aquosa foi adicionado etanol, o número de lavagens foi fixada em três e a velocidade foi fixada em 18.000 RPM. O planejamento fatorial completo 2^2 utilizado é mostrado na tabela 5.

Tabela 5: Fatores, níveis e matriz do planejamento fatorial 2^2 para a preparação de partículas de PLGA encapsuladas com as porfirinas

Fatores Estudados		Níveis	
		-	+
A*	$m_{\text{porfirina}}/m_{\text{PLGA}} / \%$	1	2
B	% etanol na fase aquosa	15	30

Ensaio	Ensaio	
	A	B
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

* As massas foram respectivamente 0,5 mg e 1 mg para 1% e 2% de porfirina/PLGA.

3.5. Análise da morfologia das partículas por Microscopia Eletrônica de Varredura

Uma massa de 1,0 mg do liofilizado foi dispersa em 1,0 mL de água deionizada, sendo sonicada por 1 minuto. Posteriormente, uma gota da dispersão foi aplicada sobre o stub do microscópio eletrônico de varredura (MEV). O excesso de líquido foi removido com um papel de filtro. Após secagem da gota, o stub foi revestido com ouro, usando-se um metalizador MED 20 Coating System (Bal-Tec) operado nas seguintes condições: 30 mA de corrente e 50 mTorr de pressão por 160 minutos, e o material foi observado no MEV.

3.6. Determinação do tamanho das partículas

O tamanho das partículas foi determinado através de espalhamento de luz dinâmica usando o equipamento Zetasizer 3000 HAS da Malvern

Instruments no laboratório da Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli (USP-Ribeirão).

3.7. Determinação da porcentagem de encapsulação e de recuperação das partículas

Uma massa conhecida (aproximadamente 1 mg) de partículas liofilizadas na ausência de trealose foi dissolvida em 1,0 mL de CHCl_3 , sendo uma alíquota desta solução diluída 10 vezes para análise no espectrofotômetro no comprimento de onda de emissão da porfirina. Utilizando-se o método de adição de padrão obteve-se uma curva analítica das medidas de absorbância em função da concentração das porfirinas ($0 - 10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Através da curva analítica e do conhecimento da massa da partícula liofilizada, das massas de PLGA e porfirina utilizadas no preparo das partículas, foi possível a determinação da massa do fotossensibilizador presente na massa de partícula recuperada e da porcentagem de encapsulação da porfirina nas esferas de PLGA, conforme equações abaixo:

$$\% \text{ Partícula recuperada} = \frac{\text{massa de partícula recuperada}}{\text{massa de PLGA utilizada} + \text{massa de porfirina utilizada}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Porfirina presente nas partículas liofilizadas} = \frac{\text{massa de Porfirina contida na partícula liofilizada}}{\text{massa de partícula liofilizada}} \times 100 \quad (2)$$

$$\% \text{ Porfirina (teórica) presente nas partículas} = \frac{\text{massa de Porfirina utilizada no preparo das partículas}}{\text{massa de Porfirina utilizada} + \text{massa de PLGA utilizada}} \times 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ de Porfirina encapsulado} = \frac{\% \text{ Porfirina presente nas partículas liofilizadas}}{\% \text{ Porfirina (teórica) presente nas partículas}} \times 100 \quad (4)$$

3.8. Medida do potencial zeta

As medidas de potencial zeta foram feitas pela determinação pela mobilidade eletroforética das partículas a 25°C, utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 com uma célula capilar de quartzo contendo um par de eletrodos de paládio. Estas medidas foram realizadas no laboratório da Profa. Dra. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli (USP-Ribeirão). Uma massa conhecida (aproximadamente 1,0 mg) de partículas liofilizadas foi dispersa em 10 mL de água deionizada, e então sonicada por 10 minutos. Foram feitas duas replicatas de 10 medidas cada.

3.9. Estudo de liberação *in situ* das porfirinas encapsuladas

Uma massa de partículas de PLGA contendo 3 µg de porfirina encapsulada foram ressuspensas em 2,0 mL de isobutanol a 27°C em uma cubeta de quartzo. A escolha deste solvente foi porque ele dissolve somente as porfirinas. Foram obtidos espectros de absorção usando a técnica de espectroscopia de refletância difusa (ERD) que permite a eliminação da influência da luz espalhada pelas partículas no espectro de absorbância da porfirina, não precisando separar as partículas do meio de liberação. Os espectros foram obtidos em intervalos pré-determinados utilizando-se um padrão sólido de politetrafluoretileno na fenda de saída. O espectro obtido do padrão sólido e do isobutanol puro foi usado como branco. Para quantificar as porfirinas liberadas foram feitas curvas analíticas das mesmas em função da concentração.

3.10. Determinação da distribuição das porfirinas nas nanoesferas de PLGA através de microscopia eletrônica de varredura a laser confocal

Uma massa conhecida (aproximadamente 1 mg) das partículas foi ressuspendidas em 1 mL de água e sonicada por 1 minuto e 50 μ L da suspensão foi espalhada através da técnica do esfregaço sobre uma lamina de vidro, que foi deixada em repouso a temperatura ambiente para secagem. Após, foi fixada a lamínula sobre a lâmina e as esferas foram visualizadas usando o microscópio Zeiss Confocal LSM 510 equipado com laser do aparelho ($\lambda_{\text{ex}} = 543$ nm) e laser argônio-criptônio ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ nm) (Carl Zeiss Microimaging, Inc., Thornwood, NY, USA). A emissão de fluorescência das porfirinas foi acima de 605 nm de modo que se usou o filtro BP605 (Carl Zeiss Microimaging, Inc.).

3.11. Cultivo de células LNCaP

Foi necessário fazer um treinamento para o cultivo das células de câncer próstata humano (LNCaP). Este treinamento foi iniciado no laboratório da Prof^a Sara Teresinha Olalla Saad, (Hemocentro, UNICAMP) e posteriormente complementado no laboratório do Prof^o Aníbal Vercesi (FCM, UNICAMP).

Os protocolos para o cultivo das células estão relacionados nos itens 3.11.1 a 3.11.4. O meio de cultura A tem a seguinte composição: 50 mL de soro fetal bovino, 450 mL de RPMI 1640, 100 UI/ mL penicilina, 100 mg/mL estreptomicina e 100 μ g/mL de sulfato de gentamicina.

3.11.1. Descongelamento de células

As células LNCaP contidas nos criotubos foram retiradas do nitrogênio líquido (-150°C) e degeladas a 37°C. As células foram colocadas em um tubo falcon com 5 a 8 mL de meio A, centrifugadas por 3 minutos a 1250 g e o sobrenadante foi aspirado e eliminado. Ao tubo falcon foi adicionado mais 7 mL do meio A e com uma micropipeta o líquido contendo as células foi aspirado e novamente repostado no tubo falcon várias vezes para desfazer os agregados de células. Exceto a centrifugação, todas as demais operações foram realizadas na câmara de fluxo laminar.

3.11.2. Cultivo de células

Na capela de fluxo laminar pipetou-se as células recém descongeladas do tubo falcon para uma garrafa esterilizada de 75 mL. As células LNCaP crescem por adesão ao fundo do frasco e portanto esta garrafa é para células aderentes. A garrafa tinha aproximadamente 10 mL de meio A e as células foram pipetadas evitando-se a formação de bolhas. Estas são evitadas inclinando-se a garrafa e liberando-as em um canto da garrafa. Posteriormente as células foram dispersas balançando suavemente a mistura para os lados. A garrafa de cultura foi colocada na estufa por 48 h, com um fluxo de 5 % de CO₂ a 37°C. A tampa da garrafa de cultura foi parcialmente aberta para permitir o contato do ambiente celular com o gás carbônico.

3.11.3. Tripsinização

O meio de cultura foi trocado várias vezes durante o crescimento das células. O meio era trocado sempre que ele ficava com uma coloração amarelada. A troca sempre era feita na capela de fluxo laminar e após o

crescimento das células, que pode ser acompanhado olhando-se o fundo da garrafa, ou através de microscópio invertido, o meio de cultura era descartado e as células foram lavadas 3 vezes com tampão PBS para retirada do soro fetal bovino, que é responsável pela inativação da tripsina. Adicionou-se aproximadamente 1,5 mL de tripsina e nesta operação foram dadas leves batidas na garrafa de cultura para soltar as células. Esta operação foi rápida (2 a 3 minutos) para evitar a morte das células. A tripsina foi inativada utilizando-se o dobro do volume do meio A do que foi usado com a tripsina, uma vez que a tripsina danifica as células quando fica muito tempo em contato com estas.

A tripsinização é feita para que as células que estão aderidas no fundo da garrafa de cultivo sejam soltas para poderem ser contadas para futuro experimento ou para congelamento.

3.11.4. Contagem de células

As células recém tripsinizadas contendo meio A são centrifugadas a 125g por 3 minutos, e então solubilizadas com 1-3 mL de meio A. 20 µL da solução com células foram colocadas na câmara de Neubauer, sem deixar espaços vazios ou vazamentos. As células da câmara L e central (figura 13) foram contadas utilizando-se um microscópio Leica Stereo-Microscopio MZ 12,5 (Leica Microsystems). Para encontrar o número de células dividiu-se o valor da contagem encontrado por 5, e multiplica-se por 10000 (equação 5):

$$n^{\circ} \text{ células} = \frac{\text{total de células}}{5} \times 10000 \quad (5)$$

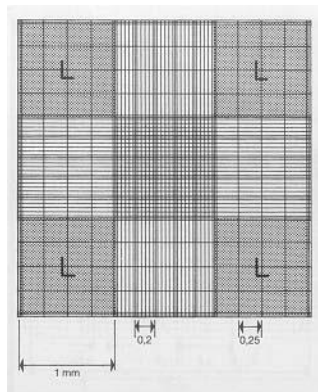


Figura 13: Camara de Neubauer

3.11.5. Congelamento de células

Após a tripsinização, colocou-se a mistura contendo as células em um tubo falcon esterilizado, centrifugou-se por 3 minutos a 1250 g e a fase líquida foi retirada. Adicionou-se ao tubo falcon dimetilsulfóxido (DMSO) e soro fetal bovino. Para cada criofrasco contendo as células a serem congeladas a proporção foi 900 μL de soro e 100 μL de DMSO. Este meio foi misturado com uma micropipeta até os agregados visíveis serem desfeitos. Os criofrascos foram colocados no freezer a -80°C por 24 horas e depois no nitrogênio líquido.

3.12. Determinação da localização das porfirinas nas células LNCap

As células LNCaP foram cultivadas em concentração de $3 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ em placas contendo lamínula por 48h usando RPMI 1640. Após este período, o meio de cultura foi substituído por uma suspensão de partículas contendo as porfirinas em RPMI 1640. As células foram incubadas por 2 horas, lavando-se os poços em seguida 2 vezes com tampão fosfato (PBS). Em seguida, foram adicionados nos poços 400 μL de uma solução de paraformaldeído em PBS

(4%) para fixação das células, aguardando-se 20 minutos, e realizando-se então 3 lavagens com PBS e a retirada da lamínula. Sob a lamínula foi adicionada uma solução de permeabilização 0,2% (m:v) de Triton X100® em TBS , que foi deixada em contato com as células por 5 minutos, para se bloquear o efeito de permeabilização usando uma solução 3% (m:v) de albumina bovina em tampão PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida 100 µL de uma solução de faloidina 635 foi adicionada sobre a lamínula e mantida em contato com as células por 30 minutos ao abrigo da luz para marcação do citoesqueleto - F-actina. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS para eliminar a faloidina 635 residual e 100 µL de uma solução de montagem ProLong® Gold contendo 4',6 diamidino-2-fenilindol (DAPI) para marcação nuclear foi posta em contato com a lamínula à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As amostras então foram visualizadas no microscópio confocal Zeiss LSM 510 usando lentes objetivas de imersão em água.

3.13. Determinação da Viabilidade celular por MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) ¹⁰²

Em uma placa de Elisa com 48 poços, incubou-se as células por 48 horas. Retirou-se o meio RPMI 1600 suplementado e adicionou-se na placa 200 µL de solução de MTT 5 mg/mL em PBS. Após 30 minutos de incubação, removeu-se o sobrenadante e dissolveu-se os cristais de formazan em 400 µL de DMSO. Obtêm-se então os espectros de absorção dessa solução. A curva padrão foi obtida com concentração de 500 a 400000 células/mL. O experimento foi feito em quadruplicata.

3.14. Foto-oxidação de células humanas de câncer de próstata da linhagem LNCaP utilizando as porfirinas encapsuladas

3.14.1. Efeito do tempo de internalização.

Células LNCaP foram cultivadas, conforme descrito no item 3.11.2. Alíquotas das suspensões de células (concentração de 3×10^5 cel mL⁻¹) foram cultivadas em placas de cultura de 48 poços de 13x13 mm por 48 horas na estufa de CO₂. As culturas foram incubadas em tempos variados (30, 60, 90 e 120 minutos) com as suspensões das partículas (5 µmol L⁻¹). Após este período, trocou-se o meio para retirar as nanoesferas contendo porfirinas não internalizadas, e realizou-se a foto-oxidação das células, irradiando-se as placas 40 minutos usando laser de 645 nm a 3,5 cm de distancia.

O meio foi retirado e a placa foi lavada com tampão fosfato para eliminar o resíduo de soro fetal bovino. Foram adicionados 200 µL de uma solução 5 mg mL⁻¹ de mTT e deixado em repouso por 30 minutos. Em seguida foram lavadas com solução de PBS, e foi adicionado 400 µL de DMSO, realizando-se leitura da absorbância em 570 nm.

3.14.2. Efeito da concentração.

Células LNCaP foram cultivadas, conforme descrito no item 3.11.2. Alíquotas das suspensões de células (concentração de 3×10^5 cel mL⁻¹) foram cultivadas em placas de cultura de 48 poços de 13x13 mm por 48 horas na estufa de CO₂. As culturas foram incubadas por 90 minutos com as suspensões das nanopartículas nas concentrações de 2,5; 5,0 e 7,5 µmol L⁻¹. Após este período, trocou-se o meio para retirar as partículas contendo porfirinas não

internalizadas, e realizou-se a foto-oxidação das células, irradiando-se as placas 40 minutos usando laser de 645 nm a 3,5 cm de distancia.

O meio foi retirado e a placa foi lavada com tampão fosfato para eliminar o resíduo de soro fetal bovino. Foram adicionados 200 μL de uma solução 5 mg mL^{-1} de mTT e deixado em repouso por 30 minutos. Em seguida foram lavadas com solução de PBS, e foi adicionado 400 μL de DMSO, realizando-se leitura da absorbância em 570 nm.

3.14.3. Efeito do tempo de irradiação.

Células LNCaP foram cultivadas, conforme descrito no item 3.11.2. Alíquotas das suspensões de células (concentração de 3×10^5 cel mL^{-1}) foram cultivadas em placas de cultura de 48 poços de 13x13 mm por 48 horas na estufa de CO_2 . As culturas foram incubadas por 120 minutos com as suspensões das partículas na concentração de 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após este período, trocou-se o meio para retirar as nanoesferas contendo porfirinas não internalizadas, e realizou-se a foto-oxidação das células, irradiando-se as placas por 20, 40 e 60 minutos usando laser de 645 nm a 3,5 cm de distancia.

O meio foi retirado e a placa foi lavada com tampão fosfato para eliminar o resíduo de soro fetal bovino. Foram adicionados 200 μL de uma solução 5 mg mL^{-1} de mTT e deixado em repouso por 30 minutos. Em seguida foram lavadas com solução de PBS, e foi adicionado 400 μL de DMSO, realizando-se leitura da absorbância em 570 nm.

3.15. Quantificação da internalização das porfirinas encapsuladas nas células LNCaP

Células LNCaP foram cultivadas, conforme descrito no item 3.11.2. Aliquotas das suspensões de células (concentração de 3×10^5 cel mL⁻¹) foram cultivadas em placas de cultura de 48 poços de 13x13 mm por 48 horas na estufa de CO₂. Após este período, o meio de cultura foi substituído por uma suspensão de partículas em RPMI 1640 (7,5 µmol L⁻¹), e foram incubadas por 120 minutos. Após este período, as placas foram lavadas por 3 vezes usando o meio de cultura a fim de eliminar o fotossensibilizador livre ou encapsulado que não havia sido internalizado nas células. Em seguida as células aderidas ao frasco foram soltas através de uma solução 0,25% m/v de tripsina e 0,02% m/v de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), e o pellet obtido por centrifugação (500 x g) foi ressuspensionado em uma solução de 0,2 mol/L de NaOH contendo Triton X100 ® 0,5 %.

As porfirinas foram quantificadas através de espectro de absorção, usando-se uma curva analítica.

3.16. Estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o teste de análise de variância (Anova, fator único) ¹⁰⁶ seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas.

Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Office Excel, colocando-se todos os resultados do experimentos cada um em sua respectiva coluna, e então se selecionando o teste Anova. Se o resultado de valor-P obtido pelo programa Anova fosse maior que o intervalo de confiança selecionado (95%), os dados seriam equivalentes. Porém se o valor-P fosse

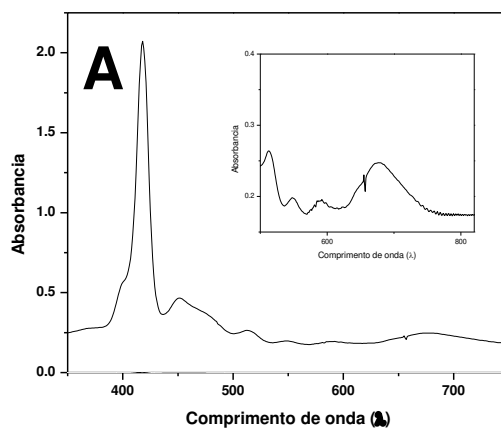
menor que o intervalo de confiança selecionado, seria utilizada a formula abaixo (equação 6):

$$dms = q * \sqrt{\frac{QMR}{r}} \quad (6)$$

Onde o q é o valor critico de faixa de distribuição estudada para uma família com confiança de 95%, QMR (quadrado médio do resíduo da análise de variância) corresponderá ao valor de MQ (quadrado médio) dentro do grupo obtido pelo teste ANOVA, r é o numero de repetições de cada tratamento. dms (diferença mínima significativa) será então comparado com a diferença entre as médias das medidas a serem analisadas, e o resultado obtido sendo menor que o valor de dms, os dados estudados são considerados equivalentes.

4. Resultados e discussão

4.1. Espectros de absorção dos fotossensibilizadores



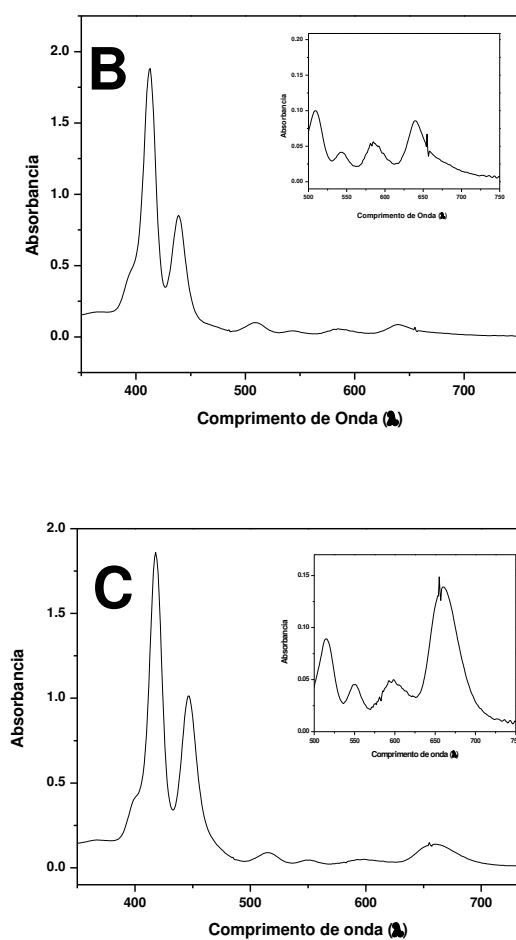


Figura 14: Espectros eletrônicos de absorção das porfirinas. m-THPP (A), Hex-m-bisHPP (B) e Hex-m-triHPP(C) em diclorometano

Tabela 6: Valores de ϵ para as porfirinas m-THPP, hex-m-bisHPP e hex-m-triHPP

m-THPP		hex-m-bisHPP		hex-m-triHPP	
λ (nm)	ϵ	λ (nm)	ϵ	λ (nm)	ϵ
419	329000	414	269600	418	268300
515	14500	511	11900	516	11200
550	5600	545	3600	550	4600
592	5200	585	3800	591	3400
648	3200	642	2100	648	2800

As porfirinas apresentam cinco bandas características na região visível. A mais intensa entre 415 a 420 nm está relacionada à transição do orbital a_{1u} para o orbital degenerado e_g . As outras 4 bandas são menos intensas e estão localizadas entre 520 a 645 nm. A simetria das porfirinas é do tipo D_{2h} ¹⁰⁹. Nos experimentos de foto-oxidação as três porfirinas foram excitadas no comprimento de onda de 645 nm.

4.2. Propriedades das porfirinas

Os resultados obtidos são mostrados na tabela 7:

Tabela 7: Propriedades das porfirinas

Propriedade	m-THPP	Hex-m-bisHPP	Hex-m-triHPP
Momento dipolar ¹⁰⁴	0 D	0,25 D	1,23 D
ϕ_{Δ} em etanol ¹⁰⁵	$0,69 \pm 0,07$	$0,63 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,07$
LogS	$-5,9 \pm 1,4$	$-5,8 \pm 1,3$	$-6,4 \pm 1,6$
LogP	$7,8 \pm 1,3$	$8,4 \pm 1,4$	$9,4 \pm 1,4$
pKa	8,0	8,0	8,0
Volume	594,2	535,9	615,4

A porfirina Hex-m-triHPP tem o maior momento dipolar e também é anfifílica devido ao grupo 3-hidroxi-fenila na posição 15, que confere a molécula a assimetria e o momento dipolar diferente de zero. A porfirina m-THPP é simétrica e a polaridade dos grupos 3-hidroxi-fenila se cancelam, fazendo com que a molécula não seja anfifílica. O alceno hexila ligado na posição 5 do anel porfirínico é apolar, mas a molécula Hex-m-bisHPP é assimétrica e com um momento dipolar de 0,25 D. A figura 15 indica a estrutura tridimensional de Hex-m-triHPP e é mostrado que os grupos fenilas estão perpendiculares ao anel porfirínico e o grupo –OH se alterna acima e abaixo do plano ¹⁰².

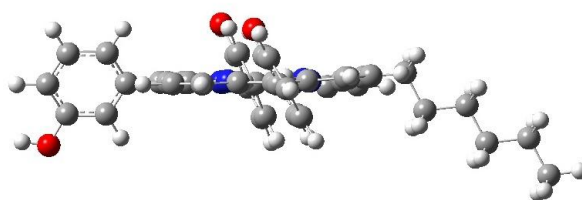


Figura 15: Estrutura tridimensional da porfirina Hex-m-triHPP

O rendimento quântico do oxigênio singlete ¹⁰⁵ das três porfirinas são iguais. Esta característica e as diferentes anfifilicidades foram decisivas na escolha destas três porfirinas para esta dissertação de mestrado.

Observa-se que, como esperado, a solubilidade em água de todas as porfirinas é bastante pequena. O esqueleto orgânico das porfirinas é o responsável por esse comportamento, conferindo hidrofobicidade às porfirinas. O coeficiente de partição entre a fase do solvente orgânico e a água (em geral, octanol-água) é um fator que pode ser usado para prever a habilidade da molécula ou droga de difundir em biomembranas, já que ele é constituído pela soma dos valores dos fragmentos dos componentes moleculares. Como os valores de P normalmente variam em algumas ordens de magnitude, é comum se expressá-lo na forma logarítmica, como log P. Não foi possível a determinação experimental de log P devido à baixíssima solubilidade das porfirinas em água, o que resultaria em grande erro experimental ¹⁰⁷. Os valores mostrados na tabela para log P e log S representam a média e o desvio dos valores calculados por nove e quatro programas, respectivamente. Como cada programa não calcula o desvio, então é mostrado o desvio relativo dos valores calculados pelos programas e não do valor de log P (ou log S). A tendência em log P para cada programa é a mesma (resultado não mostrado) e então o valor médio de log P pode ser considerado uma tendência representativa da lipofilicidade. Portanto, pode ser observado que a lipofilicidade segue a seqüência: Hex-m-triHPP > Hex-m-bisHPP > m-THPP. O pKa (constante de equilíbrio de acidez) mostrou que seus valores para as 3 porfirinas são iguais, de modo que não há diferença entre a acidez destas. O volume calculado mostrou que o volume de hex-m-bisHPP é menor do que o volume das outras porfirinas e isto é esperado devido à ausência de uma fenila nesta molécula em comparação com Hex-m-triHPP; o volume das

duas outras porfirinas são muito próximos entre si porque a diferença entre elas é a presença de uma hexila ou ausência de uma fenila.

4.3. Planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} aplicado à preparação das nanopartículas de PLGA

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística útil, onde é possível a observação dos efeitos de variáveis e interações entre elas, realizando-se uma menor quantidade de experimentos e obtendo-se informações mais conclusivas sobre os dados obtidos ¹¹⁵.

No planejamento fatorial fracionário 2^{3-1} , foram estudados a velocidade de agitação, o número de lavagens e a massa de porfirina utilizada, de modo a se definir quais as melhores condições para a redução do tamanho da nanoesferas (tabela 8).

As esferas obtidas não se encontraram, de modo geral, na faixa de tamanho desejado (em torno de 200 nm), como pode ser observado pela média de tamanho das nanoesferas obtidos pelo programa ImageTool (tabela 9) a partir das micrografias (figuras 16 a 18).

Tabela 8: Fatores utilizados em cada ensaio no planejamento fatorial 2^{3-1}

Ensaio:	Fatores		
	Velocidade agitação (RPM)	Etapas de lavagem	Massa porfirina (mg)/50 mg PLGA
1	18000	3	3
2	22000	3	0,3
3	18000	6	0,3
4	22000	6	3

Tabela 9: Tamanho das esferas obtidos pelas micrografias através do software ImageTool

ensaio	Hex-m-bisHPP (nm)	Hex-m-triHPP (nm)	m-THPP (nm)
1	563 $\pm$ 308	141 $\pm$ 45	1140 $\pm$ 790
2	463 $\pm$ 278	230 $\pm$ 111	849 $\pm$ 4
3	299 $\pm$ 279	205 $\pm$ 139	185 $\pm$ 138
4	730 $\pm$ 141	1860 $\pm$ 171	215 $\pm$ 107

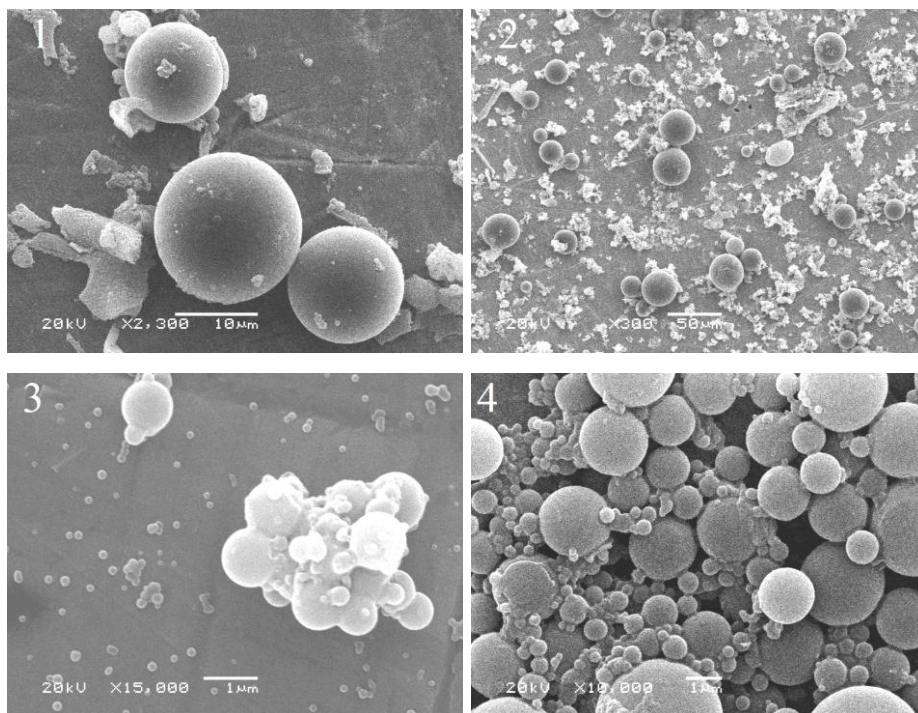
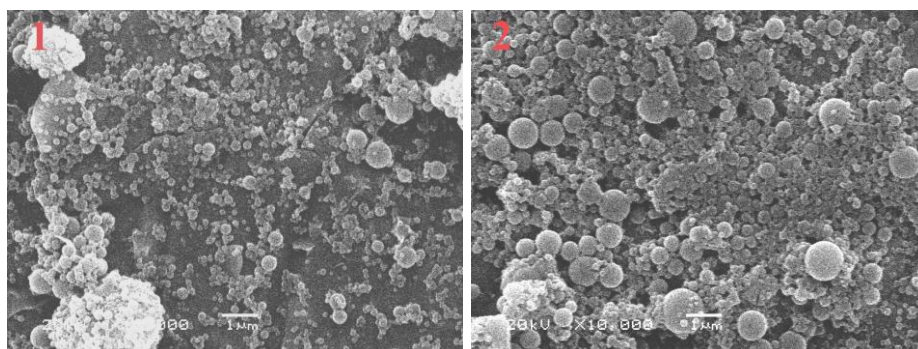


Figura 16: Microscopias de varredura dos ensaios 1 a 4 da 5-hexil-10,20-bi(3-hidroxifenil)porfirina (Hex-m-bisHPP). As escalas não são iguais em todas as figuras.



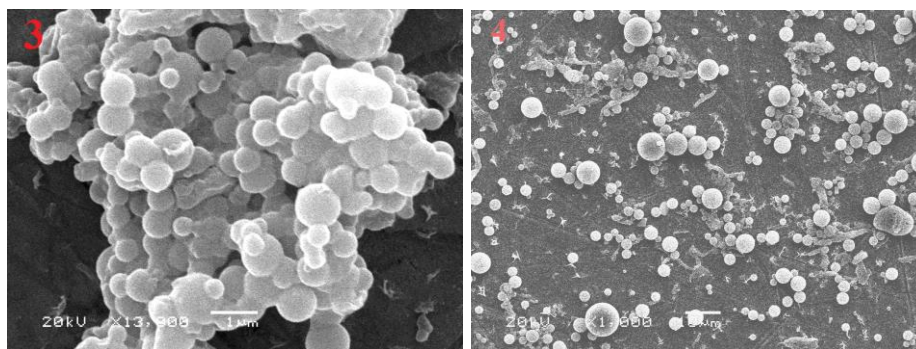


Figura 17: Microscopias de varredura dos ensaios 1 a 4 da 5-hexil-10,15,20-tri(3-hidroxifenil)porfirina (Hex-m-triHPP). As escalas não são iguais em todas as figuras.

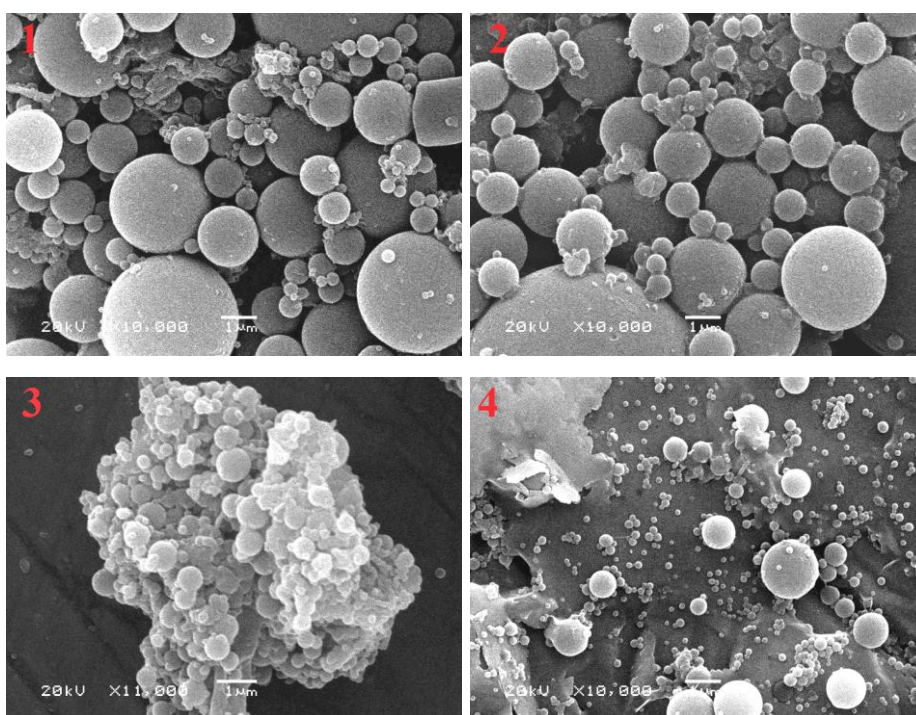


Figura 18: Microscopias de varredura dos ensaios 1 a 4 da 5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenil)porfirina (m-THPP). As escalas não são iguais em todas as figuras.

Pode ser observado pela tabela 8 que os desvios do tamanho são altos, devido à distribuição de tamanho ser bastante variada.

Quanto maior a velocidade de agitação, maior será a dispersão da fase orgânica e menor o tamanho das gotículas e esperam-se esferas com diâmetros menores após a evaporação do solvente ¹¹⁴. Isto é o resultado que se observa com as porfirinas Hex-m-bisHPP e m-THPP para três etapas de lavagem (ensaios 1 e 2). Porém, isto não é observado nos ensaios 3 e 4. Provavelmente, isto pode ser devido ao efeito do aumento da temperatura, observada a 22.000 rpm, no tamanho das esferas há um aumento de temperatura que ocorre em solução a 22.000 rpm. Observa-se também que há uma tendência no aumento do tamanho em função do aumento do número de lavagens. Provavelmente as esferas de menor diâmetro devem ter sido descartadas. Com relação à massa de porfirina, observa-se uma tendência geral de diminuição das esferas quando a proporção entre a massa do PLGA e a massa de porfirina é 0,6. A partir dos resultados acima, concluiu-se que a melhor preparação é feita em 18000 rpm, com 3 lavagens e uma massa menor do que 3 mg de porfirina, conforme se observa na tabela 9.

4.4 Planejamento fatorial fracionário 2^2 aplicado ao preparo das nanopartículas de PLGA

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial 2^{3-1} , realizou-se um segundo planejamento fatorial. Utilizou-se o clorofórmio como solvente orgânico, mantendo-se constante o etanol (5 %) na fase orgânica e variando-se a porcentagem de etanol na fase aquosa (15 e 30 %), agitando-se por 18000 rpm e lavando-se 3 vezes. A presença de 5 % de etanol na fase orgânica favorece a diminuição do tamanho das partículas ¹²⁰. Variou-se a massa entre 0,5 mg e 1 mg de porfirina, já que na preparação 2^{3-1} foi observado efeito de

massa no tamanho das partículas. A partir dos resultados deste planejamento, foi então escolhida a melhor preparação para se realizar o ensaio de porcentagem de encapsulação de porfirina, e os posteriores ensaios com as células. Essa escolha foi baseada nas características de tamanho de partícula e potencial zeta.

4.4.1. Tamanho das partículas e potencial Zeta obtidos no planejamento fatorial 2^2

Através de experimento de espalhamento de luz dinâmico, realizado em duplicata (média de 10 leituras para cada replicata), realizada no aparelho Zetasizer, foram obtidos os valores de tamanho de esferas (tabela 10).

Tabela 10: Tamanho das esferas para as diferentes preparações utilizando o equipamento Zetasizer

	[porfirina]			Diâmetro / (nm)	Polidispersi- vidade	Potencial Zeta / mV
	ensaio	/ mg	% álcool			
Hex-m-bisHPP	1	0,5	15	235 ± 6	0,529	-22 ± 1
	2	0,5	30	147 ± 20	0,220	-16,9 ± 0,7
	3	1	15	222 ± 24	0,216	-21,6 ± 0,4
	4	1	30	148 ± 11	0,500	-16,8 ± 0,5
Hex-m-triHPP	1	0,5	15	216 ± 27	0,437	-20,7 ± 0,3
	2	0,5	30	219 ± 43	0,304	-17 ± 2
	3	1	15	233 ± 9	0,132	-19,3 ± 0,6
	4	1	30	167 ± 42	0,750	-18,7 ± 0,1
m-THPP	1	0,5	15	345 ± 22	0,825	-29 ± 2
	2	0,5	30	249 ± 15	0,525	-23 ± 1
	3	1	15	222 ± 7	0,174	-19,3 ± 0,3
	4	1	30	202 ± 23	0,348	-20 ± 2

Conforme pode ser observado a % de etanol na fase aquosa causa uma diminuição do tamanho das esferas. O tamanho das partículas é dependente da tensão interfacial e da viscosidade do solvente ¹¹². Na presença de PLA foi observado que a viscosidade da fase aquosa na presença de etanol foi 43-45% maior do que na ausência de etanol ¹¹¹. Portanto, muito provavelmente, este aumento na viscosidade da solução aquosa diminuiu a coalescência das esferas durante o preparo da emulsão, evitando a agregação das mesmas e favorecendo a obtenção de partículas de menor diâmetro. Pode ser observado pela tabela 9 que as massas utilizadas não tiveram efeito sobre o tamanho das nanoesferas.

Pode-se confirmar o efeito do álcool no tamanho de esferas através dos cálculos obtidos pelo software Chemomatrix para o planejamento fatorial 2^2 (tabela 11).

Tabela 11: Efeito da % álcool na fase aquosa no tamanho de esferas através dos cálculos obtidos pelo software Chemomatrix para o planejamento fatorial 2^2

Porfirina	Efeito da % etanol
Hex-m-bisHPP	-81.00
Hex-m-triHPP	-31.50
m-THPP	-116.50

Os valores negativos obtidos através do software Chemomatrix confirmam que quanto maior a porcentagem de etanol, menor o tamanho da esfera.

As forças de interação eletrostáticas repulsivas entre as superfícies das partículas ou dos colóides de uma forma geral contribuem para que não haja agregação e portanto para a estabilidade de uma suspensão. Em geral, materiais microscópicos ou partículas adquirem uma carga elétrica superficial quando em contato com líquidos. A origem desta carga superficial pode ser devido à dissociação de grupos iônicos de moléculas na superfície ou por adsorção de íons superfície. Esta carga superficial atrai íons de carga oposta (contra-íons) presentes no líquido, formando uma camada elétrica denominada de Stern. Estes contra-íons por sua vez atraem íons de carga oposta, que no entanto são repelidos pelos íons mais próximos à carga superficial. O resultado final é uma camada difusa de contra-íons cuja concentração vai diminuindo quanto maior for a distância da carga superficial das partículas. No entanto, os íons de carga de mesmo sinal (co-íons) que os da carga superficial são repelidos pela superfície e então na camada difusa há uma pequena concentração de co-íons bem próxima da partícula carregada. A concentração dos co-íons tende a aumentar com distância da partícula carregada, devido à diminuição do efeito repulsivo. Há então a formação de uma dupla camada elétrica, constituído por uma interna onde os íons são fortemente ligados à superfície e uma região externa onde o equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico irá determinar a distribuição dos íons. Se um campo elétrico for aplicado a uma suspensão, as partículas e os íons da camada interna se movem como um todo único e o potencial elétrico criado entre os contra-íons e co-íons pode ser medido na superfície de cisalhamento (superfície imaginária constituída pelos contra-íons ligados à

superfície da partícula, bem como por algumas moléculas do solvente também ligadas à superfície). Este potencial elétrico é chamado de potencial zeta e pode ser utilizado para prever estabilidade de uma suspensão ¹¹⁸ (figura 19).

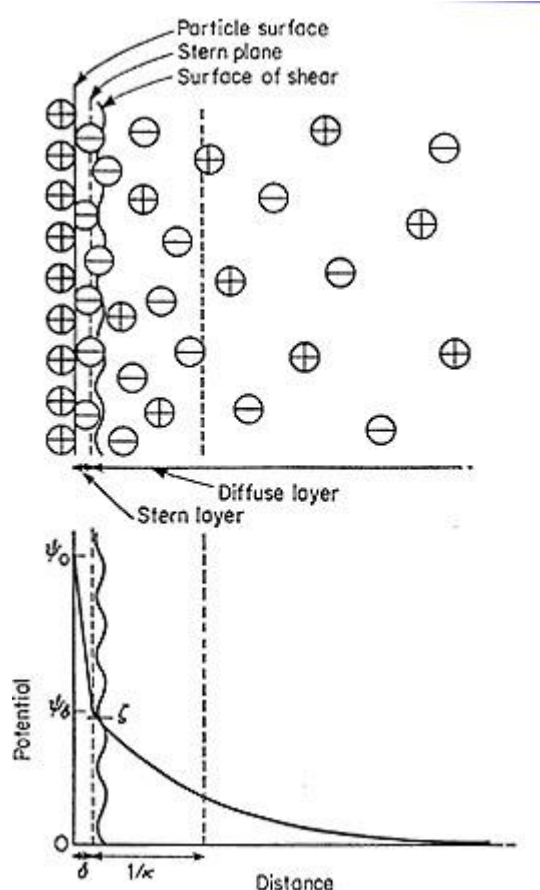


Figura 19: Potencial zeta de uma partícula.

Pela tabela 10 observa-se que todos os potenciais zeta são negativos, devido à dissociação parcial dos grupos carboxílicos localizados nas extremidades do PLGA ¹²⁷. Observa-se também que há uma tendência geral, para cada porfirina, do potencial zeta ser menos negativo conforme se diminui o tamanho da esfera. Isto ocorre porque as menores esferas têm maiores áreas específicas. Isto favorece a acumulação de uma quantidade maior de moléculas de PVA na interface entre a face orgânica e aquosa resultando em

um aumento do PVA residual na superfície das esferas com menores tamanhos ¹²⁵, e quanto maior for à quantidade de PVA residual menos negativo será o potencial zeta ¹²⁶. O valor da carga negativa depende do método de preparação, da quantidade de PVA, do tamanho da partícula, do solvente orgânico usado na preparação ¹²⁶⁻¹²⁸. A tabela 12 mostra os valores obtidos pelo software Chemomatrix para o efeito da massa e da percentagem de etanol no potencial zeta.

Tabela 12: Influência dos fatores estudados no planejamento fatorial 2² no potencial zeta

Porfirina	Efeito da % etanol	Efeito da massa da porfirina	AB
Hex-m-bisHPP	5.80	0.20	-0.20
Hex-m-triHPP	2.00	0.00	-1.00
m-THPP	5.50	0.50	-0.50

Comparando-se o efeito da % etanol com o efeito da massa da porfirina observa-se que o aumento da % de etanol na fase aquosa para as porfirinas Hex-m-bisHPP e Hex-m-triHPP é o fator que mais influencia para a redução do valor do potencial zeta, enquanto a massa de porfirina é o fator que mais influencia na redução do potencial zeta para m-THPP. Além disso, foi possível observar que a interação entre os fatores causa uma diminuição no valor do potencial zeta.

Pela tabela 10 nota-se que em geral as partículas são menores quando se usou 30 % de etanol na fase aquosa. No entanto, o tamanho das nanoesferas

são iguais e o potencial zeta são mais próximos quando se utilizou 15 % de etanol na fase aquosa e 1,0 mg de massa da porfirina (valores destacados em cinza na tabela). Estes resultados correspondem ao ensaio 3 do planejamento 2². As preparações do ensaio 3 foram utilizada nos experimentos *in vitro* com células, e o tamanho médio pela tabela 9 está próximo a 200 nm.

Resumindo os resultados até o momento, as três porfirinas utilizadas nos experimentos de viabilidade celular têm o mesmo rendimento quântico de oxigênio singleto, apresentam diferentes anfifilicidades, as nanopartículas que encapsulam as três porfirinas têm o mesmo tamanho e o mesmo potencial zeta.

Na figura 20 é mostrado algumas micrografias eletrônicas de varredura e de transmissão, respectivamente, obtidas no planejamento 2². Pode ser observado através do MEV que as partículas são esféricas e com uma pequena distribuição de tamanho.

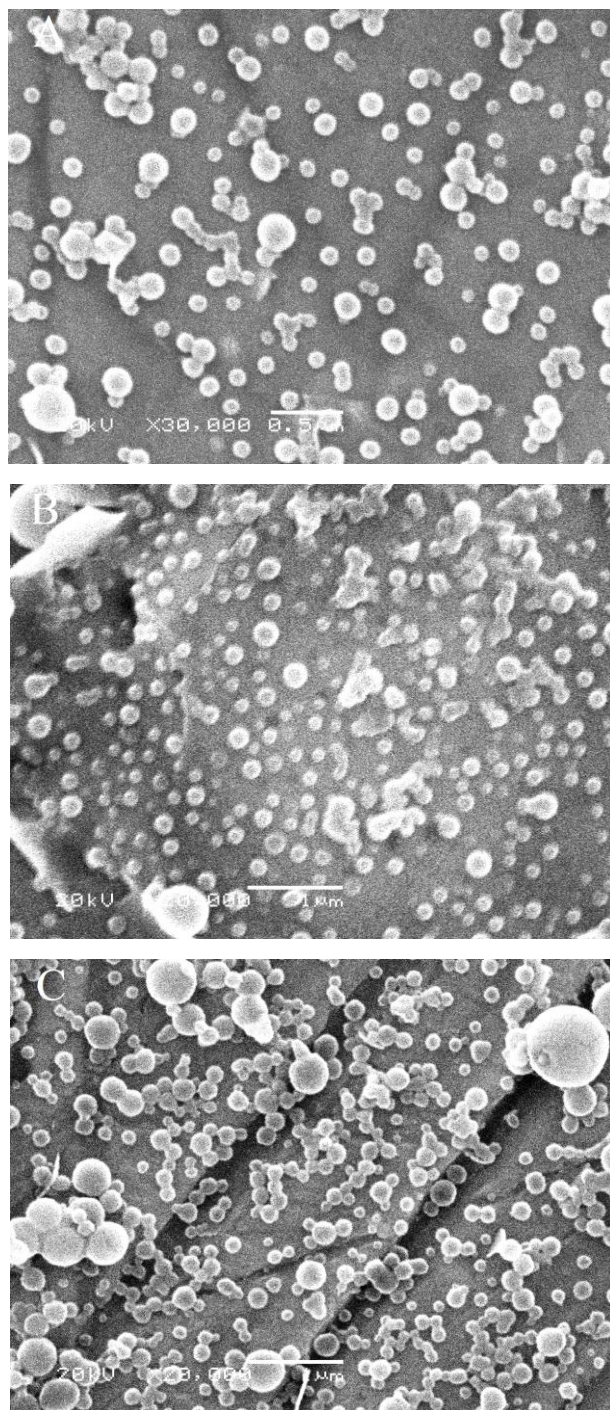


Figura 20: Micrografia eletrônica de varredura de nanoesferas de PLGA preparadas com 0,5 mg porfirina e 30 % etanol. (A) m-THPP, (B) hex-m-bis-HPP, (c) hex-m-tris-HPP.

4.5. Porcentagem de encapsulação das porfirinas nas nanoesferas preparadas a partir de 15 % de etanol na fase aquosa e 1 mg de porfirina

Através de curvas analíticas construídas por adição de padrão (figura 21), foi possível obter as concentrações das porfirinas encapsuladas nas partículas liofilizadas sem a presença de trealose, e através das equações 1, 2, 3 e 4 (3.7.), se calculou a porcentagem de encapsulação (tabela 13):

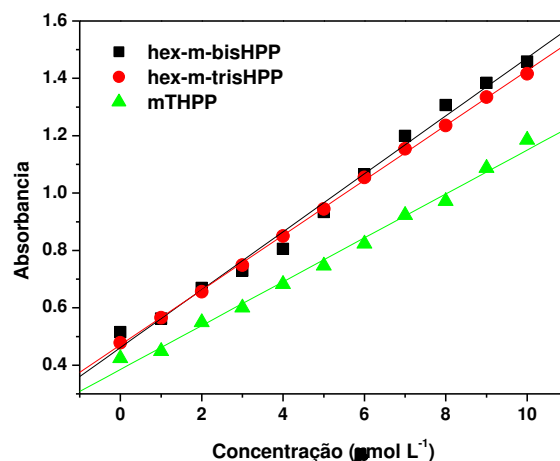


Figura 21: Curvas analíticas construídas para as porfirinas m-THPP, Hex-m-bisHPP e Hex-m-trisHPP. As concentrações das porfirinas variaram entre 0,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Tabela 13: Porcentagem de encapsulação e de recuperação das porfirinas m-THPP, Hex-m-bisHPP e Hex-m-triHPP. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Porfirinas	Encapsulação		Recuperação
	%	mg porfirina/mg esferas	%
m-THPP	93 ± 2	54 ± 1	15,8
Hex-m-bisHPP	97 ± 2	62 ± 1	22,6
Hex-m-triHPP	69 ± 1	61 ± 1	13,6

Como se pode observar, todas as porfirinas foram recuperadas em uma taxa acima de 50%, sendo que a m-THPP foi a porfirina com menor porcentagem recuperação, e o Hex-m-bisHPP e o m-THPP tiveram porcentagens de recuperação praticamente iguais.

Pode ser observado também que todas as porfirinas foram encapsuladas com concentrações médias maiores do que 50%, sendo que a Hex-m-triHPP foi a porfirina com menor porcentagem média de encapsulação, e o Hex-m-bisHPP e o m-THPP tiveram porcentagem de encapsulação praticamente iguais.

O sucesso na encapsulação de substâncias em nanoesferas depende de vários fatores: a) baixa solubilidade da substância a ser encapsulada na fase aquosa, b) uma alta taxa de precipitação/solidificação do polímero na fase orgânica que por sua vez é dependente de sua alta solubilidade na fase aquosa, c) da alta pressão de vapor do solvente, d) da alta solubilidade da droga no polímero ¹¹⁷. Todos estes fatores foram atendidos na formulação das nanoesferas, resultando em uma elevada porcentagem de encapsulação.

4.6. Liberação das porfirinas encapsuladas sem a separação das partículas do meio de liberação

A liberação de drogas encapsuladas sem a separação das partículas do meio de liberação foi desenvolvida na tese de doutorado de André Romero da Silva ¹¹² e os resultados da liberação de cloro(5,10,15,20-tetrafenilporfirinato) de índio(III) encapsulado em microesferas e nanoesferas de PLGA sem a necessidade de separar as esferas do meio de liberação usando espectroscopia de refletância difusa foram publicados em 2010 ¹¹⁷. Para se obter o perfil de liberação das porfirinas sem a separação das partículas do meio de liberação realizou-se preliminarmente uma análise da solubilidade das mesmas em solução aquosa contendo tampão PBS pH 7,4 e Tween 20 (figura 22), e também em solução aquosa contendo água, etanol e soro fetal bovino (figura 23).

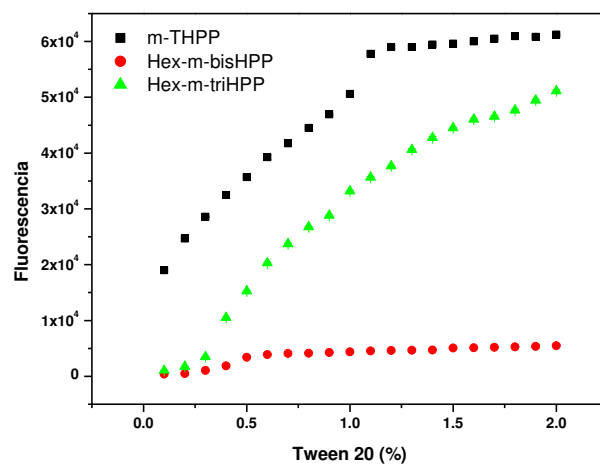


Figura 22: Solubilidade das porfirinas em diferentes concentrações de Tween 20.

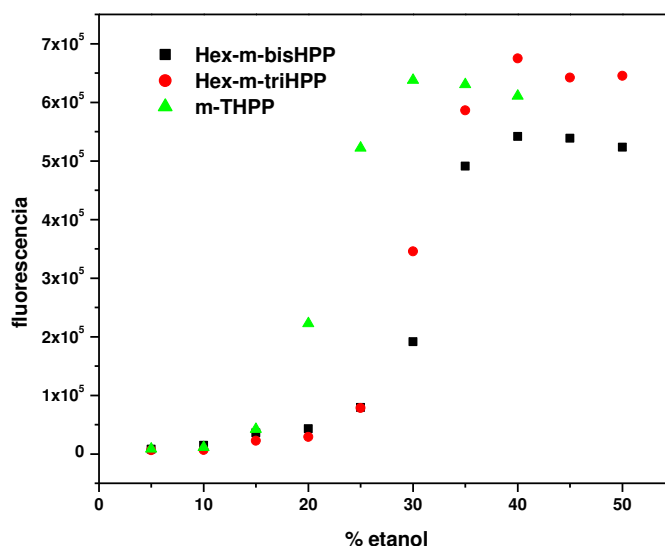


Figura 23: Solubilidade das porfirinas em diferentes concentrações de etanol em solução aquosa.

Pela figura 22 observa-se que a fluorescência da porfirina m-THPP ficou constante após a adição de 1 % de Tween 20 na água. Isto indica que acima de 1 % a porfirina m-THPP está totalmente solubilizada nesta solução. No entanto, a fluorescência de hex-m-triHPP não ficou constante e a fluorescência de hex-m-bisHPP é muito pequena. Estes dois resultados indicam que a solução aquosa contendo tampão PBS pH 7,4 e Tween 20 não é adequada para se analisar o perfil de liberação das porfirinas estudadas. Pela figura 23, é observado que as três porfirinas são solúveis na solução aquosa contendo 40 % de etanol e soro fetal bovino. O estudo da liberação das porfirinas foi feito neste meio alcoólico, utilizando o acessório de espectroscopia de refletância difusa (ERD) que permite a eliminação da influência da luz espalhada pelas partículas no espectro de absorção da porfirina, não precisando separar as partículas do meio de liberação. No entanto, era necessário agitar a solução na cubeta de quartzo pois os valores da

absorbância da solução em repouso eram diferentes dos valores da absorbância sob agitação. Isto se tornou um inconveniente experimental porque os experimentos de liberação devem ser conduzidos por muitas horas.

Realizaram-se então os experimentos de liberação em isobutanol porque este solvente solubiliza as porfirinas mas não solubiliza o PLGA. A partir da curva analítica previamente construída e do conhecimento de massa inicial de porfirina encapsulada, foram obtidos os perfis da liberação das porfirinas encapsuladas em PLGA (figura 24).

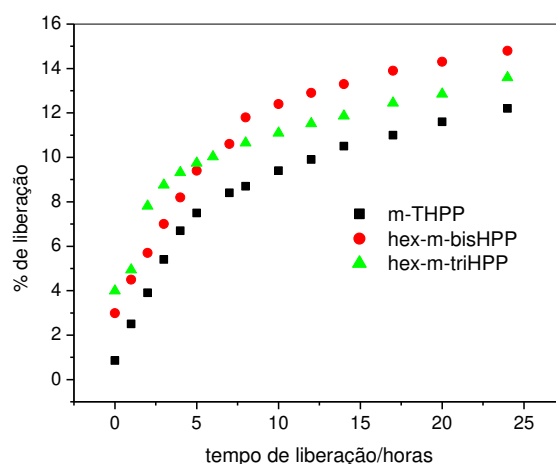


Figura 24: Perfil de liberação em isobutanol das porfirinas encapsuladas em PLGA.

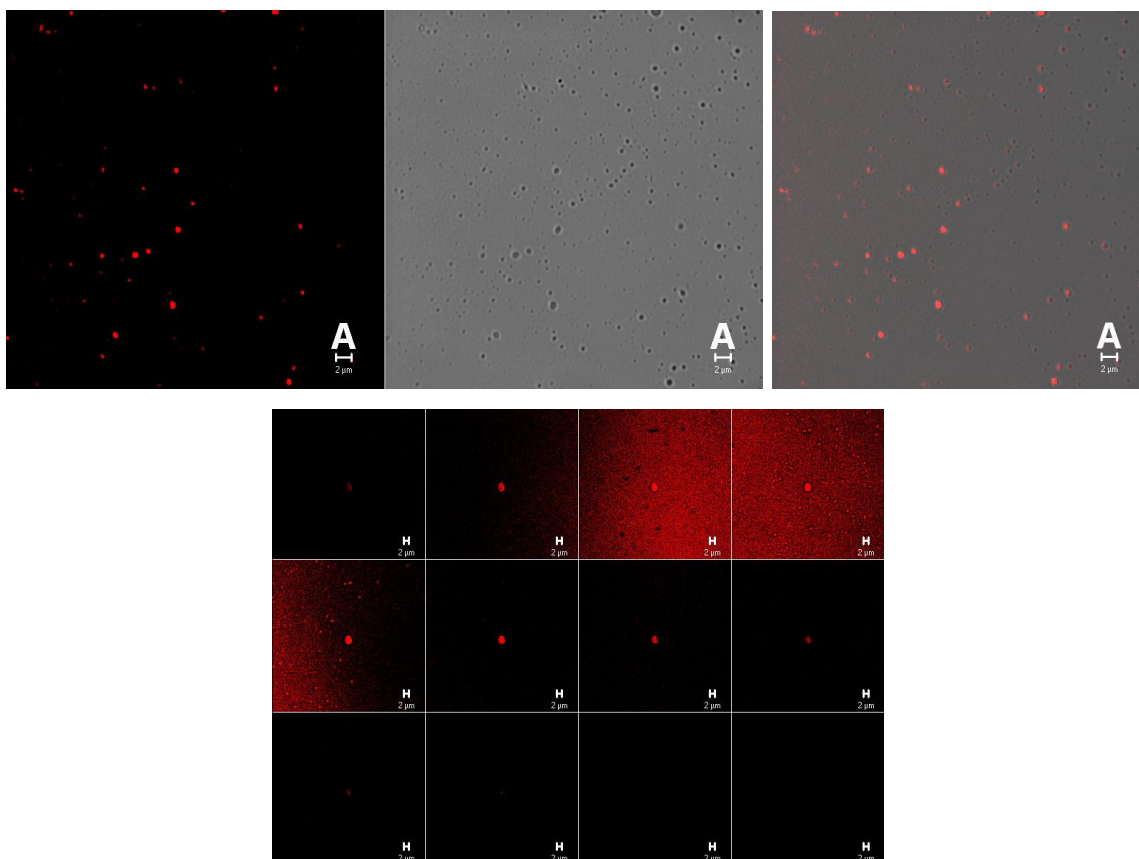
O perfil de liberação da figura 24 indica que há uma fase inicial rápida (< 5 horas) e uma fase lenta (> 5 horas). Este perfil é consistente com os resultados observados na literatura para as primeiras horas iniciais. Os modelos apresentados na literatura indicam a existência duas fases¹³⁰ ou de três fases¹³¹ associadas com a liberação das drogas *in vitro*. Os dois modelos são muito próximos e em ambos modelos a primeira fase é rápida e está

relacionada com dissolução da droga na superfície das partículas seguido por um processo controlado por difusão da droga para o meio líquido. No modelo com duas fases, a segunda fase é lenta e está relacionada com a liberação da droga internalizada dentro da partícula e é dependente da erosão da partícula causado pela degradação do polímero. A erosão tem sido observada principalmente em meio aquoso. No modelo com três fases, observada em PLGA, a segunda fase ocorre devido à dissolução da droga causado por um processo de degradação e induzido por relaxação e a terceira fase é a liberação difusional. As imagens das micrografias eletrônicas de varredura de cloro(5,10,15,20-tetrafenilporfirinato) de índio(III) encapsulada em micropartículas de PLGA, antes e após 1384 horas dispersas em isobutanol a 27 °C, mostraram que a superfície das micropartículas não foram degradadas por ação do isobutanol ¹²⁹. Portanto, os resultados da figura 20 indicam que a primeira fase rápida se dá entre 0 e 5 horas e se deve principalmente a difusão da droga presente na superfície das nanoesferas ^{132, 133, 134}, e a segunda fase é devido a liberação das porfirinas internalizadas dentro das nanoesferas mas sem ocorrer a erosão das mesmas.

4.7. Distribuição qualitativa das porfirinas nas esferas de PLGA utilizando a microscopia eletrônica de varredura a laser confocal

Após o conhecimento do perfil de liberação das porfirinas encapsuladas no PLGA, foi necessário analisar a distribuição qualitativa das mesmas nas esferas. Para isto utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura a laser confocal. No entanto esta técnica não permite visualizar nanoesferas. Então as

imagens mostradas na figura 25 referem-se às partículas de maior diâmetro. As imagens mostram que as porfirinas estão distribuídas homogeneamente dentro das esferas por que a emissão de fluorescência dos cortes gradualmente aumenta e depois diminui, indicando que as porfirinas não estão distribuídas preferencialmente em regiões superficiais ou no interior das esferas. As imagens dos cortes também indicam que não ocorreu a formação de cristais de porfirinas dentro das esferas.



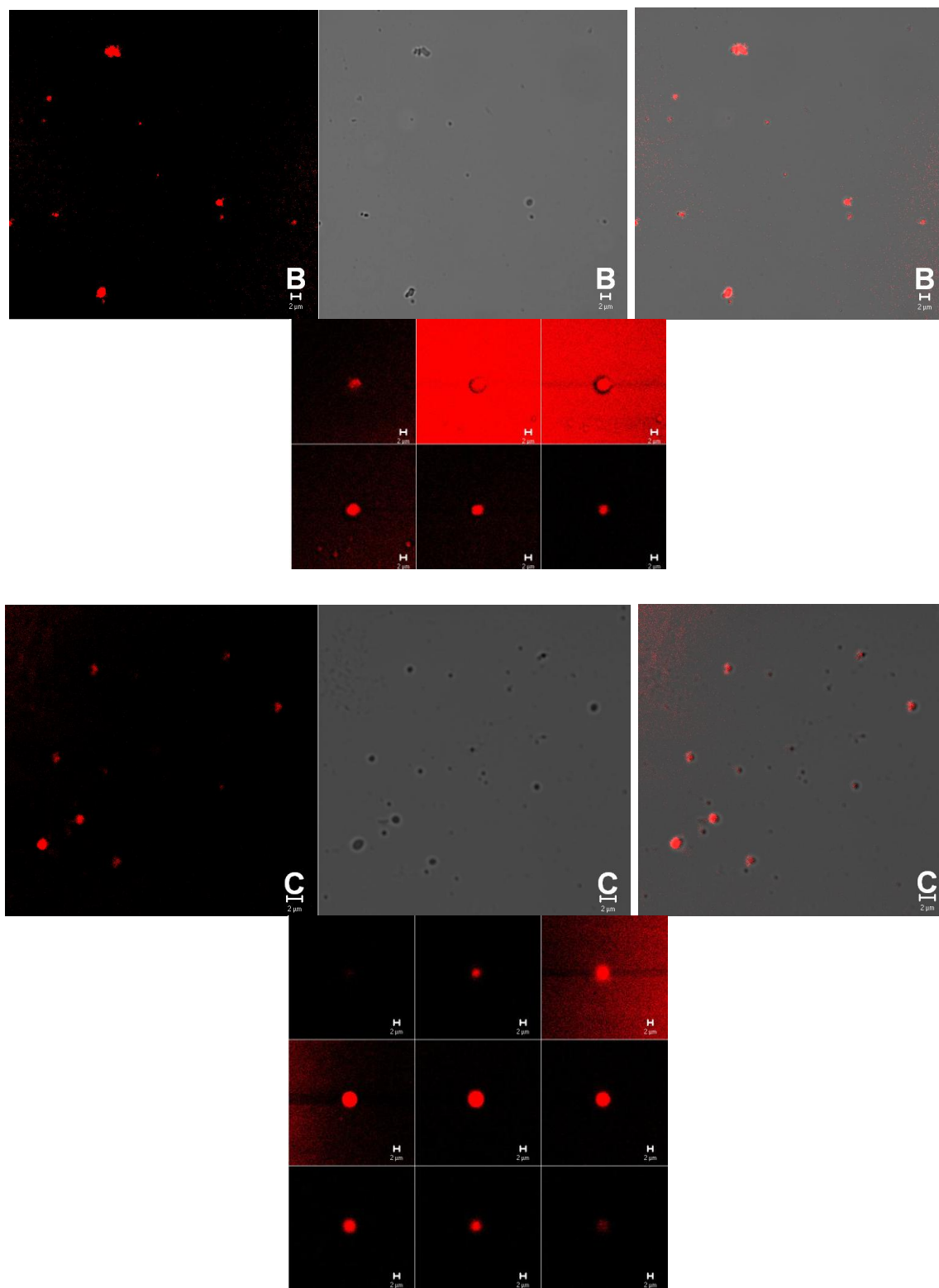


Figura 25: Imagens de microscopia confocal das porfirinas encapsuladas em esferas. À esquerda é mostrada a fluorescência das porfirinas, no centro é mostrada a visualização das esferas sem a excitação das porfirinas e à direita é

mostrada a soma das duas primeiras micrografias. Embaixo das três micrografias são mostrados os cortes usando um aumento gradual na profundidade de 0,1 μm . (A) m-THPP, (B) hex-m-triHPP e (C) hex-m-bisHPP. Nas imagens dos cortes há um fundo de cor vermelha, que é um efeito do ajuste de cor do confocal.

4.8. Internalização celular das porfirinas

A internalização celular das porfirinas encapsuladas por PLGA nas células de próstata humana LNCaP foi analisada qualitativamente por microscopia confocal (figuras 26 a 29), onde ocorrem as seguintes emissões de fluorescência: da faloidina (azul nas imagens) que indica o citoesqueleto, da DAPI (verde nas imagens) que indica o núcleo e das porfirinas (vermelho). A figura 26 corresponde às células incubadas sem a presença de porfirinas (controle). As imagens à esquerda das figuras 27 a 29 mostram células com porfirinas encapsuladas. As imagens à direita das figuras 27 a 29 mostram que as porfirinas estão localizadas internamente nas células em regiões perinucleares. Em duas horas de incubação as imagens indicam que a distribuição não é homogênea, indicando que provavelmente há uma sub-localização das porfirinas. Não se observa fluorescência das porfirinas no núcleo, o que é importante porque a presença de fotossensibilizador no núcleo pode causar danos significativos no DNA e aumentar o risco de fotocarcinogenese das células sobreviventes¹²¹.

As imagens à direita mostram os cortes de uma única célula. Seções óticas transversais foram obtidas com um corte gradual de 0,48 μm a partir do topo da célula. As imagens confirmam a presença das porfirinas internalizadas nas células. Porém, as diferentes intensidades de fluorescência confirmam que as porfirinas não estão distribuídas homogeneamente nas células.

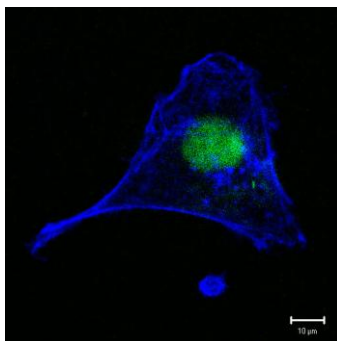


Figura 26: Células sem incubação de porfirina encapsulada em esferas.

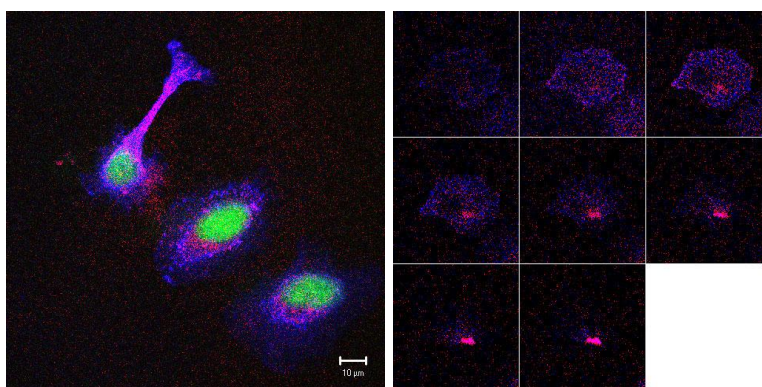


Figura 27: Células incubadas com nanoesferas contendo m-THPP e seu corte.

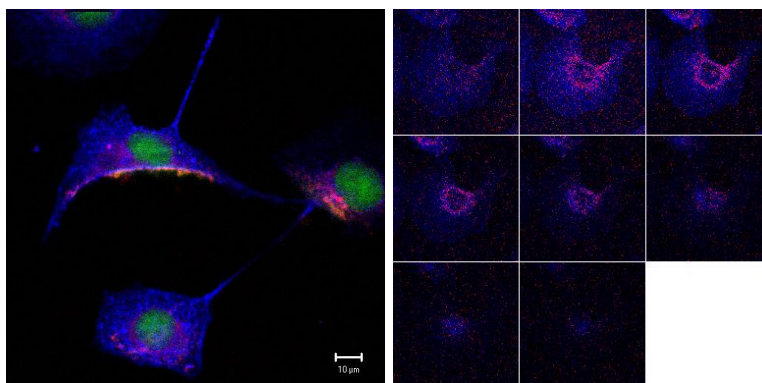


Figura 28: Células incubadas com nanoesferas contendo Hex-m-bisHPP e seu corte.

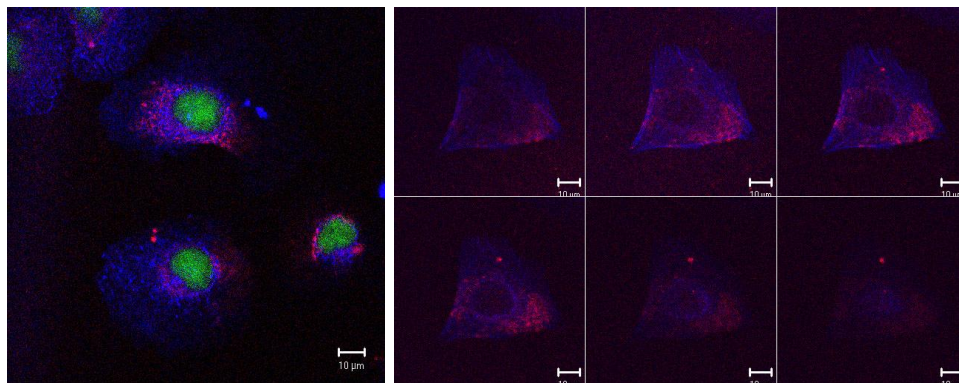


Figura 29: Células incubadas com nanoesferas contendo Hex-m-triHPP e seu corte.

4.9. Atividade fotodinâmica das porfirinas encapsuladas em PLGA

Como a porcentagem de m-THPP encapsulada nas nanoesferas foi menor, a massa pesada das nanoesferas contendo esta porfirina foi maior para que a concentração extracelular da mesma fosse sempre igual a das duas outras porfirinas.

4.9.1. Determinação da viabilidade celular por MTT

A determinação da viabilidade celular via MTT tem a vantagem sobre o método da contagem das células, porque o primeiro é um método instrumental e mais rápido. Por este método foi observada uma correlação linear entre a absorbância e o número de células por mL entre 0,1 e 4×10^5 células por mL, como pode ser observado pela figura 30.

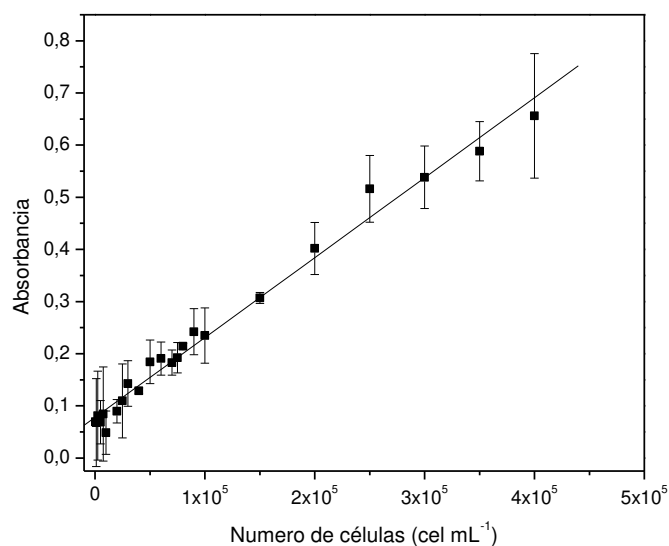


Figura 30: Curva padrão de número de células por absorbância de ensaio de MTT, com leituras no comprimento de onda de 570 nm.

4.9.2. Viabilidade celular em função do tempo de incubação das porfirinas

A figura 31 mostra os resultados do experimento da viabilidade celular das células LNCaP em função do tempo de incubação. Na legenda as condições experimentais são indicadas.

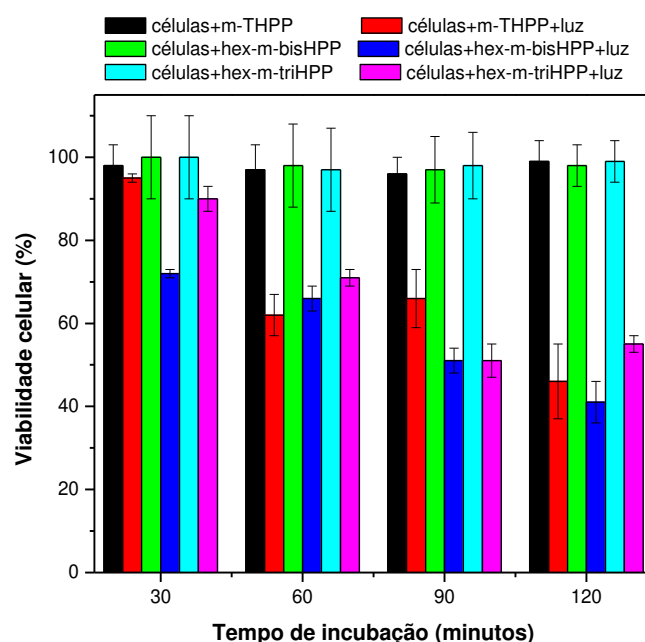


Figura 31: de viabilidade celular versus tempo de incubação para as porfirinas ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) encapsuladas em PLGA 50:50 na ausência e presença de luz (luz na legenda da figura). As células LNCaP foram irradiadas por 40 minutos, o que representou dose de luz de 66 J cm^{-2} . Cada valor é a média ($\pm$ dp) de quatro medidas. Cel representa as células.

Pela figura pode ser observado que as três porfirinas não são citotóxicas porque a % de viabilidade celular na ausência de luz foi constante e próxima de 100 % entre 30 e 120 minutos. A análise estatística aplicada para a mesma porfirina indicou que a viabilidade celular é igual com um grau de confiança de 95 % para os seguintes tempos de incubação: m-THPP nos tempos de incubação de 60 e 90 minutos; hex-m-bisHPP nos tempos 30 e 60 minutos e hex-m-triHPP nos tempo de 90 e 120 minutos. A análise estatística aplicada para as diferentes porfirinas indicou que: Para trinta minutos apenas a hex-m-

bisHPP reduziu a viabilidade celular, quando comparada com o controle sem luz. Estatisticamente não houve redução da viabilidade celular para as outras duas porfirinas em 30 minutos. Estatisticamente foi observada a equivalência para as três porfirinas no tempo de incubação de 60, 90 minutos e 120 minutos. Portanto, não houve diferença na eficácia fotodinâmica entre as três porfirinas quando o tempo de incubação variou entre 60 a 120 minutos. Os resultados também indicam que há uma tendência geral da porcentagem da viabilidade celular variar em função de tempos mais longos, pois estatisticamente os valores são diferentes entre 30 e 120 minutos, em um grau de confiança de 95 %. Estes resultados são consistentes com outros trabalhos publicados^{135, 137}.

4.9.3. Viabilidade celular em função da concentração das porfirinas

A figura 32 mostra os resultados do experimento da viabilidade celular das células LNCaP em função do tempo de incubação. Na legenda as condições experimentais são indicadas.

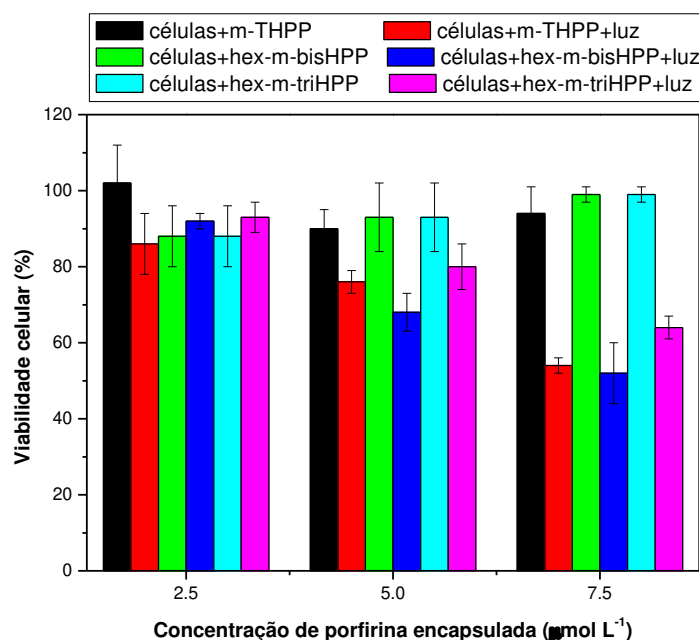


Figura 32: Porcentagem de viabilidade celular versus concentração de porfirinas encapsuladas em PLGA na ausência e presença de luz (luz na legenda da figura). As células LNCaP foram incubadas por 90 minutos com as porfirinas encapsuladas e foram irradiadas por 40 minutos, o que representou uma dose de luz de 66 J cm^{-2} . Cada barra é a média ($\pm \text{dp}$) de quatro medidas.

A análise estatística aplicada para a mesma porfirina indicou que para m-THPP a viabilidade celular é igual com um grau de confiança de 95 % para as concentrações 2,5 e 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e para as outras duas porfirinas a viabilidade celular é diferente para as três concentrações. A análise estatística aplicada para as diferentes porfirinas indicou que houve diferença na viabilidade celular em 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ entre o hex-m-tri-HPP e o m-THPP. No entanto esta diferença é insignificante. Portanto, não houve diferença na

eficácia fotodinâmica entre as três porfirinas quando a concentração variou entre 2,5 a 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para um tempo de incubação de 90 minutos. Estes resultados são consistentes com outros trabalhos publicados^{136, 137}.

4.9.4. Viabilidade celular em função da dose de luz aplicada nas células

A figura 33 mostra os resultados do experimento da viabilidade celular das células LNCaP em função da dose aplicada. Na legenda as condições experimentais são indicadas.

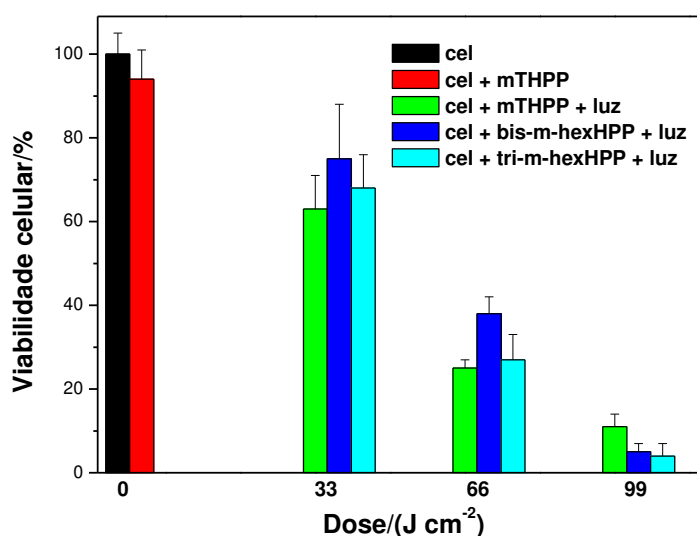


Figura 33: Porcentagem de viabilidade celular em função da dose de luz incidente sobre células LNCaP contendo porfirinas encapsuladas em PLGA. As células foram incubadas por 120 minutos e a concentração das porfirinas extracelular foi 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. As doses de 33, 66 e 99 J cm^{-2} correspondem a 20, 40, 60 minutos de aplicação de luz, respectivamente. O controle (0 J cm^{-2})

corresponde às células ou células + porfirinas encapsuladas no escuro por 120 minutos. Na figura o controle contém as células e células + m-THPP. O resultado do controle para as outras duas porfirinas foram estatisticamente equivalentes ao mostrado para o m-THPP e por isto foram omitidos. Cada valor é a média ($\pm$ dp) de quatro medidas. Cel representa células na figura.

Pode ser observado que a porcentagem de viabilidade celular para cada porfirina é dose dependente da luz incidente aplicada nas células LNCaP contendo as porfirinas internalizadas. Estatisticamente, em um grau de confiança de 95 %, não há diferença entre as porfirinas para a dose de 33 e 99 J cm^{-2} e entre hex-m-bisHPP e hex-m-triHPP para a dose de 66 J cm^{-2} . Mas a diferença entre m-THPP e hem-m-bisHPP também não é grande para esta dose. Portanto, pode ser considerado que não houve diferença na eficácia fotodinâmica entre as três porfirinas quando houve variação na dose de luz.

4.9.5. Quantificação das porfirinas internalizadas nas células LNCaP

Na tabela 14 são indicadas a porcentagem e o número de moles das porfirinas internalizadas nas células LNCaP. As células foram incubadas por 120 minutos com as porfirinas encapsuladas nas nanoesferas. A concentração inicial extracelular das porfirinas foi $7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 14: Porfirinas internalizadas nas células LnCAP

porfirina	Porcentagem (%)	mol (10^{-9})
m-THPP	41 ± 5	$1,5 \pm 0,2$
Hex-m-bisHPP	45 ± 5	$1,7 \pm 0,2$
Hex-m-triHPP	41 ± 2	$1,6 \pm 0,1$

Observa-se pela tabela 14 que as três porfirinas estão quantitativamente igualmente internalizadas nas células.

4.9.6. Análise da atividade fotodinâmica das três porfirinas

As três porfirinas têm o mesmo tamanho, o mesmo potencial zeta, o mesmo rendimento quântico de oxigênio singlete, estão internalizadas na mesma quantidade nas células LNCaP, diferem em anfifilicidade e a eficácia fotodinâmica é a mesma para as três porfirinas.

Há a igualdade na quantidade das três porfirinas internalizadas porque o potencial zeta e o tamanho das NPs de PLGA são iguais (tabela 9). A igualdade na quantidade das três porfirinas internalizadas provavelmente também é devido ao processo de internalização e entrega das porfirinas dentro das células pelas NPs de PLGA, conforme proposto por Panyam e colaboradores em seu trabalho de internalização de drogas encapsulas por PLGA ¹²⁸. A hipótese destes pesquisadores é que após a internalização intracelular por endocitose não específica, as NPs são transportadas por endossomas primários ou novos endossomas, a partir do qual eles podem ser

distribuídos para endossomas de reciclagem (que pode levar os NPs fora das células) ou para endossomas secundários. Se as NPs localizadas nos endossomas secundários forem transportadas para o compartimento endolisossomal, a entrega da droga pode ocorrer neste compartimento ácido e a droga pode ser degradada rapidamente. A hipótese é que no pH ácido do endossomas secundários a superfície de carga das NPs muda de negativa para positiva, gerando uma interação local NP-membrana levando ao escape das NPs para o citoplasma. As drogas seriam então entregues no citoplasma e não se degradariam. Há também a suposição de uma fração de NPs é também transportada para o compartimento endolisossomal. Então aplicando a hipótese destes autores para os nossos resultados, o mecanismo de liberação pela PLGA impediria a degradação das três porfirinas e consequentemente a quantidade das mesmas dentro das células seriam iguais.

A importância do tamanho também é mostrada no artigo de Vargas e colaboradores ¹²⁹. As NPs de PLGA (50:50) de menor tamanho, contendo meso-tetra(p-hidroxifenil)porfirina foram mais eficientes para danificar *in vivo* a membrana corioalantóide de embrião de galinha. O tamanho das NPs variou entre 117 a 593 nm e o tamanho é importante porque pode influenciar a distribuição e o estado de agregação do PS dentro do NP e a velocidade de liberação do PS ¹²⁹. Estes resultados são concordantes com um trabalho anterior de Vargas e colaboradores ¹³¹ que avaliaram o efeito do tamanho das NPs de PLGA (50:50) contendo meso-tetra(carboxifenil)porfirina também *in vivo* na membrana corioalantóide de embrião de galinha. O tamanho destas NPs variou entre 121 até 343 nm. Os resultados destes autores enfatizam como foi importante em nosso trabalho utilizar NPs de mesmo tamanho.

Diferença entre os nossos resultados e o de outros autores pode ser explicada pelo sistema de entrega da droga. Por exemplo, Rancan e colaboradores ⁶⁸ analisaram a influência da substituição em dihidroxiclorinas assimétricas sobre a internalização, localização subcelular e eficácia fotodinâmica em células de Jurkat. Eles usaram as seguintes clorinas (Figura 33): 2,3-dihidroxi-5,10,15,20-tetrafenilclorina (1), hexil-2,3-dihidro-2,3-dihidroxi-10,15,20-tris(3-metoxifenil)clorina (2a), 5-hexil-12,13-dihidro-12,13-dihidroxi-10,15,20-tris(3-metoxifenil)clorina (2b), 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi-5,10,15,20-tetra(3-hidroxifenilclorina) (3) e 2,3-dihidro-2,3-dihidroxi-5,10,15,20-tetra(3-metoxifenilclorina) (4). A clorina 3 é a mais anfifílica, as clorinas 1 e 4 são menos hidrofílicas e menos anfifílicas do que 3 e a clorina 2 tem maior lipofilicidade do que 4. As células de Jurkat foram incubadas por 72 h com 3,6 μ M das clorinas dissolvidas em 0,5 % de etanol ou DMSO ou em 10 % de liposoma.

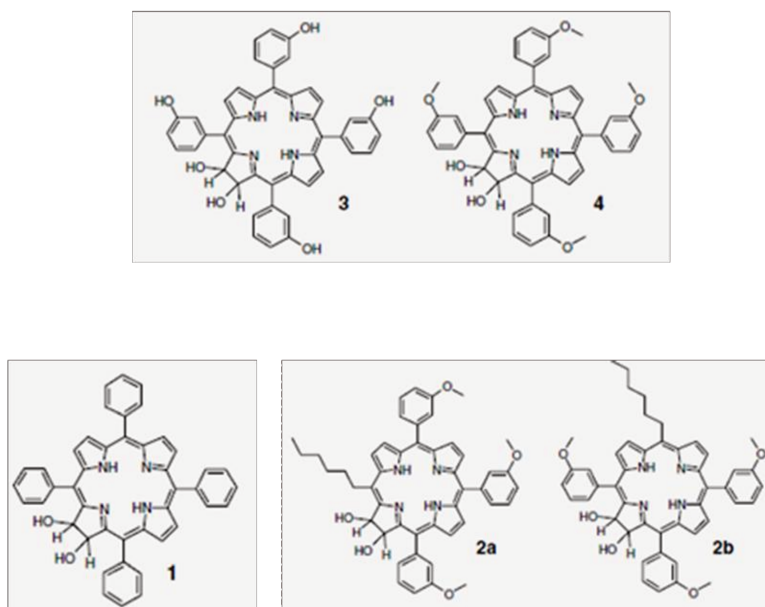


Figura 34: Estrutura das clorinas utilizadas no trabalho de Rancan e colaboradores⁶⁸

As concentrações das clorinas internalizadas nas células de Jurkat são mostradas na tabela 15:

Tabela 15: Concentração das clorinas internalizadas após incubação das células de Jurkat por 72 horas. S é o solvente (etanol ou DMSO) e L é o liposoma. A concentração intracelular foi calculada pelos autores considerando um raio médio celular de 6 μm . A morte celular foi medida 24 h após a aplicação da luz⁶⁸.

Clorina	S/(mol L ⁻¹)	% morte celular (S)	L/(mol L ⁻¹)	% morte celular (L)
3	$1,3 \times 10^{-3}$	100	$7,07 \times 10^{-5}$	88,9
1	$7,05 \times 10^{-4}$	100	$1,97 \times 10^{-4}$	99,2
4	$3,05 \times 10^{-4}$	100	$2,05 \times 10^{-4}$	100
2	$8,39 \times 10^{-5}$	47,2	$8,63 \times 10^{-5}$	64,4

A tabela 15 mostra que a quantidade da droga internalizada depende do meio utilizado para a entrega da droga. Exceto para a clorina 4, as concentrações mais altas das clorinas livres em relação às clorinas encapsuladas estão relacionadas com a sua habilidade e tendência para difundir passivamente pela membrana do plasma ⁶⁸. A clorina livre mais anfifílica (3) teve a melhor internalização. Isto é esperado porque a membrana celular é anfifílica e por este motivo as drogas anfifílicas devem passar mais facilmente pela membrana. As clorinas 1 e 4, menos anfifílicas foram internalizadas em menor concentração. A clorina 2 pode ter sofrido agregação no solvente orgânico o que explicaria a sua menor internalização ⁶⁸. Exceto para a porfirina 2, em geral observa-se que as clorinas entregues via lipossoma foram internalizados em menor concentração. Isto ocorre porque os compostos entregues por lipossomas incluem processos tais como adsorção e endocitose, os quais levam a baixas concentrações intracelulares relativas às doses lipossomais aplicadas ¹³⁸. Em nosso trabalho a internalização não dependeu da anfifilicidade porque as porfirinas foram encapsuladas em NPs de PLGA de mesmo tamanho e de mesmo potencial zeta. A atividade fotodinâmica das clorinas do trabalho de Rancam e colaboradores ⁶⁸ não pode ser comparada entre si e com os nossos resultados porque as concentrações das clorinas dentro das células são diferentes e porque as percentagens de morte celular são 100 %, exceto para a clorina 2.

Os nossos resultados mostraram que porfirinas com estruturas semelhantes e diferentes anfifilicidades, internalizadas nas células na mesma concentração e com mesmo rendimento quântico de oxigênio singleto, têm *in vitro* a mesma eficácia fotodinâmica. Este resultado é novo e não foi publicado na literatura até o momento da defesa desta dissertação de mestrado.

5. Conclusões

Foi possível encapsular as três porfirinas em NPs de PLGA (50:50) com o mesmo tamanho e mesmo potencial zeta. As porcentagens de encapsulação e recuperação estão acima de 50 %, indicando que a encapsulação foi eficaz. Como o tamanho e o potencial zeta foram os mesmos, as NPs entraram nas células nas mesmas concentrações. Como a entrada na célula depende da anfifilicidade, esta dependência foi suprimida com a encapsulação. Então foi possível internalizar as três porfirinas nas mesmas concentrações e desta forma pode-se analisar exclusivamente o efeito da anfifilicidade na fototoxicidade. O resultado obtido foi importante porque mostrou que uma vez dentro das células em mesmas concentrações, não há diferença na fototoxicidade devido à anfifilicidade. Os resultados também mostraram que há uma dose-dependência do tempo de incubação, da concentração e dose de luz na fototoxicidade. A coerência dos resultados também mostrou que nas mesmas condições de tempo de incubação, concentração e dose de luz, a fototoxicidade das três porfirinas foi igual. Os resultados indicaram que as três porfirinas estão distribuídas homogeneamente nas NPs, tanto na superfície quanto dentro das esferas. Finalmente, as três porfirinas estão localizadas no citosol e na região perinuclear.

6. Referencias bibliográficas

- 1 Bonnet, R.; Photosensitizers of the porphyrin and phtalocyanine series for photodynamic therapy; *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 19-33
- 2 Nyman, E.S.; Hynninen, P.H.; Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy; *J. Photochem. Photobiol. B.* **2004**, 73, 1-28

- 3 Huang, Z.; Xu, H.; Meyers, A.D.; Musani, A.I.; Wang, L.; Tagg, R.; Barqawi, A.B.; Chen, Y.K.; Photodynamic therapy for treatment of solid tumors-potential and technical challenges; *Technol. Cancer Res. Treat.* **2008**, 7, 309-320
- 4 Wilson, B.C.; Patterson, M.S.; The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy; *Phys. Med. Biol.* **2008**, 53, R61-R109
- 5 Engelhardt, V.; Krammer, B.; Plaetzer, K.; Antibacterial photodynamic therapy using water-soluble formulations of hypericin or mTHPC is effective in inactivation of *Staphylococcus aureus*; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, 9, 365-369
- 6 Dai, T.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M.R.; Photodynamic therapy for localized infections – State of the art; *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2009**, 6, 170-188
- 7 Mima, E.G.D.; Pavarina, A.C.; Dovigo, L.N., Vergani, C.E.; Costa, C.A.S.; Kurachi, C.; Bagnato, V.S.; Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis; *Or. Surg. Med. Or. Path. Or. Rad. Endod.* **2010**, 109, 392-401
- 8 Alam, M.; Rommel, J.; Fife, D.; Kim, N.; Keyes, A.; Yoo, S.; Khan, M.; Rademaker, A.; A randomized controlled paired comparison of Photodynamic therapy with topical tazarotene 0,1% cream pretreatment versus PDT along for actinic keratoses on areas other than the face and scalp; *Las. Surg. Med.* **2010**, 22, 36-36
- 9 Chan, W.M.; Lim, T.H.; Pece, A.; Silva, R.; Yoshimura, N.; Verteporfin PDT for non-standard indications — a review of current literature; *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **2010**, 248, 613-626.
- 10 Esser, P.; Pohlmann, B.; Scharfet, H.D.; Die photochemische synthese von feinchemikalien mit sonnenlicht; *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2093-2108
- 11 Triesscheijn, M.; Baas, P.; Schellens, J.H.M.; Stewart, F.A.; Photodynamic therapy in oncology; *The Oncol.* **2006**, 11, 1034-1044
- 12 Allison, R.R.; Sibata, C.H.; Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A Clinical review; *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, 7, 61-75
- 13 <http://www.clinicaltrials.gov/> acessado em abril de **2010**.
- 14 Ibbotson, C.H.; An overview of topical photodynamic therapy in dermatology; *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, 7, 16-23
- 15 Chorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis; Editorial da revista *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2009**, 6, 94-96.
- 16 <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/photodynamic>, acessado em abril de **2010**.

- 17 Chatterjee, D.K.; Fong, L.S.; Zhang, Y.; Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm; *Adv. Drug Del. Rev.* **2008**, 60, 1627-1637
- 18 Duan, W.; Lo, P.W.; Duan, D.; Fong, W.P., Dennis; K.P., Preparation and *in vitro* photodynamic activity of amphiphilic zinc(II) phthalocyanines substituted with 2-(dimethylamino)ethylthio moieties and their N-alkylated derivatives; *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 2672-2677
- 19 Oliveira, K.T.; Assis, F.F; Ribeiro, A.O.; Neri, C.R.; Fernandes, A.U.; Baptista, M.S.; Lopes, N.P.; Serra, O.A.; Iamamoto, Y; Synthesis of phthalocyanines-ALA conjugates: Water-soluble compounds with low aggregation; *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 7962-7965
- 20 Hopper, C.; Niziol, C.; Sidhu, M.; The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK; *Oral Oncol.* **2004**, 40, 372-382
- 21 Hur, C.; Nishioka, N.S.; Gazelle, G.S.; Cost-effectiveness of photodynamic therapy for treatment of Barrett's esophagus with high grade dysplasia; *Dig. Dis. Sci.* **2003**, 48, 1273–1283
- 22 Eljamel, S.; Photodynamic applications in brain tumors: A comprehensive review of the literature; *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, 7, 76-85
- 23 Aziz, F.; Telara, S.; Moseley, H.; Goodman, C.; Manthri, P.; Eljamel, M.S.; Photodynamic therapy adjuvant to surgery in metastatic carcinoma in brain; *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2010**, 6, 227-230
- 24 Bonnet. R.; Photodynamic therapy in historical perspective; *Rev. Contemp. Pharmacoter.* **1999**, 10, 1-17.
- 25 Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M.; The history of photodetection and photodynamic therapy; *Photochem. Photobiol.* **2001**, 74, 637-744.
- 26 Moan, J.; Peng, Q.; An outline of the hundred-year history of PDT; *Anticancer Res.* **2003**, 23, 3591-3600
- 27 Mitton, D.; Ackroyd, R.; History of photodynamic therapy in Great Britain; *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2005**, 2, 239-246
- 28 Dougherty, T.J.; A personal history of photodynamic therapy; *Reg. Cancer Ther.* **2007**, 117-132
- 29 Scherer, H.; Chemisch-physiologische untersuchungen; *Ann. Chem. Pharm.* **1841**, 40, 1-64
- 30 Thudichum, J.L. *Tenth Report of the Medical Officer of the Privy Council*; H. M. Stationary Office; London, **1867**
- 31 Finsen, N.R. *Phototherapy.*; Edward Arnold, Ed.; London, **1901**

- 32 Raab, O.; Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien; *Z. Biol.* **1900**, 39, 524-546
- 33 von Tappeiner, H.; Jesionek, A.; Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen; *Muench. Med. Wochenschr.* **1903**, 47, 2042-2044
- 34 von Tappeiner, H.; Jodlbauer, A.; Über Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme; *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **1904**, 80, 427-487
- 35 von Tappeiner, H.; Jodlbauer, A. *Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzen. Gesamte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung*; F. C. W. Vogel; Leipzig, **1907**
- 36 Hausmann, W.; Die sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins; *Biochem. Z.* **1911**, 30, 276-316
- 37 Meyer-Betz, F.; Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Hematoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs; *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **1913**, 112, 476-503
- 38 Policard, A.; Études sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood; *C. R. Soc. Biol.* **1924**, 91, 1423-1428
- 39 Auler, H.; Banzer, G.; Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei Geschwulstkranken Menschen und Tieren; *Z. Krebsforsch.* **1942**, 53, 65-68
- 40 Figge, F.H.J.; Weiland, G.S.; Manganiello, L.O.J.; Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1948**, 68, 640-641
- 41 Schwartz, S.K.; Absolon, K.; Vermund, H.; Some relationships of porphyrins, x-rays and tumours; *Univ. Minn. Med. Bull.* **1955**, 27, 7-8
- 42 Lipson, R.L.; Baldes, E.J.; The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative; *Arch. Dermatol.* **1960**, 82, 508-516
- 43 Diamond, I.; Granelli, S.G.; McDonagh, A.F.; Nielsen, S.; Wilson, C.B.; Jaenicke, R.; Photodynamic therapy of malignant tumours; *Lancet* **1972**, 2, 1175-1177
- 44 Dougherty, T.J.; Grinday, G.B.; Fiel, R.; Weishaupt, K.R.; Boyle, D.G.; Photoradiation therapy II: cure of animal tumors with haematoporphyrin and light; *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, 55, 115-121
- 45 Kelly, J.F.; Snell, M.E.; Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and treatment of carcinoma of the bladder; *J. Urol.* **1976**, 115, 150-151
- 46 Dougherty, T.J.; Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors; *Photochem. Photobiol.* **1983**, 38, 377-379

- 47 Dougherty, T.J.; Potter, W.R.; Weishaupt, K.R.; The structure of the active component of hematoporphyrin derivative; In *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*; D. R. Doiron and C. J. Gomer, Ed.; A. R. Liss, New York, **1984**, 301-314
- 48 Kessel, D.; Thompson, P.; Musselman, B.; Chang, C.K.; Chemistry of hematoporphyrin derived photosensitisers; *Photochem. Photobiol.* **1987**, 46, 563-568
- 49 Henderson, B.W.; Gollnick, S.O.; Snyder, J.W.; Theresa M.? Busch, T.M.; Kousis, P.C.; Cheney, R.T.; Morgan, J.; Choice of oxygen-conserving treatment determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors; *Cancer Res.* **2004**, 64, 2120-2126
- 50 Garland, M.J.; Cassidy, C.M.; Woolfson, D.; Donnelly, R.F.; Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments; *Future Med. Chem.* **2000**, 1, 667-691
- 51 Niedre, M.; Patterson, M.S.; Wilson, C.B.; Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *in vitro* and *in vivo*; *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 382-391
- 52 Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbely, M.; ; Peng, Q.; Photodynamic therapy; *J. Nat. Cancer Inst* **1998**, 90, 889-905
- 53 Jori, G.; Beltramini, M.; Reddi, E.; Salvato, B.; Pagnan, A.; Ziron, L.; Tomio, L.; Tsanov, T.; Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carrier *in vivo*; *Cancer Lett.* **1984**, 24, 291-297
- 54 Calzavara-Pinton, P.G.; Venturini, M.; Sala, R.; Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology; *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereal.* **2007**, 21, 293-302
- 55 Josefsen, L.B.; Boye, R.W.; Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers; *Br. J. Pharmacol.* **2008**, 154, 1-3
- 56 Berg, K.; Moan, J.; Lysosomes microtubules as targets for photochemotherapy of cancer; *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 403-409
- 57 Richter, A.M.; Yip, S.; Meadows, H.; Jain, A.K.; Neyndorff, H.; Moreno, G.; Salet, C.; Levy, J.G.; Photosensitizing potencies of the structural analogues of benzoporphyrin derivative in different biological test systems; *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1996**, 14, 335-341
- 58 Peng, Q.; Farrants, G.W.; Madslien, K.; Bommer, J.C.; Moan, J.; Danielsen, H.E.; Nesland, J.M.; Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminum phthalocyanines in a human melanoma cell line; *Int. J. Cancer* **1991**, 49, 290-295

- 59 Rosenkranz, A.A.; Jans, D.A.; Sobolev, A.S.; Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency; *Immunol. Cell Biol.* **2000**, 78, 452-464
- 60 Kennedy, J.C.; Pottier, R.H.; Pross, D.C.; Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience; *J. Photochem. Photobiol. B.* **1990**, 6, 143-148
- 61 Allison, R.R.; Mota, H.C.; Bagnato, V.S.; Sibata, C.H.; Bionanotechnology and photodynamic therapy-state of the art review; *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2008**, 5, 19-28
- 62 Serebrovskaya, O.; Edelweiss, E.F.; Stremovskiy, O.; Lukianov, K.A.; Chudakov, D.M.; Deyev, S.M.; Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein; *Proc.Natl. Acad. Sc. USA* **2009**, 106, 9221-9225
- 63 Banfi, S.; Caruso, E.; Capriol, E.; Mazzagattia, L.; Cantib, G.; Ravizzaa, R.; Gariboldia, M.; Montia, E.; Photodynamic effect of phorphyrin and chlorin photosensitisers in human colon carcinoma cells; *Bioinorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 4853-4860
- 64 Samaroo, D.; Vinodu, M.; Chen, X.; Drain, C.M.; Meso-tetra(pentafluorophenyl)porphyrin is an efficient platform for combinatorial synthesis, and the selection of new photodynamic therapeutics using a cancer cell line; *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 998-1011
- 65 Sibrian-Vazquez, M.; Jensen, T.J.; Graca, M.; Vicente, H.; Synthesis and cellular studies of PEG-functionalized meso-tetraphenylporphyrins; *J. Photochem. Photobiol. B.* **2007**, 86, 9-21.
- 66 Hirohara, S.; Obata, M.; Alitomo, H.; Sharyo, K.; Ogata, S.; Ohtsuki, C.; Yano, S.; Ando, T.; Tanihara, M.; Structure-photodynamic effect relationship of 24 glycoconjugated photosensitisers in HeLa cells; *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31, 2265-2272
- 67 Kravlova, J.; Briza, T.; Moresova, I.; Dolenský, B.; Vasek, P.; Poucková, P.; Kejík, Z.; Kaplánek, R.; Martásek, P.; Dvorák, M.; Král, V.; Glycol porphyrin derivatives as potent photodynamic inducers of apoptosis in tumor cells; *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 5964-5973
- 68 Rancan, F.; Wiehe, A.A.; Nobel, M.; Senge, M.; Omari, S.A.; Böhm, F.; Röder, J.M.; Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells; *J. Photochem. Photobiol. B.* **2005**, 78, 17-28
- 69 Madar-Balakirski, N.; Tempel-Brami, C.; Kalchenko, V.; Brenner, O.; Varon, D.; Scherz, A.; Salomon, Y.; Permanent occlusion of feeding arteries and draining veins in solid mouse tumors by vascular targeted photodynamic therapy (VTP) with Tookad; **2010**, 5; e10282;

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0010282>; acessado em maio de 2010.

70 Koudinova, N.V.; Pinthus, J.H.; Brandis, A.; Brenner, O.; Bendel, P.; Ramon, J.; Eshhar, Z.; Scherz, A.; Salomon, Y.; Photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD): Successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts; *Int. J. Cancer* **2003**, 104, 782-789

71 Trachtenberg, J.; Bogaards, A.; Weersink, R.A.; Haider, M.A.; Evans, A.; McCluskey, S.A.; Scherz, A.; Gertner, M.R.; Yue, C.; Appu, S.; Aprikian, A.; Savard, J.; Wilson, B.C.; Elhilali, M.; Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: Assessment of safety and treatment response; *J. Urol.* **2007**, 178, 1974-1979

72 Ashur, I.; Goldschmidt, R.; Pinkas, I.; Salomon, Y.; Szewczyk, G.; Sarna, T.; Scherz, A.; Photocatalytic generation of oxygen radicals by the water-soluble bacteriochlorophyll derivative WST11, noncovalently bound to serum albumin; *J. Phys. Chem. A.* **2009**, 113, 8027-8037

73 Sessler, J.L.; Murai, T.; Lynch, V.; Cyr, M.; An “expanded porphyrin”: the synthesis and structure of a new aromatic pentadentate ligand; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5586-5588

74 Magda, D.; Miller, R.A.; Motexafin gadolinium: A novel redox active drug for cancer therapy; *Seminars in Cancer Biology* **2006**, 16, 466-476

75 Filonenko, E.V.; Sokolov, V.V.; Chissov, V.I.; Lukyanets, E.A.; Vorozhtsov, G.N.; Photodynamic therapy of early esophageal cancer; *Photodiag. Photod. Ther.* **2008**, 5, 187-190

76 Huang, Z.; An update on the regulatory status of PDT photosensitizers in China; *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2008**, 5, 285-287.

77 Arnbjerg, J.; Jimenez-Banzo, A.; Paterson, M.J.; Nonell, S.; Borrell, J.I.; Christiansen, O.; Ogilby, P.R.; Two-photon absorption in tetraphenylporphycenes: are porphycenes better candidates than porphyrins for providing optimal optical properties for two-photon photodynamic therapy?; *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5188-5199

78 Sanchez-Garcia, D.; Borrell, J.I.; Batllori, X.; Teixidó, J.; Tomas, S.; Nonell, S.; Preclinical photodynamic therapy in Spain: 1 Chemical and photophysical studies on porphycenes and other photosensitizers; *J. Porph. Phtaloc.* **2009**, 13, 528-536

79 Wainwright, M.; Photoantimicrobials - So what's stopping us?; *Photodiag. Photodyn. Ther.* **2008**, 5, 285-287

80 Bechet, D.; Couleaud, P.; Frochot, c.; Viriot, M.L.; Guillemain, F.; Barberi-Heyob, M.; Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents; *Trends in Biotech.* **2008**, 26, 612-621

- 81 Mao, S.; Shi, Y.; Li, L.; Xu, J.; Schaper, A.; Kissel, T.; Effects of process and formulation parameters on characteristics and internal morphology of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres formed by the solvent evaporation method; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 68, 214-223
- 82 Gasparini, G.; Kosvintsev, S.R.; Stillwell, M.T.; Holdich, R.G.; Preparation and characterization of PLGA particles for subcutaneous controlled drug release by membrane emulsification; *Coll. Surf. B.* **2008**, 61, 199-207
- 83 McCarron, P.A.; Hall, M.; Incorporation of novel 1-alkylcarbonyloxymethyl prodrugs of 5-fluorouracil into poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles.; *Int. J. Pharm.* **2008**, 348, 115-124
- 84 Wainwright, M.; Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT); *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, 42, 13-28
- 85 Usacheva, M.N.; Teichert, M.C.; Biel, M.A.; Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms; *Lasers Surg. Med.* **2001**, 29, 165-173
- 86 Lazzeri, D.; Rovera, M.; Pascual, L.; Durantini, E.N.; Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using mesosubstituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution; *Photochem. Photobiol.* **2004**, 80, 286-293
- 87 Maisch, T.; Bosl, C.; Szeimies, R.M.; Lehn, N.; Abels, C.; Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 1542-1552
- 88 Segalla, A.; Borsarelli, C.D.; Braslavsky, S.E.; Spikes, J.D.; Roncucci, G.; Dei, D.; Chiti, G.; Jori, G.; Reddi, E.; Photophysical, photochemical and antibacterial photosensitizing properties of a novel octacationic Zn(II)-phthalocyanine; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, 1, 641-648
- 89 Kussovski, V.; Mantareva, V.; Angelov, I.; Orozova, P.; Wöhrle, D.; Schnurpfeil, G.; Borisova, E.; Avramov, L.; Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity; *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, 294, 133-140
- 90 Tegos, G.P.; Demidova, T.N.; Arcila-Lopez, D.; Lee, H.; Wharton, T.; Gali, H.; Hamblin, M.R.; Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers; *Chem. Biol.* **2005**, 12, 1127-1135
- 91 Hamblin, M.R.; O'Donnell, D.A.; Murthy, N.; Rajagopalan, N.; Michaud, N.; Sherwood, M.E.; Hasan, T.; Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria; *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, 49, 941-951

- 92 Soukos, N.S.; Ximenez-Fyvie, L.A.; Hamblin, M.R.; Socransky, S.S.; Hasan, T.; Targeted antimicrobial photochemotherapy; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, 42, 2595-2601
- 93 Tegos, G.P.; Anbe, M.; Yang, C.; Demidova, T.N.; Satti, M.; Mroz, P.; Janjua, S.; Gad, F.; Hamblin, M.R.; Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 1402-1410
- 94 Derycke, A.S.L.; De Witte, V.A.M.; Liposomes for photodynamic therapy; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, 56, 17-30
- 95 Sibata, M.N.; Tedesco, A.C.; Marchetti, J.M.; Photophysical and photochemical studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, 23, 131-138
- 96 Soncin, M.; Polo, L.; Reddi, E.; Jori, G.; Rihtner, B.D.; Kenney, M.E.; Rodgers, M.A.J.; Unusually high affinity of Zn(II) tetradibenzobarrelenooctabutoxy-phthalocyanine for low density lipoproteins in a tumor-bearing mouse; *Photochem. Photobiol.* **1995**, 61, 310-312
- 97 Konan, Y.N.; Cerny, R.; Favet, J.; Berton, M.; Gurny, R.; Allemann, E.; Preparation and characterization of sterile sub-200 nm meso-tetra(4-hydroxylphenyl)porphyrin-loaded nanoparticles for photodynamic therapy; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2003**, 55, 115-124
- 98 Biolo, R.; Jori, G.; Soncin, M.; Rihter, B.; Kenney, M.E.; Rodgers, M.A.; Effect of photosensitizer delivery system and irradiation parameters on the efficiency of photodynamic therapy of B16 pigmented melanoma in mice; *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63, 224-228
- 99 Wöhrle, D.; Müller, S.; Shopova, M.; Mantareva, V.; Spassova, G.; Vietri, F.; Ricchelli, F.; Jori, G.; Effect of delivery system on the pharmacokinetic and phototherapeutic properties of bis(methyloxyethyleneoxy) silicon-phthalocyanine in tumor-bearing mice; *J. Photochem. Photobiol.* **1999**, 50, 124-128
- 100 Gomes, A.J.; Lunardi, C.N.; Tedesco, A.C.; Characterization of Biodegradable Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles Loaded with Bacteriochlorophyll-*a* for Photodynamic Therapy; *Photomed. Las. Sur.* **2007**, 25, 428-435
- 101 Jeffery, H.; Davis, S.S.; O'Hagan, D.T.; The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles, I. Oil-in-water emulsion solvent evaporation; *Int. J. Pharm.* **1991**, 77, 169-175
- 102 Pittet, O.; Petermann, D.; Michod, D.; Krueger, T.; Cheng, C.; Ris, H.B.; Widmann, C.; Effect of the TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ peptide on apoptosis of

- human malignant mesothelioma cells and fibroblasts exposed to meso-tetrahydroxyphenyl-chlorin and light; *J. Photoch. Photob B* **2007**, 88, 29-35
- 103 Kalyanasundaram, K. *Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes*; Academic Press; 1th ed.; San Diego, **1992**
- 104 Dewar, M.J.S.; Zoebisch, E.G.; Healy, E.F.; Stewart, J.J.P.; Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3902-3909
- 105 Wiehe, A.; Simonenko, E.K.; Senge, M.O.; Röder, B.; Hydrophilicity vs hydrophobicity - varying the amphiphilic structure of porphyrins related to the photosensitizer m-THPC; *J. Porph. Phtaloc.* **2001**, 5, 758-761
- 106 Martinazzo, C.A.; Análise de dados estatísticos com o Microsoft OFFICE Excel 2007
- 107 Ben-Dror, S.; Bronshtein, I.; Wiehe, A.; Röder, B.; Senge, M.O.; Ehrenberg, B.; On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers; *Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 695-701
- 108 Singh, B.; Kumar, R.; Ahuja, N.; Optimizing drug delivery systems using systematic “design of experiments.” Part I. Fundamental aspects.; *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2005**, 22, 27-105
- 109 Berg, K.; Anhot, H.; Moan, J.; Ronnestad, A.; Rimington, C.; Photobiological properties of hematoporphyrin diesters: Evaluation for possible application in photochemotherapy of cancer; *J. Photochem. Photobiol. B.* **1993**, 20, 37-45
- 110 Sahana, D.K.; Mittal, G.; Bhardwaj, V.; Kumar, M.N.V.; PLGA Nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formulation and release behavior *in vitro* and *in vivo* using estradiol as a model drug; *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 1530-1542
- 111 Hunter, R.J. *Zeta potential in colloid science. Principles and applications*; Academic Press Inc.; 3rd Edition; San Diego; **1988**, p. 5.
- 112 Silva, A. R.; Preparação, caracterização e avaliação de nanoesferas de PLGA (50:50) contendo In(III)-meso-tetrafenilporfirina para aplicação em terapia fotodinâmica; tese de doutorado; **2007**; <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtls000411736.pdf>, acessado em maio de 2010.
- 113 Galindo-Rodriguez, S.; Allemann, E.; Fessi, H.; Doelker, E.; Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods; *Pharm. Res.* **2004**, 21, 1428

- 114 Sahooa, S.K.; Panyama, J.; Prabhaa, S.; Labhasetwar, V.; Residual polyvinyl alcohol associated with poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake; *J. Contr. Rel.* **2002**, 82, 105-114
- 115 Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M.C.; Illum, I.; Davis, S.S.; PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug; *J. Control. Rel.* **1999**, 57, 171-185
- 116 Stolnik, S.; Garnett, M.C.; Davis, M.C.; Illum, L.; Boustia, M.; Vert, M.; Davis, S.S.; The colloidal properties of surfactant-free biodegradable nanospheres from poly(-malic acid-co-benzyl malate)s and poly(lactic acid-co-glycolide); *Coll. Surf. A* **1995**, 97, 235-245
- 117 Silva, A.R.; Zaniquelli, M.E.D.; Baratti, M.O.; Jorge, R.A.; Drug release from microspheres and nanospheres of poly(lactide-co-glycolide) without sphere separation from the release medium; *J. Brazilian Chem. Soc.* **2010**, 21, 215-225
- 118 Corrigan, O.I.; Li, X.; Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates; *Eur. J. Pharm. Sc.* **2009**, 37, 477-485
- 119 Lao, L.L.; Venkatraman, S.S.; Modeling of drug release from biodegradable polymer blends; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 70, 796-803
- 120 Vargas, A.; Pegaz, B.; Debefve, E.; Kouakou-Konan, Y.N.; Lange, N.; Ballini, J.P.; van der Bergh, H.; Gurny, R.; Delie, F.; Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: An *in vivo* evaluation using chick embryo; *Int. J. Pharm.* **2004**, 286, 131-145
- 121 Ajun, W.; Yuxia, K.; The characters of self-assembly core/shell nanoparticles of amphiphilic hyperbranched polyethers as drug carriers; *J. Nanopart. Res.* **2008**, 10, 437-448
- 122 Faisant, N.; Siepmann, J.; Benoit J.P.; PLGA-based Microparticles: Elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release; *Eur. J. of Pharm. Sci.* **2002**, 15, 355-366
- 123 Budhian, A.; Siegel, S.J.; Winey, K.I.; Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles; *Int. J. of Pharm.* **2008**, 346, 151-159
- 124 Berg, K.; Western, A.; Bommer, J.C.; Moan, J.; Intracellular localization of sulfonated mesotetraphenylporphines in a human carcinoma cell line; *Photochem. Photobiol.* **1990**, 52, 481-487.
- 125 Silva, A.R.; Inada, N.M.; Rettori, D.; Baratti M.O.; Vercesi, A.E.; Jorge, R.A.; In vitro photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato) indium(III) loaded-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in LNCaP prostate tumour cells; *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, 94, 101-112

- 126 Katsikari, A.; Patronidou, C.; Kiparissides, C.; Arsenakis, M.; Uptake and cytotoxicity of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles in human colon adenocarcinoma cells; *Mater. Sci. Eng. B* **2009**, 165, 160-164
- 127 Simon, V.; Devaux, C.; Darmon, A.; Donnet, T.; Thiénot, E.; Germain, M.; Honnorat, J.; Duval, A.; Pottier, A.; Borghi, E.; Levy, L.; Marill, J.; Pp IX silica nanoparticles demonstrate differential interactions with in vitro tumor cell lines and in vivo mouse models of human cancers; *Photochem. Photobiol.* **2010**, 86, 213-222
- 128 Panyam, J.; Zhou, W.Z.; Prabha, S.; Sahoo, S. K.; Labhasetwar, V.; Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery; *Faseb J.* **2002**, 16, 1217-1226.
- 129 Vargas, A.; Eid, M.; Fanchaouy, M.; Gurny, R.; Delie, F.; *In vivo* photodynamic activity of photosensitizer-loaded nanoparticles: Formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 69, 43-53.
- 130 Kamps, J.A.; Scherphof, G.L.; Receptor versus non-receptor mediated clearance of liposomes; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, 32, 81-97.
- 131 Shaw, D.J.; *Introdução a Química dos Colóides e de Superfícies*, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, **1975**, 159-166.
- 132 Gaumet, M.; Vargas, A.; Gurny, R.; Delie, F.; Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 69, 1-9
- 133 Kang, H.S.; Kwon, S-S.; Nam, Y-S.; Han, S-H.; Chang, I-S.; *J. Coll. Interf. Sci.* **2002**, 255, 352–355
- 134 Roland, I.; Piel, G.; Delattre, L.; Evrard, B.; *Int. J. Pharm.* **2003**, 263, 85–94
- 135 Lee, S. C.; Oh, J. T.; Jang, M. H.; Chung, S. I.; *J. Control. Release* **1999**, 59, 123
- 136 Feng, S. S.; Mu, L.; Win, K. Y.; Huang, G. F.; *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11, 413
- 137 Davaran, S.; Omid, Y.; Rashidi, M.R.; Anzabi, M., *J. Bioact. Comp. Pol.* **2008**, 23, 115 -131
- 138 Silva Filho, F.C.; Santos, A.B.; de Carvalho, de Souza, T.M.; W.; *J.Leukoc. Biol* **1987**, 41, 143–149