



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICO-QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE
PORFIRINAS PARA USO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA**

**DOUTORANDO: JOSELITO NARDY RIBEIRO
ORIENTADOR: DR. RENATO ATÍLIO JORGE**

**CAMPINAS-SP
FEVEREIRO DE 2005**

**UNICAMP/IQ
BIBLIOTECA**

UNIDADE	IQ
Nº CHAMADA	ITUNICAMP
	R354a
V	EX
TOMBO BC/	62648
PROC.	16-86-02
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	3/3/05
Nº CPD	

Biblioteca 3444.24

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

R354a Ribeiro, Joselito Nardy.
Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas
para uso em terapia fotodinâmica. / Joselito Nardy
Ribeiro. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Renato Atílio Jorge

**Tese (doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.**

- 1. Terapia Fotodinâmica. 2. Câncer.
3. Foto-oxidação. 4. Porfirinas. I. Jorge, Renato Atílio.
II. Universidade Estadual de Campinas.
III. Título.**

Para Araceli

"Desvendar o universo! Este é o propósito da vida"

Agradecimentos

Ao Instituto de Química da UNICAMP

À CAPES, CNPq e FAPESP

Ao Prof. Dr. Renato Atílio Jorge

Ao MS. André Romero da Silva

Ao Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco da USP de Ribeirão Preto-SP

A Profa. Dra. Tereza Dib Zambon Ativars

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Zezzi Arruda

Aos valiosos e eternos amigos Dr. Madson de Godoi Pereira, Dra. Lourdes Cardoso Neta, Dr. Fernando César Macedo Júnior, Dr. Clodoaldo Saron, Dra. Luciana Melo Coelho, MS. Gisele Nobre Costa, MS. Jerusa Simone Garcia, MS. Margareth Galvão, MS. Gyda May, Marcelo Anselmo e ao farmacêutico Eduardo Figueiredo

Aos amigos do Laboratório B200-204 do IQ-UNICAMP

Curriculum Vitae

Formação acadêmica/titulação

2002 - 2005 Doutorado em Ciências

Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo, Brasil
Título: *Avaliação da Atividade Fotodinâmica de Porfirinas para uso em Terapia Fotodinâmica.*

1999 - 2001 Mestrado em Agroquímica

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, Brasil
Título: *Efeitos de Própolis, Antocianina e Naringenina em Coelho Normais e Diabéticos.*

1994 - 1998 Bacharel em Química

Universidade Federal de Viçosa, UFV, Minas Gerais, Brasil
Título: *Melhoramento Genético de Soja*

Produção científica

Artigos publicados, aceitos e submetidos em periódicos

1. RIBEIRO JN, JORGE RA. Análise das propriedades anticancerígenas de meso-tetramesitilporfirina empregando métodos espectroscópicos. *Analytica*, v.2, n.10, p.43-49, 2004.
2. RIBEIRO JN, OLIVEIRA TT, NAGEM TJ, FLORES AV. Ausência de Toxicidade da Própolis. *Apacame M.D.*, v.77, p.14-20, 2004.
3. RIBEIRO JN, OLIVEIRA TT, NAGEM TJ, FLORES AV. Avaliação da toxicidade da antocianina de uva, através da quantificação espectrofotométrica, de constituintes do sangue, e medida de massa corporal de coelhos saudáveis. *Analytica*, v.3, n.12, p.50-55, 2004.
4. RIBEIRO JN, ROMERO A, JORGE RA. Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.40, n.6, p.383-390, 2004.
5. RIBEIRO JN, JORGE RA. Avaliação da influência da agregação e da foto-degradação na atividade fototerapêutica de octaetilporfirina e meso-tetramesitilporfirina. *Anais da Associação Brasileira de Química*, v.52, n.2, p.1-6, 2003.
6. SALGADO I, MODOLO LV, RIBEIRO JN, MAGALHAES JR, TAMASHIRO WM. Parallels Between Plants and Animals in the Production and Molecular Targets of Nitric Oxide. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, v.8, n.2, p.185-191, 2002.

7. RIBEIRO JN, OLIVEIRA TT, NAGEM TJ, MESSAGE D, SILVA AP. Avaliação da toxicidade da própolis e da antocianina sobre a massa corporal e sobre o metabolismo lipídico, de proteínas e de carboidratos em coelhos. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v.14, n.2, p.88, 2001.

8. SERRETI C, RIBEIRO JN, BARROS EG, MOREIRA MA. Soybean Breeding Program Assisted by RAPD-Fingerprint Aiming for High Protein Content and Absence of the Kunits Protease Inhibitor. *Brazilian Journal of Genetics*, v.20, n.3, p.261, 1997.

9. SERRETI C, RIBEIRO JN, MORAES RMA., BARROS EG, MOREIRA MA. RAPD-PCR Assisted Backcross to Quickly Recover Soybean Germplasm with High Protein Content. *Brazilian Journal of Genetics*, v.19, n.3, p.323, 1996.

Indicadores

1. Publicações em periódicos: 9
2. Total de trabalhos apresentados em Congressos: 20

Experiência em Ensino

Instituto de Química - UNICAMP

1. Disciplina de Química Geral durante dois semestres (PED)

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Viçosa-UFV

1. Disciplina de Laboratório de Bioquímica Básica durante um semestre (PED)
2. Disciplina de Laboratório de Biologia Celular para pós-graduação (voluntário)

Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES

1. Aprovado em concurso para professor de Bioquímica e Biofísica

Resumo

Neste trabalho investigou-se a atividade fotodinâmica de octaetilporfirina (OEP) e *meso*-tetramesitilporfirina (*m*-TMP). Foi avaliada, também, a influência do grupo vanadil (V=O) na atividade de OEP, utilizando-se, para isso, a vanadil octaetilporfirina (VOOEP). Foram analisados os parâmetros fotofísicos destas porfirinas: os valores da constante de velocidade de foto-oxidação (k_f) de biomoléculas (triptofano -Trp e albumina bovina - BSA) e a porcentagem de foto-destruição de eritrócitos. O mecanismo envolvido nos processos de foto-oxidação e foto-destruição foi, também, investigado, empregando-se supressores de oxigênio singlete (azida de sódio e L-histidina) e água deuterada (substância que aumenta o tempo de vida do oxigênio singlete). Posteriormente, realizou-se o encapsulamento destas porfirinas em vesículas lipossomais constituídas de fosfolipídios do tipo dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). Os valores dos parâmetros fotofísicos como rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) e tempo de vida no estado triplete (τ_T) indicaram que OEP ($\Phi_\Delta = 0,64 \pm 0,02$, $\tau_T = 0,91 \pm 0,02 \mu s$) é mais eficiente do que VOOEP ($\Phi_\Delta = 0,26 \pm 0,02$, $\tau_T = 0,22 \pm 0,03 \mu s$). Os parâmetros fotofísicos da *m*-TMP não puderam ser obtidos, devido a sua rápida fotodegradação na presença de laser do tipo Nd:YAG. Os valores de $k_f/10^{-4} s^{-1}$ para Trp e BSA demonstraram que OEP (Trp= $2,80 \pm 0,05$ e BSA= $2,50 \pm 0,1$) é mais eficiente do que *m*-TMP (Trp= $1,62 \pm 0,07$ e BSA= $1,53 \pm 0,06$) e VOOEP (Trp= $0,81 \pm 0,08$ e BSA= $0,62 \pm 0,04$). A porcentagem de foto-destruição de eritrócitos revelou que a atividade fotodinâmica de OEP é mais pronunciada do que a de *m*-TMP e VOOEP. Verificou-se, também, que os valores de k_f e da porcentagem de foto-destruição foram reduzidos na presença de supressores

de oxigênio singlete (1O_2) e aumentados, na presença de água deuterada. Isto indica que o 1O_2 é o principal responsável pela atividade fotodinâmica destas porfirinas. Adicionalmente foi demonstrado que a eficiência de OEP, *m*-TMP e VOOEP foi aumentada pela incorporação destas porfirinas em lipossomas. Esta incorporação diminuiu a agregação das porfirinas. Os resultados deste trabalho demonstram que as diferenças observadas, na atividade fotodinâmica, podem ser associadas com as diferenças na estrutura molecular das porfirinas. O grupo V=O, por ser paramagnético, interfere na atividade de OEP provocando uma redução considerável na sua eficiência.

Abstract

In this work there was investigated the photodynamic efficiency of octaethylporphyrin (OEP), vanadyl octaethylporphyrin (VOOEP), and *meso*-tetramesitylporphyrin (*m*-TMP). This study was performed by evaluation of photophysical parameters of these porphyrins, the photooxidation rate constants (k_f) of the biomolecules (tryptophan -Trp and bovine albumin -BSA) and the erythrocytes photodestruction percentage. The mechanism involved in the photooxidation of biomolecules and erythrocytes photodestruction was also studied by way of sodium azide, L-histidine (singlet oxygen scavengers) and deuterium oxide. In addition, there was investigated the influence of liposome in the photodynamic activity of OEP, VOOEP, and *m*-TMP. The values of photophysical parameters such as singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ) and triplet state lifetime (τ_T) indicated that OEP ($\Phi_\Delta = 0.64 \pm 0.02$, $\tau_T = 0.91 \pm 0.02 \mu\text{s}$) is more efficient than VOOEP ($\Phi_\Delta = 0.26 \pm 0.02$, $\tau_T = 0.22 \pm 0.03 \mu\text{s}$). The values of $k_f/10^{-4} \text{ s}^{-1}$ for Trp and BSA photooxidation demonstrated that OEP (Trp= 2.80 ± 0.05 and BSA= 2.50 ± 0.1) is more efficient than *m*-TMP (Trp= 1.62 ± 0.07 and BSA= 1.53 ± 0.06) and VOOEP (Trp= 0.81 ± 0.08 and BSA= 0.62 ± 0.04). The photodestruction percentage of erythrocytes revealed that the photodynamic activity of OEP is more pronounced than that of *m*-TMP and VOOEP. The values of k_f and the photodestruction percentage were reduced by the presence of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) scavengers and increased by deuterium oxide indicating that $^1\text{O}_2$ is responsible by OEP, VOOEP, and *m*-TMP photoactivity. Additionally it was demonstrated that the photodynamic efficiency of OEP, VOOEP, and *m*-TMP was increased by liposome-

incorporation. This incorporation diminished the aggregation of these porphyrins, increasing the photodestruction percentage of erythrocytes. These results indicated that differences observed in the photodynamic activity between porphyrins could be associated with differences in their molecular structures. The photophysical parameters, photooxidation of biomolecules, and photodestruction of erythrocytes clearly indicate that the vanadyl group ($V=O$) interferes in the photodynamic activity of OEP causing a considerable reduction in its efficiency.

Índice

Lista de Tabelas.....	xixi
Lista de Figuras.....	xix
1. Introdução.....	1
1.1. O câncer.....	1
1.2. A Terapia Fotodinâmica.....	4
1.2.1. A indução da morte de células tumorais pela TFD.....	6
1.2.2. Fotossensibilizadores.....	8
1.2.3. Fotossensibilizadores ideais.....	12
1.2.4. Encapsulamento de fotossensibilizadores em lipossomas.....	15
1.2.5. A busca por novos fotossensibilizadores.....	17
2. Objetivos.....	20
3. Materiais e métodos.....	21
3.1. Materiais.....	21
3.2. Métodos.....	22
3.2.1. Medidas de parâmetros fotofísicos.....	22
3.2.2. Foto-oxidação de biomoléculas.....	24
3.2.3. Avaliação da foto-degradação.....	25
3.2.4. Determinação da constante de dimerização.....	26
3.2.5. Determinação do mecanismo de foto-oxidação de biomoléculas.....	27
3.2.6. Influência de Tween 20® e solvente orgânico na hemólise de eritrócitos.....	28
3.2.7. Foto-destruição de eritrócitos.....	29
3.2.8. Determinação do mecanismo de foto-destruição de eritrócitos.....	30
3.2.9. Fluorescência das porfirinas em função da concentração de lipossomas.....	31
3.2.10. Determinação da concentração de porfirina encapsulada pelos lipossomas.....	32
3.2.11. Determinação da constante de supressão de fluorescência.....	33
3.2.12. Foto-destruição de eritrócitos na presença e ausência de lipossomas.....	33
3.2.13. Determinação da constante de dimerização na presença de lipossoma.....	34
3.2.14. Verificação da estabilidade das vesículas lipossomais na presença e ausência de colesterol.....	35
4. Resultados e discussão.....	35

4.1. Medidas de parâmetros fotofísicos.....	35
4.2. Foto-oxidação de biomoléculas.....	42
4.3. Avaliação da foto-degradação.....	47
4.4. Determinação da constante de dimerização.....	50
4.5. Determinação do mecanismo de foto-oxidação de biomoléculas....	53
4.6. Influência de Tween 20 e solvente orgânico na hemólise de células sanguíneas.....	56
4.7. Foto-destruição de eritrócitos.....	57
4.8. Determinação do mecanismo de foto-destruição de eritrócitos...	61
4.9. Incorporação das porfirinas em lipossomas.....	67
4.10. Fluorescência das porfirinas em função da concentração de lipossomas.....	67
4.11. Determinação da concentração de porfirina encapsulada pelos lipossomas.....	68
4.12. Determinação da constante de supressão de fluorescência.....	71
4.13. Foto-destruição de células e determinação de constante de dimerização em presença de lipossoma.....	74
4.14. Estabilidade das vesículas lipossomais na presença e ausência de colesterol.....	76
5. Conclusões.....	79
6. Referências bibliográficas.....	80

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros fotofísicos de OEP, VOOEP e <i>m</i> -TMP. I = fluorescência máxima τ_T = tempo de vida no estado triplete excitado, τ_f = tempo de vida de fluorescência Φ_Δ = rendimento quântico de oxigênio singlete. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.....	39
Tabela 2. Valores das constantes de velocidade de foto-oxidação (kf) de Trp e BSA na presença de OEP, VOOEP, <i>m</i> -TMP, luz e oxigênio. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral....	46
Tabela 3. Valores de KD para OEP e <i>m</i> -TMP. Estes valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.....	53
Tabela 4. Valores de porcentagem de incorporação das porfirinas em lipossomas. Os valores representam a média de três processos de encapsulamento \pm desvio padrão amostral.....	70
Tabela 5: Valores das constantes de supressão de fluorescência de OEP e <i>m</i> -TMP, por iodeto, na ausência e presença de lipossoma.....	72
Tabela 6. Valores de k_D para OEP e <i>m</i> -TMP, na ausência e presença de lipossoma. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.....	75

Lista de Figuras

Figura 1. Como surge o tumor: ao sofrer uma mutação letal, uma célula passa a se reproduzir de modo descontrolado (B); uma nova mutação cria células diferenciadas, ou seja, anormais (C); em seguida, outras mutações tornam o tumor ainda mais agressivo, mas ainda contido nos limites entre tecidos (D); finalmente, o tumor lança células no sangue (E), podendo gerar novos tumores em outros locais do organismo (fonte: referência 2).	2
Figura 2. Esquema de tratamento de um tumor com TFD.....	5
Figura 3. Mecanismos (tipo I e II) de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador (FTS) e oxigênio. O fotossensibilizador no estado singlete fundamental (S_0) é irradiado com luz gerando fotossensibilizador no estado singlete excitado (S_1). O S_1 pode decair para o estado triplete excitado (T_1) gerando radical superóxido ($^3O_2^{\cdot-}$) (mecanismo tipo I) e/ou oxigênio singlete (1O_2) (mecanismo tipo II). Estas EROs podem causar danos em biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas) das células tumorais.....	6

Figura 4. Anéis porfirínicos com 22 (a), 20 (b) e 18 (c) elétrons π respectivamente.....	9
Figura 5. Espectro de absorvância de octaetilporfirina (OEP) apresentando uma banda de grande intensidade (banda de Soret em 399 nm) e quatro bandas menores (bandas Q em 500, 534, 570 e 625 nm).....	10
Figura 6. Diagrama descrevendo um elétron em uma região L delimitada por barreiras de energia potencial (U) infinita (partícula na caixa).....	10
Figura 7. Um diagrama de energia descrevendo a forma como o aumento do número de elétrons π em uma porfirina interfere na energia de transição.....	12
Figura 8. Estrutura de agregados de porfirinas com conformação face a face (a) e interação entre dímeros para formação de oligômeros (b). (Fonte: referência 45).....	13
Figura 9. Foto-branqueamento de um composto porfirínico na presença de oxigênio singlete. (Fonte: referência 45).....	14
Figura 10. Representação de preparação de lipossomas MLV, SUV e LUV. (Fonte: referência 52).....	16
Figura 11. Estrutura de alguns fotossensibilizadores que têm sido avaliados para serem utilizados em TFD.....	19
Figura 12. Estruturas de OEP (a), VOOEP (b) e <i>m</i> -TMP (c).....	21
Figura 13. Espectros de absorvância de 10 μ M de OEP (a), VOOEP (b) e <i>m</i> -TMP (c) em clorofórmio com caminho ótico 0,5 cm e a 28°C.....	36
Figura 14. Espectros de fluorescência de 10 μ M de OEP (a), VOOEP (b) e <i>m</i> -TMP (c) em clorofórmio com ótico 0,5 cm a 28°C.....	37
Figura 15. Espectro de absorvância do transiente de VOOEP (\blacktriangledown) e OEP (\bullet) obtido em clorofórmio.....	41
Figura 16. Reação de oxigênio singlete com o aminoácido triptofano.....	43
Figura 17. Decaimento na intensidade dos espectros de fluorescência de Trp na presença de OEP (a), VOOEP (b), <i>m</i> -TMP (c), luz e oxigênio. Estes espectros foram obtidos num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20 [®] 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para <i>m</i> -TMP), caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C.....	44

Figura 18. Decaimento na intensidade dos espectros de fluorescência de BSA na presença de OEP (a), VOOEP (b), m-TMP (c), luz e oxigênio. Estes espectros foram obtidos num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm a 28°C. 45

Figura 19. Exemplo de cálculo da constante de velocidade de foto-oxidação para Trp (a) e BSA (b) na presença de OEP..... 46

Figura 20. Valores de k_f em função das concentrações das porfirinas. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.... 47

Figura 21. Intensidade de fluorescência de OEP em 620 nm (a), VOOEP em 623 nm (b) e m-TMP em 650 nm (c), na presença de luz e oxigênio. Este experimento foi realizado durante 60 minutos num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral..... 49

Figura 22. Fluorescência de OEP em 620 nm (a), VOOEP em 623 nm (b) e m-TMP em 650 nm (c). Meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v), caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. 50

Figura 23. Intensidade de fluorescência de OEP medida 620 nm (a) e m-TMP em 650 nm (b) em função de suas concentrações. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C..... 52

Figura 24. Influência de NaN_3 na foto-oxidação de Trp mediada OEP (a) VOOEP (b), m-TMP (c), luz e oxigênio. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral..... 54

Figura 25. Influência de D_2O na foto-oxidação de Trp mediada OEP (a) VOOEP (b), m-TMP (c), luz e oxigênio. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral..... 55

Figura 26. Influência de acetato de etila (a), tetrahidrofurano (b) e Tween 20 [®] (c) na hemólise de células de eritrócitos. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4 com caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C.....	57
Figura 27. Porcentagem de hemólise de eritrócitos na presença de 10µM de OEP, VOOEP ou m-TMP, luz e oxigênio. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20 [®] 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahidrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.....	58
Figura 28. Influência da concentração de OEP (a), VOOEP (b) e m-TMP (c) na foto-destruição de células de eritrócitos. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20 [®] 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahidrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.....	60
Figura 29. Hemólise de eritrócitos na ausência de luz e presença de OEP (a), VOOEP (b), m-TMP (c) e oxigênio. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20 [®] 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahidrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.....	61
Figura 30. Efeito de diferentes concentrações de manitol na de foto-destruição de eritrócitos ocasionada por OEP (a), VOOEP (b) e m-TMP (c). Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20 [®] 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahidrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.....	62

Figura 31. Efeito de D ₂ O na porcentagem de foto-destruição de eritrócitos ocasionada por OEP(a), VOOEP (b) e m-TMP (c). Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico 0,5 cm a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.....	64
Figura 32. Efeito de diferentes concentrações de NaN ₃ na porcentagem de foto-destruição de eritrócitos ocasionada por OEP (a), VOOEP (b) e m-TMP (c). Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.....	65
Figura 33. Efeito de diferentes concentrações de L-histidina na porcentagem de foto-destruição de eritrócitos ocasionada por OEP (a), VOOEP (b), m-TMP (c). Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.....	66
Figura 34. Fluorescência de OEP em 620 nm (a), VOOEP em 623 nm (c) e m-TMP em 650 nm (b) em função da concentração de lipossoma. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4 e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP) mantido a 45°C.....	68
Figura 35. (a) Aumento da absorbância de m-TMP em função de sua concentração em octanol e (b) equação da reta determinada para m-TMP..	69
Figura 36. Espectros de absorbância de moléculas de OEP (a), VOOEP (b) e m-TMP (c) que não foram incorporadas em lipossomas e migraram para octanol no sistema bifásico composto de solução aquosa de lipossoma e octanol.....	70
Figura 37. Supressão da fluorescência de OEP, por iodeto, na ausência (a) e presença (b) de lipossoma. Experimento realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4.....	71
Figura 38. Supressão da fluorescência de m-TMP, por iodeto, na ausência (a) e presença (b) de lipossoma. Experimento realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4.....	72

Figura 39. Espectros de fluorescência de 10 μ M de VOOEP na ausência (a) e presença de lipossoma (b). Na ausência de lipossoma o meio utilizado continha tampão PBS pH 7,4; Tween 20 [®] 0,6% (m/v) e solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP). Na presença de lipossoma utilizou-se um meio tamponado com PBS pH 7,4.....	73
Figura 40. Foto-destruição de células de eritrócitos na presença e ausência de lipossoma e de OEP (a), VOOEP (b) e m-TMP (c). Experimento realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4.....	74
Figura 41. Estabilidade das formulações (porfirina/lipossoma) na presença e ausência de colesterol. Estabilidade verificada através da absorbância de OEP medida em 398 nm (a), de VOOEP medida em 408 nm (b) e de m-TMP medida em 418 nm (c) em função do tempo. No nono dia foi realizada a sonicação para restabelecer a absorbância. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4.....	77

1. Introdução

1.1. O câncer

Nenhuma doença incita tanto medo quanto o câncer. Já não é apenas um problema médico! O medo coletivo da doença, ao longo deste século, tomou a forma de um sentimento irracional, equivalente ao temor que os povos antigos tinham diante de suas divindades malévolas e vingativas. Numa frase perfeita, o biólogo molecular inglês Mel Greaves, do Instituto de Pesquisa do Câncer, em Londres, definiu a doença como um "predador obscuro e demoníaco, um caçador sombrio e quase invencível". Peyton Rous, que recebeu o prêmio Nobel por seu trabalho pioneiro sobre oncologia viral (câncer provocado por certos tipos de vírus), escreveu que "os tumores destroem o homem de maneira peculiar e apavorante, já que a carne de sua própria carne de alguma forma se torna proliferativa, agressiva, predatória e ingovernável" ¹.

O câncer é mais antigo do que a própria humanidade. Na verdade, se este distúrbio acomete qualquer organismo multicelular, deve existir a pelo menos 500 milhões de anos. No ano 400 a.C, o médico grego Hipócrates comparou as veias que irradiam a partir de alguns tumores de mama às pernas de um caranguejo. Ele deu a moléstia o nome de *karkinoma* (carcinoma), que em grego significa caranguejo. Embora isso mostre que a doença já era conhecida desde a antiguidade, apenas nas últimas décadas, mais de dois milênios depois, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tumores começaram a ser compreendidos. Sabe-se agora, que esta patologia se caracteriza por uma proliferação descontrolada das células (Fig. 1), levando a tecidos de aspecto

desorganizado (os tumores). As células de um tumor descendem de uma só célula que, em determinado momento, em função de alterações (mutações) em seu material genético (DNA), passa a se reproduzir de modo descontrolado, transmitindo essas modificações às suas descendentes².

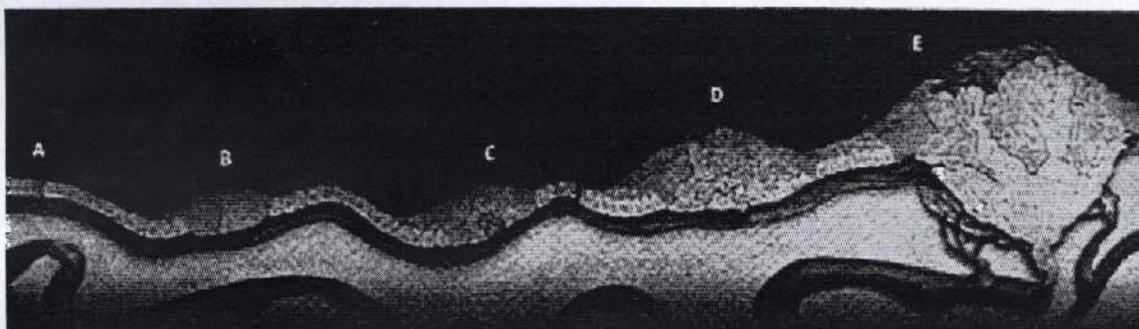


Figura 1. Como surge o tumor: ao sofrer uma mutação letal, uma célula passa a se reproduzir de modo descontrolado (B); uma nova mutação cria células diferenciadas, ou seja, anormais (C); em seguida, outras mutações tornam o tumor ainda mais agressivo, mas ainda contido nos limites entre tecidos (D); finalmente, o tumor lança células no sangue (metástase) (E), podendo gerar novos tumores em outros locais do organismo (fonte: referência 2).

Um grande grupo de agentes químicos, biológicos e físicos pode causar câncer direta ou indiretamente. Muitos desses agentes, que lesam o DNA, incluem substâncias químicas - como benzopireno, benzeno, aflotoxina e nitrosaminas. Além disso, os agentes físicos como radiação ionizante ou luz ultravioleta também podem ocasionar tumores. Alguns vírus como o da leucemia de células T humanas, o do papiloma e o de Epstein-Barr, foram implicados como causa de cânceres humanos, assim como fatores dietéticos, como as gorduras saturadas e ausência de fibras na dieta^{1,3,4}.

Além dos fatores ambientais, a susceptibilidade do hospedeiro tem sido considerada um determinante crítico do processo carcinogênico. Isto é parcialmente explicado por diferenças genéticas na capacidade de metabolizar

um precursor até o carcinogênio, por diferenças no meio hormonal, na resistência imunológica e por mutação ou deleção herdada ou adquirida de genes específicos, como o supressor do retinoblastoma, que protege contra o câncer (os chamados genes supressores tumorais). A grande incidência de câncer em certas famílias é tida como resultado da herança de mutações em genes que protegem as células normais contra estímulos de crescimento e proliferação^{1,3}. Um destes genes é o que codifica a proteína p53. Este gene é considerado o mestre no reparo do DNA da célula. Quando o DNA está danificado, a proteína p53 torna-se ativa. Esta proteína estimula a transcrição do gene que codifica a proteína p21 e esta por sua vez inibe o complexo Cdk que é responsável pelo estímulo da divisão celular. Assim, a célula com o DNA danificado fica impedida de originar outras células antes de ter seu DNA reparado, evitando assim a proliferação de células defeituosas e o aparecimento de tumores. Caso a lesão do DNA não possa ser reparada, a proteína p53 induz a célula ao suicídio, através de um mecanismo de morte celular programada conhecido como apoptose. Este evento impede que células com potencial cancerígeno se proliferem no organismo. Portanto, uma mutação neste gene seria fatal. De fato, qualquer mutação, que lese irreversivelmente um dos genes envolvidos na apoptose, poderá gerar um tumor, uma vez, que o organismo perde o controle sobre a proliferação celular⁵.

Todos os anos cerca de 7 milhões de pessoas morrem de câncer no mundo. No Brasil, só o câncer de pulmão fez 12.750 vítimas em 1999. Em 2002 o número de brasileiros, portadores desta patologia chegou a 400.000 e, destes, 130.000 perderam suas vidas⁶. Mas, apesar destes dados alarmantes, a visão assombrada da doença parece estar perdendo seu contraponto na

realidade. O avanço das pesquisas, que buscam entender e desenvolver tratamentos para a cura desta patologia aponta para um cenário que desautoriza grandemente o velho conceito de que o câncer é um mal incurável, uma moléstia sem cura nem explicação.

No Brasil, como em várias outras partes do mundo, alguns tratamentos têm sido adotados com relativo sucesso. Os três classicamente utilizados são: a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. Estes tratamentos são eficazes contra vários tipos de tumores e em muitos casos proporcionam um considerável aumento no tempo de vida do paciente. No entanto, estas terapias apresentam efeitos colaterais bastante dolorosos. Dentre estes efeitos destacam-se: a desfiguração do paciente, com prejuízos à sua auto-estima (cirurgia), queda de cabelo, náuseas, vômitos, diarreia, além de cansaço exagerado (quimioterapia e radioterapia), etc. Em virtude destes problemas, alguns outros tratamentos têm sido adotados, dentre os quais se destaca a Terapia Fotodinâmica (TFD)⁷.

1.2. A Terapia Fotodinâmica

Diversos compostos químicos absorvem luz e transformam esta energia luminosa em energia química. Este tipo de processo é comum na natureza, estando envolvido, por exemplo, na fotossíntese realizada pelas plantas, através da qual a luz do sol é convertida em energia química⁸. Este mesmo princípio de absorção de energia luminosa, e da sua conversão em energia química, é utilizado na TFD⁸.

A TFD é um tratamento clínico, que emprega a combinação de luz,

oxigênio e um composto fotossensibilizador (FTS), para o tratamento de uma variedade de tumores⁹. Esta técnica se baseia na administração do FTS no paciente e, após algumas horas, irradiação do tecido tumoral com luz visível. O FTS, excitado pela luz, transfere energia e/ou elétrons para o oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Tais espécies geram um estresse oxidativo, no tecido tumoral, ocasionando a morte, das células cancerígenas, por apoptose e/ou necrose (Fig. 2)¹⁰⁻¹³.

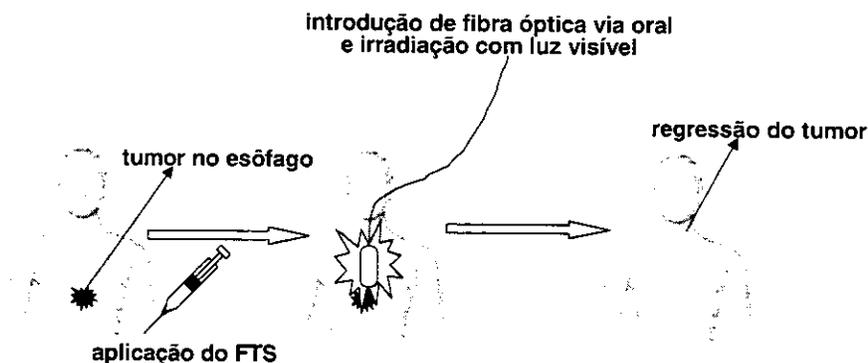


Figura 2. Esquema de tratamento de um tumor com TFD.

A geração de EROs pode ocorrer através de dois mecanismos conhecidos como tipo I e tipo II. Nos dois mecanismos o FTS é excitado pela luz passando do estado singlete fundamental (S_0) para o estado singlete excitado (S_1). A partir deste estado o FTS pode retornar ao estado fundamental S_0 por fluorescência ou, através do cruzamento intersistema, ir para o estado triplete excitado (T_1). A partir deste estado intermediário, o FTS pode liberar energia por fosforescência ou transferir elétrons (mecanismo tipo I) e/ou energia (mecanismo tipo II) para o oxigênio no estado fundamental (3O_2) gerando radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (mecanismo tipo I) e/ou oxigênio singlete (1O_2) (mecanismo tipo II)¹⁴ (Fig. 3).

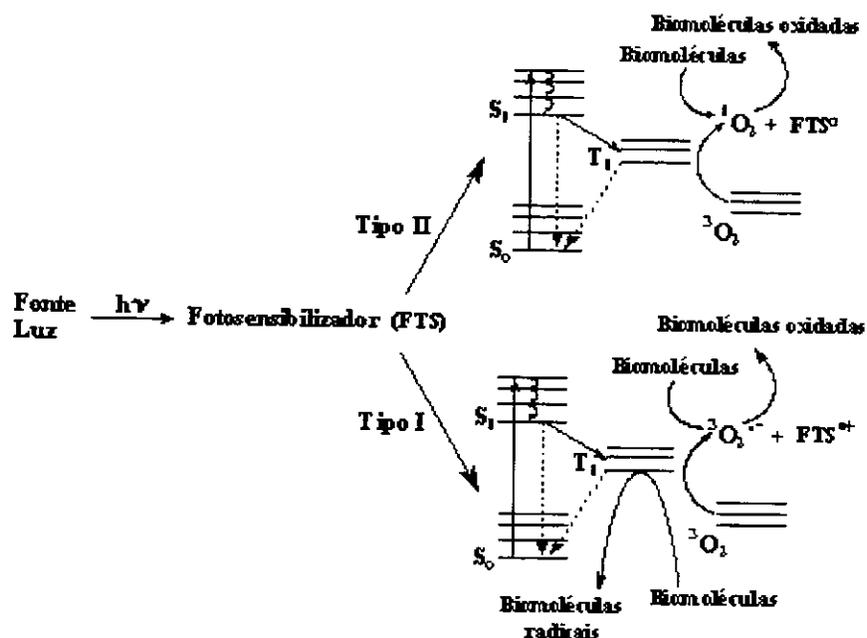


Figura 3. Mecanismos (tipo I e II) de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador (FTS) e oxigênio no estado fundamental (3O_2). O fotossensibilizador no estado singlete fundamental (S_0) é irradiado com luz gerando fotossensibilizador no estado singlete excitado (S_1). O S_1 pode decair para o estado tripleto excitado (T_1) gerando radical superóxido ($^3O_2^{\bullet-}$) (mecanismo tipo I) e/ou oxigênio singlete (1O_2) (mecanismo tipo II). Estas EROs podem causar danos em biomoléculas (ácidos nucleicos, lipídios e proteínas) das células tumorais.

O mecanismo de transferência de energia (tipo II) aparenta ser mais eficiente (constantes de velocidade por volta de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) quando comparado com as constantes de velocidade das reações de transferência de elétrons (tipo I), usualmente abaixo de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esta transferência de energia do estado excitado T_1 do fotossensibilizador para o oxigênio é muito rápida^{15,16,17}, o que explica a predominância do mecanismo tipo II em tratamentos com TFD⁹. O oxigênio singlete produzido neste processo pode reagir com lipídeos insaturados, proteínas e aminoácidos. Estas biomoléculas são as principais constituintes das membranas biológicas, sendo alvos celulares

destruídos na TFD. Portanto, estas reações ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a lise destas células e conseqüentemente a morte do tecido tumoral¹⁸.

1.2.1. A indução da morte de células tumorais pela TFD

A apoptose é um tipo de morte celular comum nos organismos multicelulares. Esse tipo de morte se baseia no suicídio de uma célula quando a mesma já não é mais necessária ao organismo. Isto é muito importante, pois controla o número de células de um indivíduo, impedindo um crescimento celular descontrolado (câncer)⁵.

Antes de uma célula se dividir para dar origem a outra, ocorre a checagem do seu material genético (DNA), para se ter certeza que prováveis mutações não sejam passadas adiante. Nesse processo de checagem, o gene p53 tem um papel crucial. Tal gene comanda um mecanismo que repara o DNA danificado da célula mãe e a libera para que ocorra a divisão. No entanto, se os erros ou mutações no material genético são muito expressivos e o sistema de reparo é incapaz de repará-los, o gene p53 irá acionar um outro mecanismo que induz a célula mãe ao suicídio (apoptose). Isto impede a geração de mais células mutagênicas, o que evita o aparecimento de tumores. Logo, conclui-se que um defeito nesse mecanismo de apoptose pode ser catastrófico para um organismo multicelular⁵.

Em muitos tratamentos com TFD tem se observado que os agentes fotossensibilizadores, depois de excitados pela luz, estimulam a apoptose em células cancerígenas. Muitos desses fotossensibilizadores atuam na

mitocôndria¹⁹. Isto é muito importante, já que essa organela tem um papel fundamental no processo apoptótico^{20,21}. As EROs produzidas na TFD provocam um estresse oxidativo na mitocôndria, fazendo com que a mesma libere, no citosol, proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo *c* e a proteína Smac Diabolo. Tais proteínas ativam um grupo de outras proteínas conhecidas como caspases, que por sua vez induzem a fragmentação do DNA da célula cancerígena, provocando sua morte^{22,23}. Além disto, as espécies reativas de oxigênio, oriundas da TFD, podem inativar proteínas como a Bcl-2, que protegem as células cancerígenas da apoptose²⁴. Relatos destes e outros eventos, provando a ativação da apoptose por tratamentos com TFD, têm sido bem descritos na literatura²⁵⁻³⁷

1.2.2. Fotossensibilizadores

Porfirinas, clorinas e bacterioclorinas (Fig. 4) estão entre os fotossensibilizadores mais estudados para uso em TFD. Entretanto, outras classes de fotossensibilizadores porfirinóides como ftalocianinas e texapirinas também têm sido avaliados. As porfirinas, clorinas e bacterioclorinas possuem absorção máxima na região do vermelho do espectro eletromagnético e são eficientes geradores de 1O_2 . A absorção máxima na região do vermelho permite que a luz penetre mais profundamente no tecido⁹.

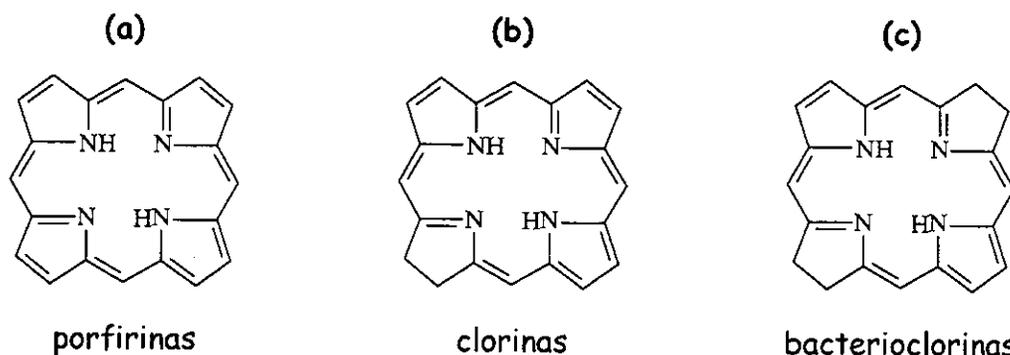


Figura 4. Anéis porfirínicos com 22 (a), 20 (b) e 18 (c) elétrons π respectivamente.

Os compostos porfirínicos são, geralmente, moléculas aromáticas planares compostas por quatro unidades pirrólicas arranjadas simetricamente. Embora texapirinas possuam 3 unidades pirrólicas e ftalocianinas sejam ligadas por pontes azonas, ambas as moléculas são planares e aromáticas e possuem propriedades fotofísicas semelhantes a porfirinas. Por causa do seu extenso sistema aromático, estas moléculas absorvem luz na região do espectro visível³⁸.

Porfirinas possuem uma grande banda de absorção em torno de 400 nm, conhecida como banda de Soret (Figura 5). Esta banda não pode ser aproveitada em TFD, uma vez que a luz com este comprimento de onda não penetra profundamente no tecido. Ao invés disso, utilizam-se bandas de 600 a 800 nm. Tais bandas são chamadas de bandas-Q e as porfirinas exibem uma banda deste tipo em torno de 630 nm enquanto que em clorinas e bacterioclorinas elas aparecem em 650 e 710 nm respectivamente^{9,39}.

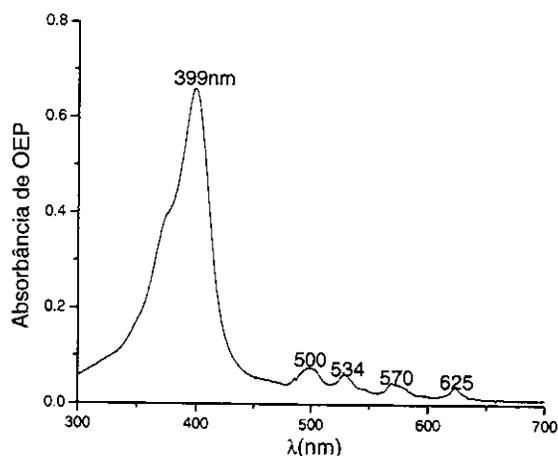


Figura 5. Espectro de absorvância de octaetilporfirina (OEP) apresentando uma banda de grande intensidade (banda de Soret em 399 nm) e quatro bandas menores (bandas Q em 500, 534, 570 e 625 nm).

Os diferentes espectros de absorção entre porfirinas, clorinas e bacterioclorinas podem ser explicados pelo número de elétrons π deslocalizados no anel aromático que se comportam como partículas numa caixa (Fig. 6).

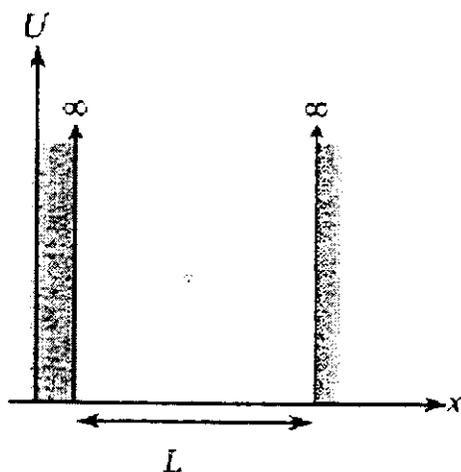


Figura 6. Diagrama descrevendo um elétron em uma região L delimitada por barreiras de energia potencial (U) infinita (partícula na caixa).

A equação 1 apresenta os níveis de energia na caixa, calculados a partir de soluções da equação de Schrodinger. Nesta equação h é a constante de Planck, n é o estado de energia do elétron, m é a massa do elétron e L é a região delimitada da caixa. O termo $E(n,N)$ trata da perturbação ocasionada, nos níveis de energia, decorrente das interações elétron-elétron. Por fim N representa o número de partículas (elétrons) na caixa⁹.

$$E_n = \frac{h^2 (n+1)^2}{8mL^2} + E(n,N) \quad (1)$$

$$n = 0,1,2,3,\dots$$

$$N = 1,2,3,\dots$$

O termo de perturbação $E(n,N)$ é igual a zero se há somente um elétron na caixa, no entanto ele aumenta quando tal número sobe. A equação 1 é uma grande simplificação, mas mesmo assim, ela pode ser utilizada para ilustrar este princípio. O diagrama apresentado na Figura 7 demonstra que os estados de energia acessíveis para elétrons de valência mudam na presença de outros elétrons. Nota-se que a energia requerida para excitar um elétron de um estado de menor energia ($n=0$) para um de maior energia ($n=9$) aumenta, quando o número de elétrons no anel porfirínico cresce. Levando -se em consideração que a energia é proporcional a frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda pode-se então explicar por que os comprimentos de ondas utilizados para excitar porfirinas (com 22 elétrons π) são menores do que os utilizados para excitar clorinas (com 20 elétrons π) e bacterioclorinas (com 18 elétrons π) respectivamente⁹.

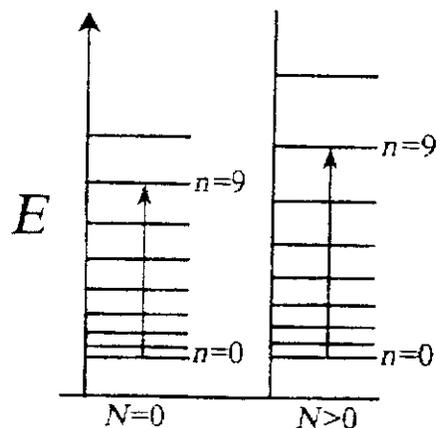


Figura 7. Um diagrama de energia descrevendo a forma como o aumento do número de elétrons π em uma porfirina interfere na energia de transição.

As porfirinas e seus derivados são conhecidos por serem eficientes geradores de oxigênio singlete. A eficiência na produção deste tipo de oxigênio pode ser empiricamente determinada pelo cálculo do rendimento quântico (Φ). Este parâmetro descreve o número de moléculas de oxigênio singlete que são formadas por fóton absorvido pela molécula da porfirina⁹.

1.2.3. Fotossensibilizadores ideais

Um bom FTS tem que ser clinicamente adequado. Para isso deve apresentar baixa toxicidade no escuro, uma certa solubilidade e ser seletivo para o tecido doente, evitando acúmulo em tecidos saudáveis⁴⁰. Além disso, deve ser capaz de penetrar na célula e se acumular em organelas estratégicas como mitocôndria, retículo endoplasmático, lisossomos e complexo de golgi. Estas organelas, principalmente a mitocôndria, possuem papel fundamental na morte celular programada^{11,41}

Outro pré-requisito importante é que o FTS possua um longo tempo de vida no estado triplete. Assim, a geração de EROs será suficiente para que o

tratamento renda bons resultados¹⁰. No entanto, eventos como, formação de agregados (Fig. 8) entre as moléculas do próprio FTS podem prejudicar o processo de geração de EROs, uma vez que ocorrerão decaimentos não radioativos por processos de conversão interna, dificultando a transferência de energia para o $^3\text{O}_2$ ^{39,42,43}.

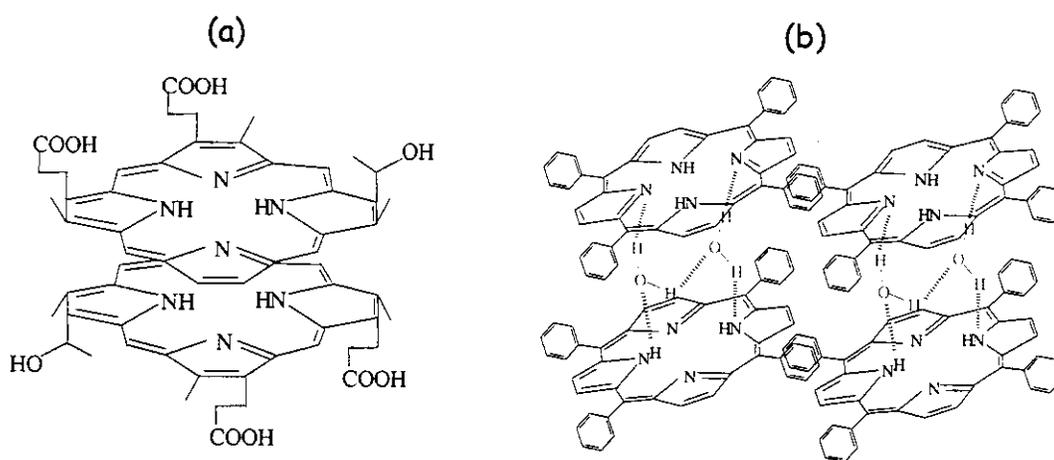


Figura 8. Estrutura de agregados de porfirinas com conformação face a face (a) e interação entre dímeros para formação de oligômeros (b). (Fonte: referência 45).

Outra característica importante de um bom FTS é que o mesmo não sofra foto-degradação (foto-branqueamento) durante o tratamento clínico. O foto-branqueamento é um processo ocasionado pela reação do FTS com o $^1\text{O}_2$ ^{39,44} (Fig. 9). Ele pode ser medido pelo decaimento na intensidade de fluorescência do FTS em presença de luz e oxigênio⁴⁵. Tal evento compromete a produção de EROs fazendo com que doses elevadas do fotossensibilizador tenham que ser administradas para compensar a perda pelo foto-branqueamento. Mas se a velocidade deste foto-branqueamento for lenta e não prejudicar o tratamento, ele passa a ser interessante, uma vez que serve para

eliminar o FTS após a terapia. Isto é importante, já que diminui o tempo que o paciente tem que ficar ao abrigo da luz solar para evitar fotossensibilidade da pele. Foi demonstrado que uma baixa iluminação, ou iluminação controlada pode, de fato, eliminar os efeitos da fotossensibilidade, pós TFD, ocasionada por acúmulo de Photofrin® na pele⁹.

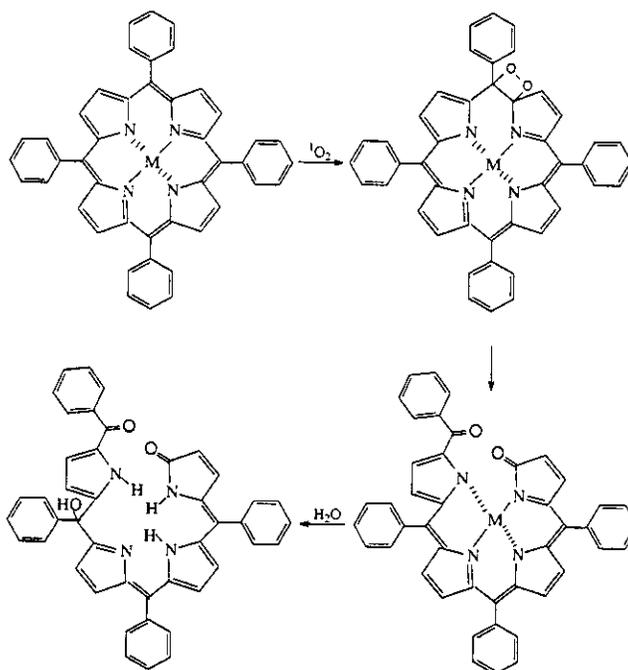


Figura 9. Foto-branqueamento de um composto porfirínico na presença de oxigênio singlete. (Fonte: referência 45).

Para melhorar o efeito fotodinâmico de um FTS, minimizando os problemas de agregação, pouca ou nenhuma solubilidade, foto-branqueamento exagerado, falta de penetração na célula e baixa seletividade, uma das alternativas é promover o encapsulamento destas substâncias em sistemas como: ciclodextrinas⁴⁶, dendrímeros⁴⁷, lipossomas, micro e nanopartículas. Além disso, o encapsulamento protegeria o FTS da biotransformação que o mesmo poderia sofrer durante seu trajeto até o tecido alvo⁴⁸.

1.2.4. Encapsulamento de fotossensibilizadores em lipossomas

Os lipossomas podem ser definidos como associações coloidais de lipídios anfipáticos, que se organizam espontaneamente em estruturas fechadas do tipo concha esférica. Eles podem ser preparados a partir de misturas lipídicas naturais extraídas e purificadas, ou a partir de lipídeos sintéticos, disponíveis comercialmente. Este tipo de micela pode ser classificado em termos de tamanho, número de lamelas, constituição lipídica, estabilidade e modo de preparo⁴⁹. Destas, a classificação baseada em número e tamanho de bicamadas lipídicas, é a mais usada⁵⁰. Assim, podemos ter lipossomas com várias camadas lipídicas (MLV), unilamelares grandes (LUV) e unilamelares pequenas (SUV), além de outras. Tais tipos de estruturas podem ser obtidos inserindo-se um filme lipídico seco em solução aquosa para promover sua hidratação. A posterior agitação leva à formação de estruturas MLV. A extrusão destas estruturas resulta em LUV. Já a sonificação e homogeneização ocasionam a formação de pequenas vesículas do tipo SUV⁵¹ (Fig. 10).

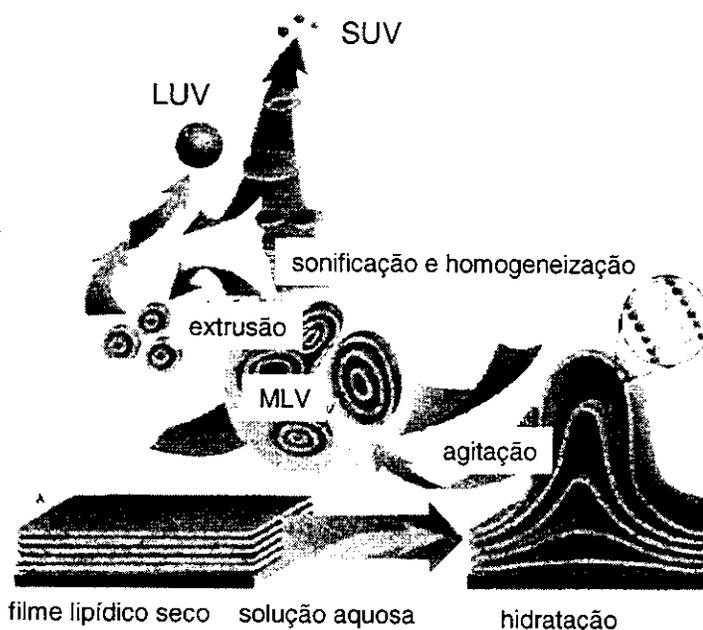


Figura 10. Representação de preparação de lipossomas MLV, SUV e LUV. (Fonte: referência. 52).

Além do número e tamanho das lamelas, um outro fator essencial na caracterização de lipossomas é a constituição de suas bicamadas lipídicas. A composição fosfolipídica, a presença de esteróis, a proporção destes componentes e a inserção de outras moléculas nas bicamadas, como por exemplo colesterol, vão condicionar vários parâmetros da membrana e do próprio lipossoma como: carga, estabilidade, curvatura das bicamadas entre outras⁵².

O primeiro grande passo no estudo de lipossomas veio do trabalho Alec Bangham e colaboradores⁵³. Em 1965, eles caracterizaram um sistema de vesículas fosfolipídicas ao qual, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomas⁵⁴. Após este trabalho, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas. Em 1971, Gregory Gregoriadis⁵⁵ propôs pela primeira vez a utilização de lipossomas como sistema

transportador de fármacos. Na década de 70 e início de 80, houve uma verdadeira euforia pelo potencial de aplicação destas micelas nas indústrias médicas, farmacêuticas e de cosméticos. Atualmente, os lipossomas ainda são largamente utilizados⁵¹.

Os lipossomas são excelentes transportadores de fotossensibilizadores e outros tipos de fármacos. Eles aumentam o potencial terapêutico de um composto, impedindo que este se perca no seu trajeto para um alvo específico, evitando simultaneamente a ocorrência de efeitos secundários nocivos em outras partes do organismo. Alguns trabalhos têm demonstrado que este tipo de encapsulador é ideal para uso em TFD⁴⁸. Seu emprego tem proporcionado excelentes resultados no que diz respeito à melhora da eficiência fotodinâmica de um FTS. Problemas como agregação, foto-branqueamento exagerado e baixa seletividade podem ser minimizados, quando se utiliza um lipossoma como agente encapsulador⁵⁶⁻⁶¹.

1.2.5. A busca por novos fotossensibilizadores

Um dos agentes fototerapêuticos mais empregados para uso clínico é o Photofrin[®]. Este medicamento, cuja constituição é baseada numa mistura de hematoporfirinas, é largamente utilizado no tratamento de uma variedade de tumores tanto nos Estados Unidos quanto na Europa e Japão^{62,63,64}. No Brasil o análogo russo do Photofrin[®], conhecido como Photogen[®], vem sendo utilizado pela equipe do Dr. Guilherme Cestari Filho, médico do Hospital Amaral de Carvalho em Jaú-SP que foi pioneiro na implantação da terapia fotodinâmica no país, e pela equipe da Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza, médica do Hospital

das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP.

Mesmo sendo um medicamento eficiente, o Photofrin[®] apresenta alguns inconvenientes: primeiramente ele requer altas dosagens para a obtenção de uma resposta terapêutica satisfatória o que provoca efeitos colaterais como, por exemplo, aumento da frequência urinária e espasmos da bexiga⁷. Além disso, possui uma baixa seletividade para tecidos tumorais, acumulando-se, também, em tecidos saudáveis. O seu longo tempo de permanência na região cutânea, após o tratamento, faz com que o paciente tenha que ficar ao abrigo da luz natural por um longo período^{65,66}. Estes problemas têm estimulado a busca por novos fotossensibilizadores para uso em TFD.

Dentre os compostos mais pesquisados, encontram-se as bacterioclorinas, clorinas, purpurinas e ftalocianinas. Estas substâncias apresentam a mesma estrutura principal das porfirinas, as quais são caracterizadas pelos quatro anéis pirrólicos⁴⁵ (Fig. 11).

As ftalocianinas, por exemplo, possuem a alta afinidade para tecidos tumorais. Vários complexos de ftalocianinas com elementos de não transição (ex: Zn, Al, Si) têm apresentado boa atividade anti-tumoral. Além das ftalocianinas, o Foscan[®], uma substância da família das *meso*-tetrahidroxifenilporfirinas, também apresenta boa atividade anti tumoral. Esta substância pode ser empregada no combate a diferentes tipos de câncer como esofágico, pulmonar, laríngeo, torácico e de pele¹⁰. Uma outra substância, também conhecida, é a monoaspartil clorina (Npe6). Seu potencial de combate a tumores tem sido investigado contra adenocarcinoma de seios, carcinoma de células basais e escamosas⁶⁷. A Purlitina, por sua vez, é uma clorina, que possui absorção máxima em 650 nm e tem sido avaliada no tratamento de câncer de

seio recorrente⁶⁸ e neovascularização da córnea⁶⁹. O metotrexato, que é um medicamento usado na quimioterapia de vários tumores, tem sido, recentemente, estudado para ser usado também em TFD⁷⁰.

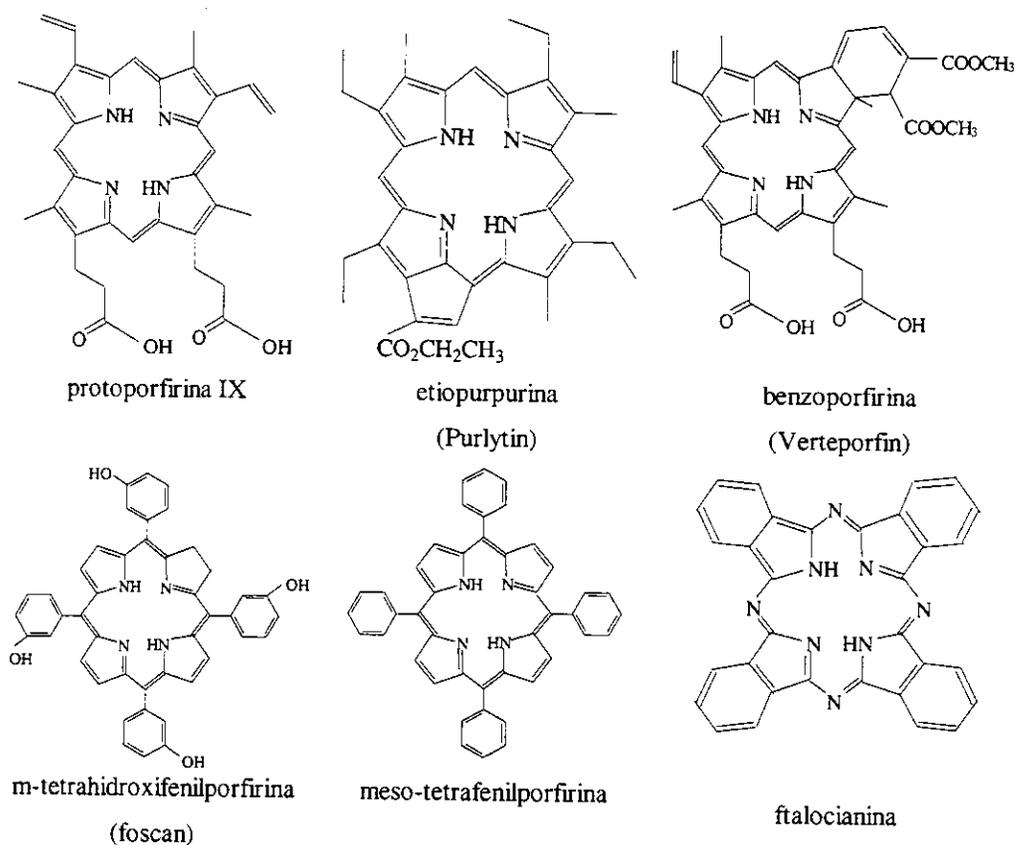


Figura 11. Estrutura de alguns fotossensibilizadores que têm sido avaliados para uso em TFD.

Além das substâncias citadas, compostos naturais e extratos de plantas também têm sido estudados para serem usados em TFD⁷¹. A clorofila e bacterioclorofila são exemplos de compostos naturais que tem sido investigados como possíveis candidatos a fotossensibilizadores. No entanto estas substâncias são muito instáveis, sendo necessárias modificações em suas

estruturas, a fim de torná-las mais adequadas para uso em TFD. A clorofila, por exemplo, pode ser empregada na síntese de clorinas que possuem moderada atividade *in vivo*^{10,72}.

Extratos de plantas também têm sido estudados como fonte de substâncias com potencial fotossensibilizador. Extratos de *Hypericum perforatum*, por exemplo, têm apresentado alta atividade fototóxica⁷³. A mesma atividade tem sido verificada em pigmento verde isolado de *Psychotria acuminata*, uma planta originária de Belize, América Central, que demonstra um promissor potencial fototerapêutico⁷⁴. Mais recentemente, foi verificado, também, que extrato etanólico, de bambu, pode induzir, rapidamente, a morte celular programada (apoptose) de células leucêmicas, na presença de luz e oxigênio. Esta propriedade fototóxica foi atribuída a duas substâncias, presentes no bambu, conhecidas como hidroxipurpurinas⁷⁵.

2. Objetivos

Este trabalho tem os seguintes objetivos: 1) avaliar a atividade fotodinâmica de octaetilporfirina (OEP) e *meso*-tetramesitilporfirina (*m*-TMP) (Fig. 12) através das medidas de parâmetros fotofísicos, foto-oxidação de biomoléculas e foto-destruição de células de eritrócitos, 2) determinar qual o tipo de mecanismo (I ou II) é o predominante nestas reações, 3) promover o encapsulamento das porfirinas em lipossomas objetivando o preparo de formulações para futuras aplicações *in vivo*, 4) comparar a atividade fotodinâmica das porfirinas encapsuladas com as porfirinas livres e 5) avaliar a influência do grupo vanadil (V=O) na atividade fotodinâmica de OEP (Fig. 12).

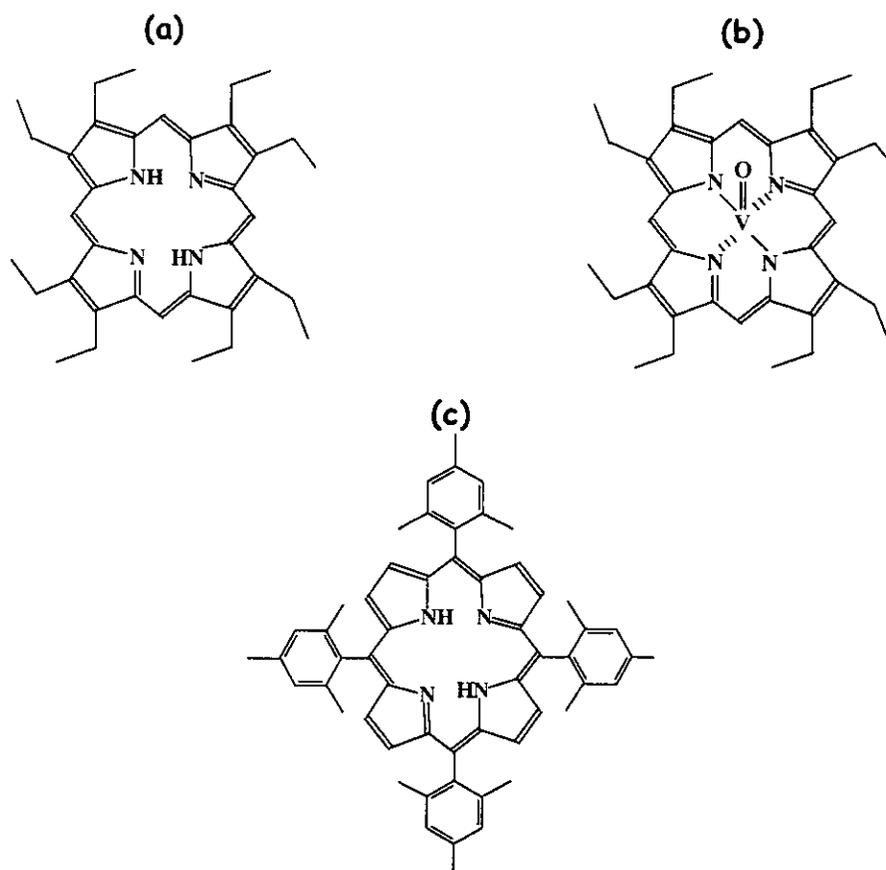


Figura 12. Estruturas de OEP (a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c).

3. Materiais e métodos

3.1. Materiais

As porfirinas *m*-TMP, OEP e VOOEP foram obtidas da Porphyrin Product, Inc. (Logan Utah, USA). A proteína albumina bovina (BSA), o aminoácido triptofano (Trp), o surfactante polioxietilenosorbitan monolaurato (Tween 20[®]), a L-histidina, o colesterol e os fosfolipídios do tipo dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). O NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ e a azida de sódio (NaN₃) foram

obtidos da Merck (Darmstald, Alemanha). Os solventes acetato de etila, clorofórmio e tetrahidrofurano (THF) foram obtidos da Synth (Diadema, Brasil). A água deuterada (D₂O) foi obtida da Aldrich Chemical Company, Inc (Milwaukee, USA). O sangue humano foi doado pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Com exceção das medidas de parâmetros fotofísicos, realizadas na USP de Ribeirão Preto-SP, as demais medidas foram realizadas, utilizando-se os seguintes equipamentos: lâmpada de mercúrio Philips HPLN 80W com filtro para bloqueio das emissões abaixo de 400 nm e acima de 600 nm, espectrofotômetro UV/Vis Hewlett Packard modelo 8453, espectrofluorímetro da marca Perkin Elmer modelo LS55, balança analítica Mettler AE200, microbalança Perkin Elmer AD-6, banho de ultra-som modelo 8890R-MT Cole-Parmer (Vernon Hills, USA), centrífugas NT-811 (Nova Técnica) e Revan 14000D (Revan Instrumentos Científicos).

3.2. Métodos

3.2.1. Medidas de parâmetros fotofísicos

As medidas de parâmetros fotofísicos foram realizadas no Laboratório de Fotoquímica e Fotobiologia do Departamento de Química da USP de Ribeirão Preto-SP.

Os espectros de absorvância e fluorescência foram obtidos de amostras contendo 10 μ M de OEP, VOOEP ou *m*-TMP dissolvidos em clorofórmio. As medidas de absorvância foram realizadas no intervalo entre 300-800 nm utilizando-se um espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 20. Os

espectros de fluorescência foram obtidos no intervalo entre 500-600 nm excitando-se OEP, VOOEP e *m*-TMP em 398, 408 e 418 nm respectivamente. Para isso utilizou-se um espectrofluorímetro Ivon Jobin Fluorolog 3.

Para medida do tempo de vida de fluorescência foi utilizada uma técnica conhecida como contagem simples de fótons correlacionada com o tempo ou "Time-correlated single-photon counting" (TCSPC)⁷⁶. O instrumento para este tipo de medida é compreendido por um laser Nd:YAG (Antares coherent 764) de duplo feixe que é direcionado para dentro de uma cavidade contendo a porfirina e rodoamina. Este instrumento produz pulsos de 3,8 MHz com uma força média de 1040 mW na escala de 500-800 nm. A emissão de fluorescência foi coletada em 90 segundos e o melhor comprimento de onda, de emissão, foi selecionado por um monocromador. Uma placa microcanal (Hamamatsu 1564-UO1) foi usada para detectar a emissão de fluorescência, junto com discriminadores do padrão, conversor de tempo em amplitude e um analisador multi-canal (Canberra 35). Os decaimentos foram medidos na intensidade máxima, com um mínimo de 20000 contagens na canaleta⁷⁶.

As medidas dos transientes e tempos de vida do estado triplete foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro de laser flash photolysis, que permitiu a captação simultânea do espectro de absorção do transiente (200-800 nm) e da cinética do transiente em um único comprimento de onda⁷⁷. Este sistema utiliza o terceiro harmônico (355 nm) de um laser Nd-YAG. O comprimento do pulso foi de 8ns, o diâmetro do feixe incidente foi de 6 mm e a taxa de repetição foi de 10 Hertz. A energia do pulso foi de 30 mJ por pulso, medida por um medidor de força de L-30V. Foi usada uma lâmpada de tungstênio-halogênio de 400 W como prova. Um feixe de lâmpada colimado

(1 mm de diâmetro) passou através da amostra presente em uma cubeta de 1 cm de tamanho. A cinética de decaimento foi medida em um único comprimento de onda usando um monocromador (Bentham M300) em um fotomultiplicador (Hamamatsu, R928P). A queda do transiente foi medida com um osciloscópio digital Tetronix TDS 340A. A análise dos resultados foi feita num software fornecido pela empresa Edimburg Instruments.

As medidas de rendimento quântico de oxigênio singlete foram realizadas baseando-se na determinação direta pela medida de luminescência do oxigênio singlete em 1200 nm. O instrumento usado neste procedimento foi o mesmo descrito para medidas de estado triplete, com pequenas mudanças. O laser de excitação foi o mesmo. Entretanto, um detector que opera em um sistema refrigerado com nitrogênio substituiu o fotomultiplicador. O sinal foi transferido ao mesmo osciloscópio digital e a análise foi realizada no software fornecido pela Edimburg Instruments. Um filtro de silicone foi usado para evitar que o sinal de fluorescência interferisse na luminescência do oxigênio singlete.

3.2.2. Foto-oxidação de biomoléculas

Soluções aquosas contendo 50 μM do aminoácido triptofano (Trp) ou 10 μM da proteína albumina bovina (BSA), foram preparadas em tampão fosfato salino (PBS: 0,15 M de NaCl, 1,9 mM NaH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4) além de surfactante Tween 20[®] 0,6% (m/v) e solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para m-TMP). Estas soluções foram saturadas com oxigênio e irradiadas com lâmpada de mercúrio

(filtro de 400-600 nm) a 5 cm de distância durante 60 minutos. As fluorescências de Trp e BSA foram obtidas através da excitação destas biomoléculas em 280 nm. Esta fluorescência foi monitorada em intervalos de 10 minutos para se determinar a constante de velocidade de foto-oxidação (k_f) de Trp e BSA, na presença de oxigênio, luz e porfirinas. A equação utilizada para se determinar k_f foi:

$$\ln (F/F_0) = -k_f t \quad (2)$$

onde F_0 = fluorescência inicial de Trp em 360 nm e BSA em 330 nm, F = fluorescência de Trp e BSA no tempo t , k_f = constante de velocidade de foto-oxidação de Trp e BSA.

3.2.3. Avaliação da foto-degradação

Soluções aquosas contendo 10 μ M de OEP, VOOEP ou *m*-TMP, foram preparadas em tampão PBS pH 7,4 contendo Tween 20[®] 0,6% (m/v) e solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP). Estas soluções foram saturadas com oxigênio e irradiadas com lâmpada de mercúrio (filtro de 400-600 nm) a 5cm de distância durante 60 minutos. Os espectros de fluorescência de OEP, VOOEP e *m*-TMP foram obtidos através da excitação destas porfirinas em 398, 408 e 418 nm respectivamente. Estas fluorescências foram monitoradas durante 60 minutos com leitura em intervalos de 10 minutos. Este procedimento foi realizado com o objetivo de se verificar a possível ocorrência de foto-degradação, das

porfirinas, durante o experimento de foto-oxidação de biomoléculas e foto-destruição celular. Para verificar a ocorrência de foto-degradação num período mais longo, as porfirinas foram exposta à luz natural e temperatura ambiente durante 10 dias e seus espectros de fluorescência foram obtidos em intervalos de um dia.

3.2.4. Determinação da constante de dimerização

Foram medidas as fluorescências de diferentes concentrações de OEP e *m*-TMP presentes em soluções aquosas contendo tampão PBS pH 7,4, Tween 20[®] 0,6% (m/v) e solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e acetato de etila para *m*-TMP). A finalidade deste procedimento foi verificar se as porfirinas tinham tendência a formar agregados, devido ao aumento de suas concentrações.

Considerando-se que os agregados são dímeros das porfirinas, pode-se determinar a constante de equilíbrio de dimerização (k_D), utilizando-se o modelo de Margalit⁷⁸. Neste modelo, duas considerações precisam ser feitas para se obter k_D : 1) em baixas concentrações, a dimerização é o processo de agregação dominante; 2) entre monômeros e dímeros, presentes em solução, somente os monômeros fluorescem. Dessa forma, pode-se representar o processo de dimerização como:



$$[T] = [M] + 2 \cdot [D] \quad (4)$$

onde $[M]$ é a concentração da porfirina na forma de monômero, $[D]$ é a concentração da porfirina na forma de dímero, k_D é a constante de equilíbrio de dimerização e $[T]$ é a concentração total da porfirina.

A partir da equação (3) e (4), obtém-se a seguinte expressão:

$$[T] / [M] = 2.k_D.[M] + 1 \quad (5)$$

Como $[M]$ é proporcional à fluorescência medida, isto é: $F = \alpha.[M]$, onde α é uma constante de proporcionalidade e F é a fluorescência, substituindo $[M]$ na equação (5), pode-se chegar à seguinte expressão:

$$[T] / F = 2.k_D.\alpha^{-2}.F + \alpha^{-1} \quad (6)$$

Assim, através da inclinação e da interseção do gráfico $[T]/F$ contra F , pode-se obter o valor de K_D .

3.2.5. Determinação do mecanismo de foto-oxidação de biomoléculas

Soluções aquosas contendo 10 μM de OEP, VOOEP ou *m*-TMP e 50 μM de Trp foram preparadas em tampão PBS pH 7,4 contendo o surfactante Tween 20[®] 0,6% (m/v) e solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP). Estas soluções foram saturadas com oxigênio e irradiadas com lâmpada de mercúrio (filtro de 400-600 nm) a 5cm de distância durante 60 minutos na presença de diferentes concentrações

de NaN_3 e porcentagens de D_2O . Este procedimento teve como finalidade, verificar a influência de NaN_3 e D_2O nos valores de k_f e, através disso, determinar qual mecanismo (I ou II) está envolvido na foto-oxidação de biomoléculas.

3.2.6. Influência de Tween 20[®] e solvente orgânico na hemólise de eritrócitos

Para verificar a influência do surfactante Tween 20[®] e dos solventes orgânicos na destruição (hemólise) de células vermelhas de sangue humano (eritrócitos), foram preparadas amostras contendo 0,5% de eritrócitos (v/v), tampão PBS pH 7,4, diferentes porcentagens de Tween 20[®] (m/v) ou acetato de etila (v/v) ou tetrahidrofurano (v/v). Tais amostras foram saturadas com $^3\text{O}_2$ e irradiadas com lâmpada de mercúrio (filtro de 400-600 nm) a 5 cm de distância durante 60 minutos. A quantificação da hemólise foi realizada a cada 10 minutos, através da leitura de absorvância (em 542 nm) da oxihemoglobina liberada, por células hemolisadas, no meio de reação. Para o cálculo da porcentagem de hemólise das células, foi utilizada a seguinte equação:

$$A_{\text{Hemólise}, 542\text{nm}} = A_{\text{Amostra}, 542\text{nm}} - A_{\text{Branco}, 542\text{nm}} \quad (7)$$

onde $A_{\text{Hemólise}}$ é a absorvância da oxihemoglobina, A_{Amostra} é a absorvância total da amostra e A_{Branco} é a absorvância do branco. O branco continha todos os componentes da amostra, com exceção do surfactante e dos solventes orgânicos.

A concentração de eritrócitos hemolisados foi obtida através da Lei de

Lambert-Beer⁷⁹:

$$A_{\text{Hemólise, 542nm}} = \varepsilon.b.c \quad (8)$$

onde: ε = coeficiente de hemólise $[(\text{cm}\%)^{-1}]$, b = caminho ótico (0,5 cm) e c = concentração de eritrócitos hemolisados [% (v/v)].

O coeficiente de hemólise foi obtido utilizando-se a equação 8, medindo-se a absorbância da oxihemoglobina de uma solução contendo 0,5% (v/v) de eritrócitos em PBS pH 7,4, Tween[®] 20 ou solvente orgânico. Esta solução foi previamente submetida a um banho de ultra-som durante 10 minutos com o objetivo de se obter 100% de hemólise dos eritrócitos.

Conhecendo-se a concentração de 100% de eritrócitos hemolisados foi possível determinar a porcentagem de eritrócitos hemolisados, nas amostras, conforme equação 9:

$$\% \text{ hemólise} = (c \times 100) / 0,5 \quad (9)$$

onde c = concentração de eritrócitos hemolisados, nas amostras, dada em % e 0,5 = concentração inicial de eritrócitos não hemolisados, em % (v/v).

3.2.7. Foto-destruição de eritrócitos

Para verificar a foto-destruição ou hemólise de eritrócitos, devido a presença das porfirinas, foram preparadas amostras contendo 0,5% (v/v) de eritrócitos, tampão PBS pH 7,4, Tween 20[®] 0,1% (m/v), solvente orgânico

0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e diferentes concentrações das porfirinas. Tais amostras foram saturadas com $^3\text{O}_2$ e irradiadas com lâmpada de mercúrio (filtro de 400-600 nm) a 5 cm de distância durante 60 minutos. A quantificação da hemólise foi realizada como no item 3.2.6. No entanto, na equação 7 foi adicionado o termo que trata da absorvância das porfirinas ($A_{\text{porfirinas}, 542\text{nm}}$), obtendo-se então a seguinte equação:

$$A_{\text{Hemólise}, 542\text{nm}} = A_{\text{Amostra}, 542\text{nm}} - A_{\text{Branco}, 542\text{nm}} - A_{\text{porfirina}, 542\text{nm}} \quad (10)$$

onde $A_{\text{Hemólise}}$ é a absorvância da oxihemoglobina, A_{Amostra} é a absorvância total da amostra e A_{Branco} é a absorvância do branco. Este branco continha todos os componentes da amostra, com exceção das porfirinas. A solução onde se obteve a absorvância de OEP, VOOEP ou *m*-TMP ($A_{\text{porfirina}}$) continha todos os componentes da amostra, com exceção dos eritrócitos.

Foi realizado, também, um ensaio toxicológico, para verificar se as porfirinas induziriam hemólise na ausência de luz.

3.2.8. Determinação do mecanismo de foto-destruição de eritrócitos

Para verificar qual foi o mecanismo predominante, na foto-destruição de eritrócitos, foram preparadas amostras contendo 0,5% (v/v) de eritrócitos, tampão PBS pH 7,4, Tween 20[®] 0,1% (m/v), solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP), 10 μM de *m*-TMP ou OEP ou VOOEP, além de diferentes porcentagens de D_2O

(substância que aumenta o tempo de vida de oxigênio singlete) e diferentes concentrações de manitol (supressor de radical hidroxila), NaN_3 e L-histidina (supressores de oxigênio singlete). As amostras foram saturadas com oxigênio e irradiadas com lâmpada de mercúrio (usando um filtro de 400-600 nm) a 5cm de distância durante 60 minutos. A quantificação da foto-destruição foi realizada como no item 3.2.7.

3.2.9. Fluorescência das porfirinas em função da concentração de lipossomas

Para preparo das vesículas lipossomais vazias (sem porfirinas), 15 mg de fosfolipídios do tipo dimeristoil fosfatidilcolina (DMPC) foram solubilizados em 5 mL de clorofórmio. Esta solução foi transferida para um balão de fundo redondo. O solvente foi evaporado neste mesmo balão, fixado num rotaevaporador (Buchi, modelo 461), à 45°C, em rotação bastante lenta, por 2 h. Com este procedimento obteve-se um filme seco de lipídios. Em seguida, este filme foi hidratado com uma solução de tampão PBS pH 7,4 sob agitação vigorosa à 45°C por 6 h. A solução foi transferida para um balão volumétrico e completou-se o volume para 5mL com tampão PBS pH 7,4. A suspensão foi então transferida para um pequeno frasco de vidro e colocada no banho de ultra-som por 40 minutos para diminuir o tamanho das vesículas. Para uniformizar este tamanho foi realizada uma extrusão numa extrusora Avanti Polar Lipids, Inc. com membranas contendo poros de 50 nm. Em seguida preparou-se uma solução aquosa contendo, acetato de etila ou tetrahidrofurano 0,25% (v/v), 10 μM de OEP ou VOOEP ou *m*-TMP, além de tampão PBS pH 7,4. A estas soluções, colocadas em banho-maria à 45°C,

adicionaram-se diferentes concentrações das vesículas lipossomais. Em seguida obteve-se os espectros de fluorescência das porfirinas excitando-as em seus comprimentos de onda de absorção máxima. Este procedimento teve como finalidade verificar se os espectros de fluorescência de OEP, VOOEP e *m*-TMP aumentavam de intensidade na presença de concentrações crescentes de lipossoma, o que indicaria a interação das porfirinas com as vesículas lipossomais.

3.2.10. Determinação da concentração de porfirina encapsulada pelos lipossomas

Para encapsulamento dos fotossensibilizadores os lipossomas foram preparados como descrito no item 3.2.9. No entanto, desta vez, o clorofórmio, utilizado para solubilizar os fosfolipídios, continha 10 μM de uma das porfirinas (OEP ou VOOEP ou *m*-TMP). Para se determinar a porcentagem de fotossensibilizador, incorporado em lipossoma, utilizou-se de um sistema bifásico composto de 1 mL da solução aquosa (contendo porfirina e vesículas lipossomais) e 1 mL de octanol. Este sistema foi agitado manualmente com o objetivo de se fazer com que a porfirina não incorporada migrasse para o octanol. Após deixar o sistema em repouso por 10 minutos, obteve-se a absorbância da porfirina presente no octanol. Através de uma curva padrão, de absorbância da porfirina em função de sua concentração no octanol, foi possível conhecer a concentração da porfirina, não incorporada nas vesículas lipossomais. Assim, diminuindo-se esta concentração da concentração total de porfirina utilizada no processo de encapsulamento, foi possível descobrir qual a porcentagem de porfirina incorporada nas vesículas lipossomais.

3.2.11. Determinação da constante de supressão de fluorescência

Geralmente compostos hidrofóbicos, quando encapsulados em lipossomas, tendem a se localizarem na região hidrofóbica das cadeias dos fosfolípidios, ou seja, evitando o meio exterior e o interior da cavidade, do lipossoma, que são polares. Para verificar se isso ocorreu, ou seja, se OEP, VOOEP e *m*-TMP fixaram-se entre as cadeias apolares dos fosfolípidios, os mesmos foram encapsulados em lipossomas, como descrito no item 3.2.10. Em seguida, nas soluções contendo porfirina e vesículas lipossomais, foi adicionado iodeto de potássio em concentrações que variaram de 0 a 0,20 mol/L. O iodeto suprime a fluorescência da porfirina que não foi encapsulada pelo lipossoma, ou seja, que estiver presente meio aquoso externo. Os espectros de emissão, das porfirinas, foram tratados com a equação de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + k_s \cdot [I^-] \quad (11)$$

onde F_0 = fluorescência, do fotossensibilizador, na ausência do supressor iodeto, F = fluorescência, do fotossensibilizador, na presença de concentrações crescentes de I^- , k_s = constante de supressão e $[I^-]$ = concentração do supressor. Quanto maior for o valor de k_s , maior será a concentração de moléculas porfirínicas não incorporadas pelas vesículas lipossomais.

3.2.12. Foto-destruição de eritrócitos na presença e ausência de lipossomas

Neste procedimento, o encapsulamento das porfirinas e a determinação de suas concentrações, nas vesículas lipossomais, foram realizados como

descrito no item 3.2.10. Posteriormente saturou-se a formulação com oxigênio. A estas formulações foi adicionado 0,5% de eritrócitos sob leve agitação manual. Em seguida esta solução foi deixada em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente irradiada com lâmpada de mercúrio (filtro de 400- 600 nm) durante 60 minutos. A quantificação da hemólise foi realizada como no item 3.2.7. Para efeito de comparação, foram irradiadas soluções contendo 0,5% de eritrócitos (v/v), tampão PBS pH 7,4, Tween 20® 0,1% (m/v), solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahidrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e 10 μ M de OEP, VOOEP ou *m*-TMP na forma não encapsulada. O cálculo da % de hemólise foi realizado como no item 3.2.7.

3.2.13. Determinação da constante de dimerização na presença de lipossoma

Este procedimento teve como objetivo, verificar se a presença de vesículas lipossomais provocou a diminuição da formação de agregados por parte das porfirinas. Para isso prepararam-se soluções contendo 1mM de vesículas lipossomais, na ausência de porfirinas, como descrito no item 3.2.9. Em seguida estas soluções foram colocadas em banho-maria à 45°C e adicionaram-se, às mesmas, diferentes concentrações de OEP, VOOEP ou *m*-TMP, presentes numa solução aquosa contendo tampão PBS pH 7,4 e solvente orgânico 0,25% (tetrahidrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP). As soluções contendo vesículas lipossomais e porfirinas permaneceram no banho-maria por 1 h. Posteriormente obtiveram-se os espectros de fluorescência das porfirinas presentes nestas soluções. A constante de

dimerização das porfirinas foi obtida como descrito no item 3.2.4.

3.2.14. Verificação da estabilidade das vesículas lipossomais na presença e ausência de colesterol

O objetivo deste procedimento foi verificar se, na presença de colesterol, a formulação contendo porfirina encapsulada em lipossoma, apresentava uma maior estabilidade. Para encapsulamento dos fotossensibilizadores os lipossomas foram preparados como descrito no item 3.2.9. No entanto, desta vez, o clorofórmio, utilizado para solubilizar os fosfolipídios, continha 10 μM de uma das porfirinas (OEP ou VOOEP ou *m*-TMP) além de 5% de colesterol. Preparou-se, também, uma formulação sem a presença de colesterol. Em seguida, as formulações foram acondicionadas a 4°C na ausência de luz. Para verificação da estabilidade destas formulações, as absorbâncias das porfirinas encapsuladas foram obtidas a cada 24 horas durante um período de 10 dias.

4. Resultados e discussão

4.1. Medidas de parâmetros fotofísicos

As Figuras 13 e 14 apresentam, respectivamente, os espectros de absorbância e fluorescência das três porfirinas.

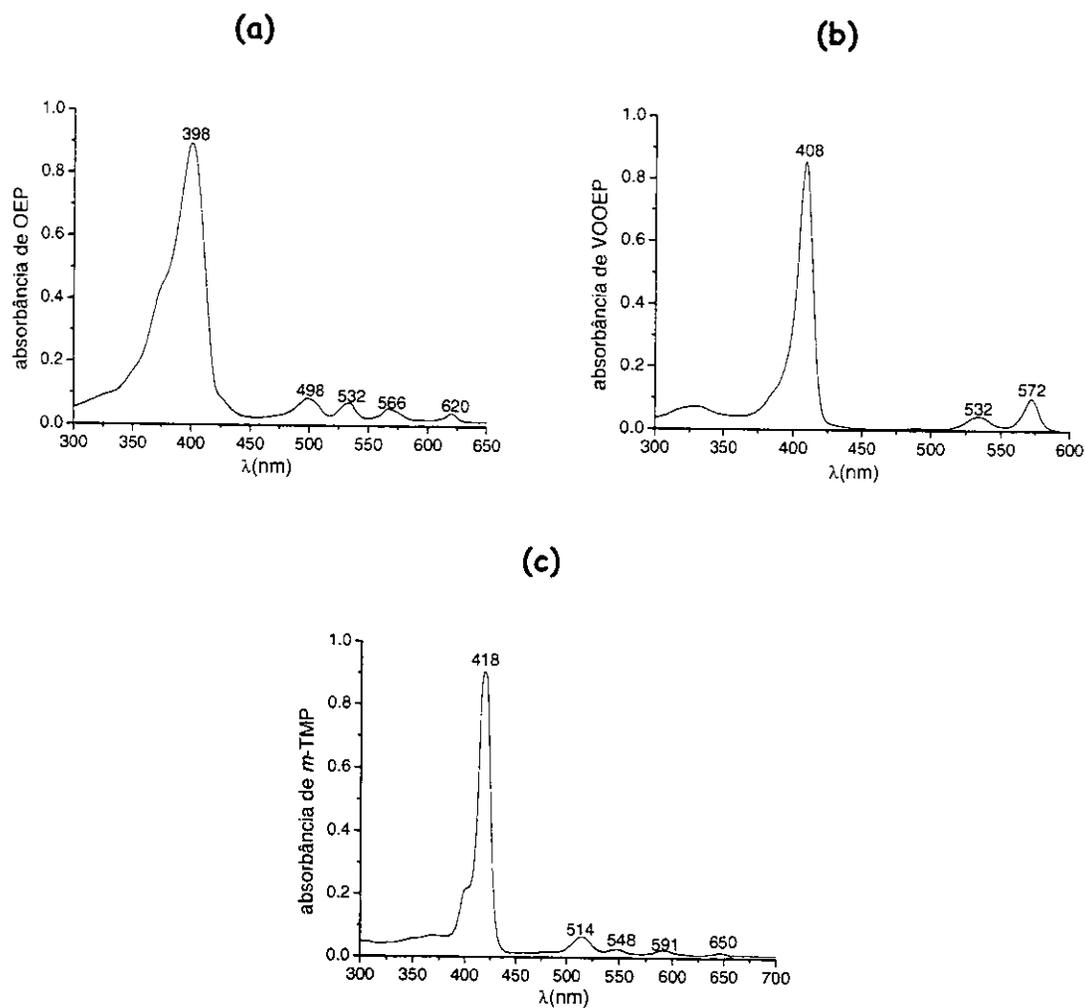


Figura 13. Espectros de absorvância de 10 μ M de OEP (a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c) em clorofórmio com caminho ótico 0,5 cm e a 28°C.

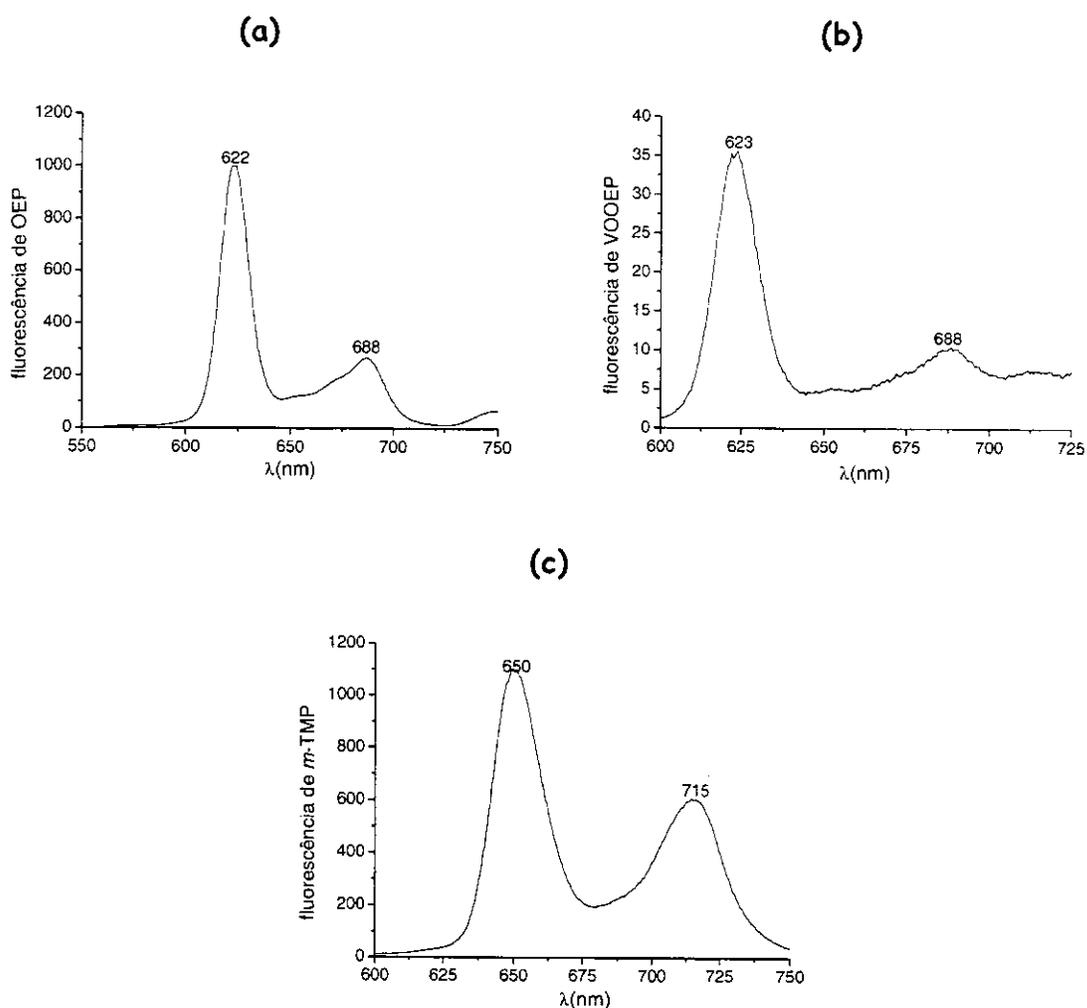


Figura 14. Espectros de fluorescência de 10 μM de OEP (a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c) em clorofórmio com ótico 0,5 cm a 28°C.

A obtenção destes espectros foi necessária para a realização de importantes estudos como foto-degradação e agregação das porfirinas. Os espectros de absorção (Fig. 13) mostram a presença clássica de uma banda de grande intensidade denominada banda de Soret (entre 350 e 450 nm). Esta banda é decorrente da existência de um grupo de dez transições eletrônicas com diferentes spins e momentos dipolos variados⁸⁰. Pode-se observar, também, a presença de outras bandas, de intensidades menores, denominadas

bandas Q. OEP e *m*-TMP, em contraste com VOOEP, apresentam quatro bandas Q, ao passo que VOOEP apresenta apenas duas. Estas bandas Q são referentes aos níveis vibracionais do primeiro e segundo estado eletronicamente excitado⁸⁰. As porfirinas não metaladas, ao contrário das metaladas, apresentam distorções na sua estrutura principal, ou seja, no conjunto dos anéis pirrólicos, ocasionando uma diferença de 25 a 29 KJ.mol⁻¹ entre os níveis de energia, e conseqüentemente, o aumento do número de bandas Q⁸¹.

As porfirinas com metais ou grupos paramagnéticos, como é o caso do V=O, podem exibir, além das bandas de Soret e Q, uma outra banda em torno de 320 nm⁸². No caso de VOOEP, nota-se uma banda desta natureza, em 325 nm (Fig. 13).

As bandas de Soret foram utilizadas para se excitar as porfirinas, com a finalidade de se produzir espécies reativas de oxigênio, nos ensaios de foto-oxidação de biomoléculas e foto-destruição de células de eritrócitos realizados *in vitro*. No entanto, deve-se ressaltar que existe uma certa dificuldade em se utilizar esta banda em *in vivo*. Isto se deve à presença de certas substâncias no organismo como, por exemplo, a hemoglobina, que absorvem na mesma região da banda de Soret, criando uma competição entre as porfirinas e a hemoglobina. Isto dificulta a absorção de luz pelas primeiras e reduz a eficácia da TFD. As bandas Q melhor localizadas na região do vermelho, na chamada "janela fototerapêutica" (entre 600 a 800 nm), podem ser melhor aproveitadas em TFD. A vantagem de utilização destas bandas, para se excitar a porfirina, reside no fato de que a competição entre a porfirina e a hemoglobina pode ser reduzida, o que resulta num aumento da eficácia do tratamento⁸³. No caso das substâncias aqui estudadas, pode-se notar que OEP

e *m*-TMP possuem uma banda Q na janela fototerapêutica (620 nm para OEP e 650 nm para *m*-TMP). Estas bandas podem parecer irrelevantes devido a baixa intensidade, no entanto, deve-se ressaltar que o Photofrin[®] também possui uma banda de baixa intensidade em 630 nm, que é a principal banda explorada em TFD⁹. VOOEP, por sua vez, não possui bandas de absorção na região da janela fototerapêutica.

Os espectros de fluorescência de OEP, VOOEP e *m*-TMP são mostrados na Figura 14. Pode-se notar que a emissão máxima ocorre em 622, 623 e 650 nm para OEP, VOOEP e *m*-TMP respectivamente. Tais espectros foram utilizados para estudos de agregação, foto-degradação e encapsulamento de OEP, VOOEP e *m*-TMP.

Os dados relativos a tempo de vida de fluorescência, tempo de vida no estado tripleto, rendimento quântico de oxigênio singleto, bem como outros parâmetros fotofísicos, estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros fotofísicos de OEP, VOOEP e *m*-TMP. I = fluorescência máxima τ_T = tempo de vida no estado tripleto excitado, τ_f = tempo de vida de fluorescência Φ_Δ = rendimento quântico de oxigênio singleto. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral

Porfirinas	Bandas de absorção/nm	I / nm	$\tau_T/\mu\text{s}$	τ_f/ns	Φ_Δ
OEP	398, 498, 532, 566 e 620	622 e 688	$0,91 \pm 0,02$	$10,2 \pm 1,0$	$0,64 \pm 0,02$
VOOEP	408, 532 e 572	623 e 688	$0,22 \pm 0,03$	-----	$0,26 \pm 0,02$
<i>m</i> -TMP	418, 514, 548, 591 e 650	650 e 715	-----	-----	-----

O tempo de vida de fluorescência de VOOEP não pôde ser detectado, uma vez que a intensidade de sua fluorescência é muito pequena (Fig. 14). Na verdade é esperado que porfirinas que possuem metais ou grupos paramagnéticos como o V=O, em sua estrutura, exibam pouca fluorescência. Isto porque os elétrons dos anéis pirrólicos da porfirina, ao serem excitados para níveis de maior energia (transição $\pi-\pi^*$), podem ser transferidos para os orbitais d incompletos do ligante paramagnético. Esta transferência reduz a transição dos elétrons do estado singlete excitado para o estado singlete fundamental, conseqüentemente reduzindo a fluorescência⁸².

No caso de OEP, o tempo de vida de fluorescência foi de 10,2 ns. Este dado juntamente com o espectro de emissão, apresentado na Figura 14, completa a análise do estado singlete excitado de OEP. Pode-se concluir então que, quando excitado pela luz, OEP retorna, do estado singlete excitado para o estado fundamental, por vias também radioativas (emissão de fluorescência). Este resultado é interessante em termos de aplicação clínica, já que sugere que OEP poderia ser empregado em fotodiagnóstico de tumores. Neste procedimento, a fluorescência de OEP poderia indicar a localização do tecido tumoral. Isto não seria possível com VOOEP uma vez que esta molécula apresenta baixa intensidade de emissão, levando a concluir que a presença do grupo vanadil (V=O) provoca um decréscimo considerável na intensidade de fluorescência de OEP.

O decaimento do estado triplete excitado de OEP foi estudado no seu comprimento de onda de absorção máxima (407 nm) apresentado pelo seu transiente (Fig. 15). Verifica-se que OEP tem um tempo de vida no estado triplete ($\tau_T= 0,91 \mu s$) 4,3 vezes maior do que VOOEP ($\tau_T= 0,22 \mu s$) (Tab. 1).

Estes dados demonstram que o grupo V=O diminui consideravelmente o tempo de vida de OEP no estado triplete. Por causa de seu longo tempo de vida neste estado, OEP tem uma maior possibilidade de interagir com o oxigênio, no estado fundamental, para gerar espécies reativas de oxigênio em tratamentos com TFD.

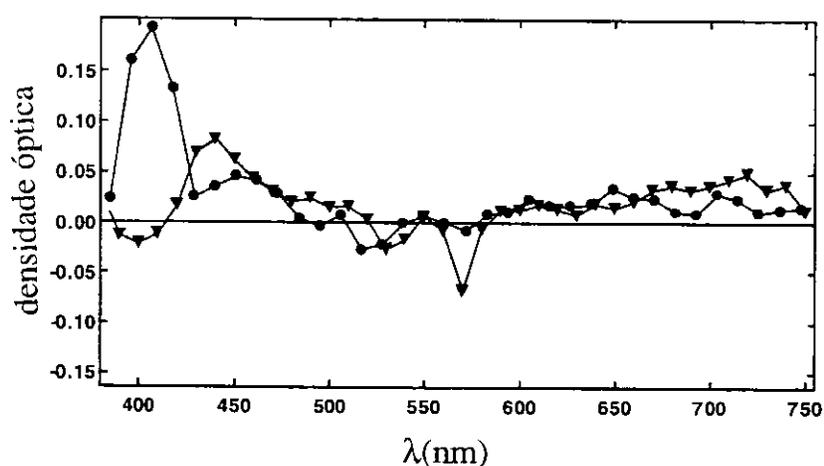


Figura 15. Espectro de absorvância do transiente de VOOEP (\blacktriangledown) e OEP (\bullet) obtido em clorofórmio.

O valor de rendimento quântico de oxigênio singlete encontrado para OEP ($\phi_{\Delta} = 0,64$) é 2,5 vezes maior do que o observado para VOOEP ($\phi_{\Delta} = 0,26$) (Tab. 1). Estes dados concordam com os encontrados para o tempo de vida no estado triplete e mostram que o grupo vanadil reduz a capacidade de OEP de produzir espécies reativas de oxigênio. Isto ocorre, porque a transferência de elétrons dos anéis pirrólicos da porfirina, para os orbitais d incompletos do V=O, reduz, não somente a fluorescência, mas também a ocorrência de cruzamento intersistema na porfirina. Tal evento diminui a população de porfirinas no estado triplete excitado, o que causa uma redução considerável

do rendimento quântico de oxigênio singlete⁸². Tal observação pôde ser comprovada através dos resultados obtidos nos estudos de foto-oxidação de biomoléculas e foto-destruição de eritrócitos, que serão descritos nas próximas seções.

Quanto aos parâmetros fotofísicos de *m*-TMP, a maioria não pôde ser medida, uma vez que, na presença do laser Nd-YAG, esta porfirina sofre uma rápida foto-degradação. Isto impede que parâmetros como tempo de vida de fluorescência e estado triplete, além de rendimento quântico de oxigênio singlete sejam medidos. O espectro de fluorescência apresentado por esta substância, na Figura 14, demonstra que *m*-TMP, assim como OEP, retorna ao seu estado fundamental, também por emissão de fluorescência e não somente por vias não radiativas (processos rotacionais, vibracionais e colisionais).

4.2. Foto-oxidação de biomoléculas

As espécies reativas de oxigênio, produzidas em tratamentos com TFD, podem danificar seriamente as biomoléculas de uma célula. O $^1\text{O}_2$, por exemplo, pode danificar lipídeos insaturados, ácidos nucléicos e resíduos de aminoácidos, especialmente triptofano (Fig. 16). Lipídeos insaturados e proteínas são constituintes essenciais de membranas biológicas. Portanto, o $^1\text{O}_2$, pode danificar e provocar o rompimento das membranas de células cancerígenas levando-as à morte¹⁸. Além disso, o $^1\text{O}_2$ pode gerar, internamente na célula cancerígena, uma cascata de eventos oxidativos que culminam na morte do tumor por apoptose. Este tipo de morte celular tem como personagem principal a mitocôndria, que pode ser seriamente afetada pelas EROs produzidas em

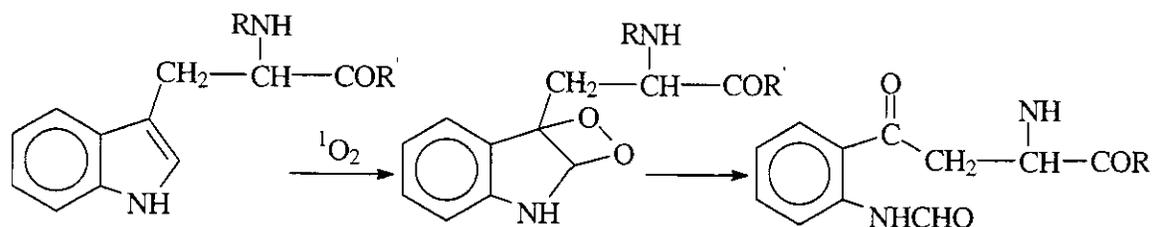
TFD^{11,37,41,84}.

Figura 16. Reação de oxigênio singlete com o aminoácido triptofano.

Ensaio *in vitro* de foto-oxidação de biomoléculas, podem ser utilizados como forma de avaliar o potencial fotossensibilizador de muitas substâncias. Se uma substância é capaz de foto-oxidar um aminoácido ou uma proteína isolada, é provável que seja capaz de foto-oxidar biomoléculas que constituem as células tumorais. Além disso, estes ensaios possuem um custo relativamente baixo, sendo capazes de permitir a seleção de substâncias com potencial fotossensibilizador promissor, para a realização de estudos mais avançados e de custos mais elevados⁸⁵.

Pode-se observar nas Figuras 17 e 18 que OEP, VOOEP e *m*-TMP foram capazes foto-oxidar as biomoléculas Trp (Fig. 17) e BSA (Fig. 18). Esta foto-oxidação foi observada através do monitoramento da fluorescência destas biomoléculas durante 60 minutos com leitura a cada 10 minutos. Os espectros de fluorescência tanto de Trp quanto de BSA apresentaram decaimento durante o tratamento. No entanto, na ausência de luz ou das porfirinas este decaimento não ocorreu (resultados não apresentados).

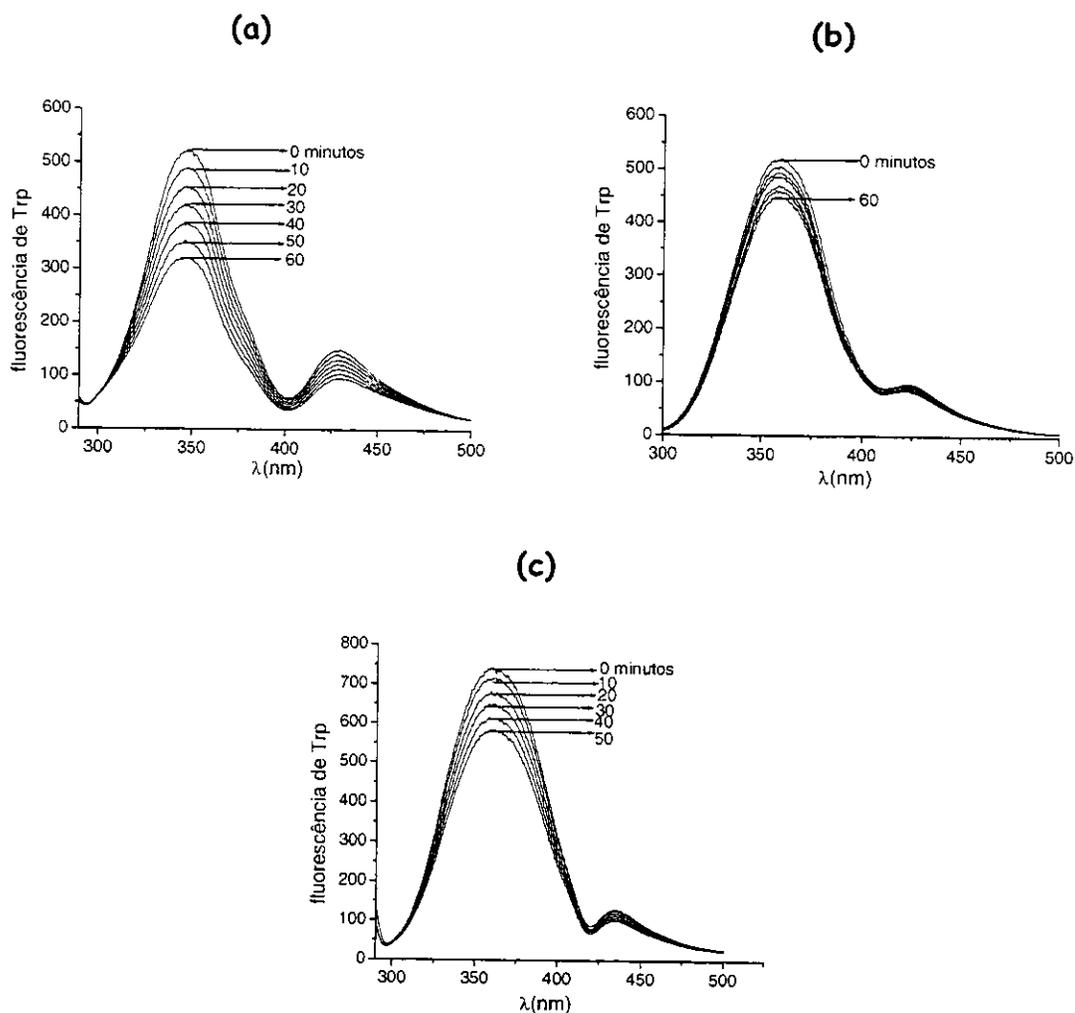


Figura 17. Decaimento na intensidade dos espectros de fluorescência de Trp na presença de OEP (a), VOOEP (b), *m*-TMP (c), luz e oxigênio. Estes espectros foram obtidos num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20[®] 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP), caminho óptico de 0,5 cm e a 28°C.

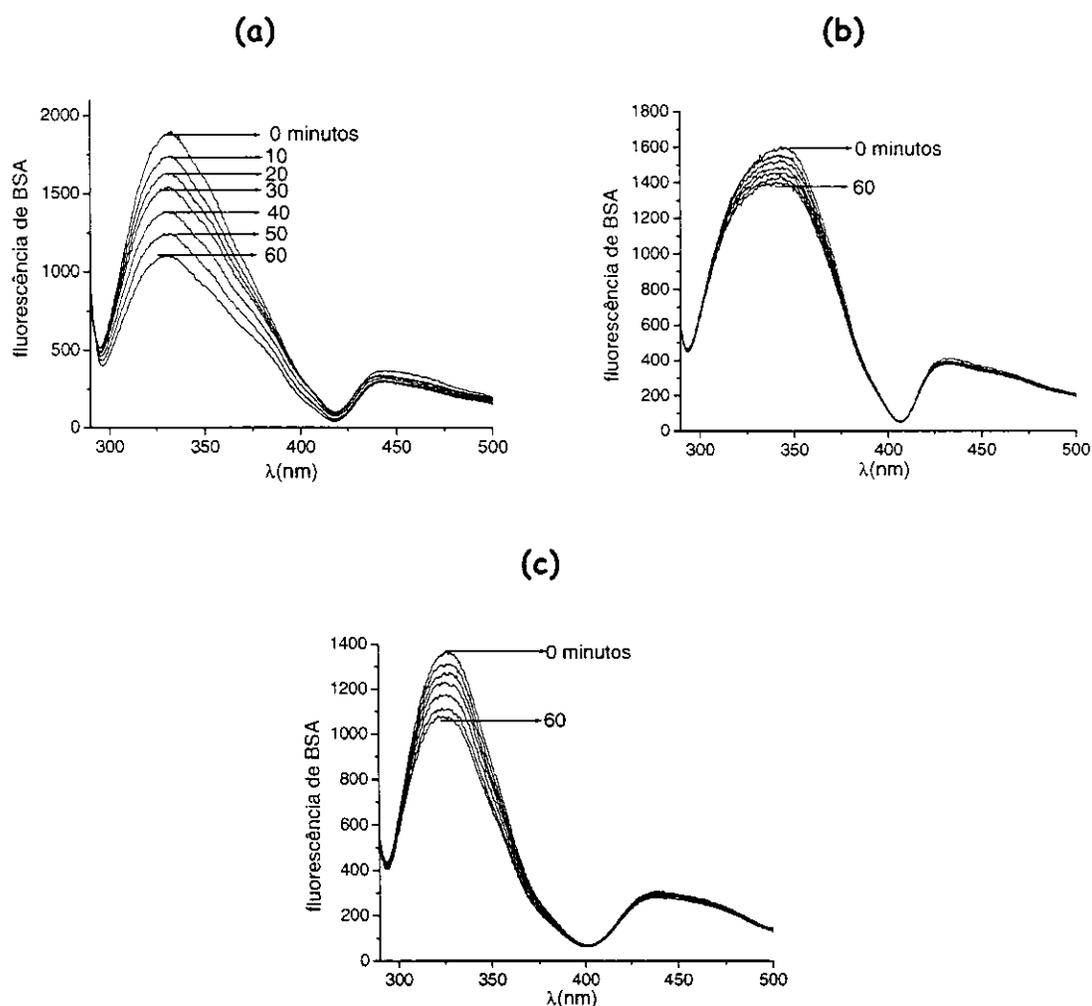


Figura 18. Decaimento na intensidade dos espectros de fluorescência de BSA na presença de OEP (a), VOOEP (b), *m*-TMP (c), luz e oxigênio. Estes espectros foram obtidos num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20[®] 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho óptico de 0,5 cm a 28°C.

A Figura 19 apresenta exemplos de cálculos das constantes de velocidade de foto-oxidação de biomoléculas, na presença de OEP. Estas constantes, apresentadas na Tabela 2, revelam que OEP é mais eficiente do que *m*-TMP e consideravelmente mais eficiente do que VOOEP. Esta última observação concorda com os dados obtidos nas medidas de parâmetros

fotofísicos (Tab.1) que indicam uma maior eficiência de OEP em relação a VOOEP.

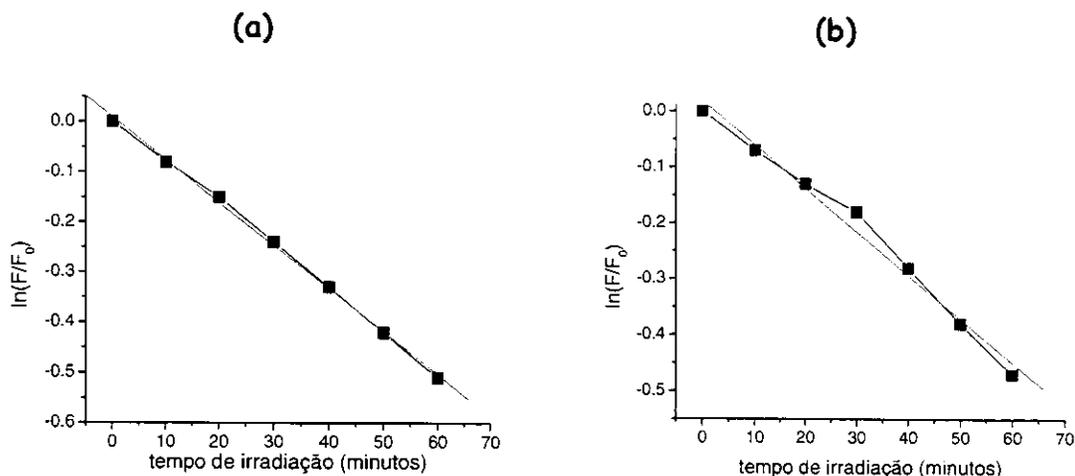


Figura 19. Exemplo de cálculo da constante de velocidade de foto-oxidação para Trp (a) e BSA (b) na presença de OEP.

Tabela 2. Valores das constantes de velocidade de foto-oxidação (k_f) de Trp e BSA na presença de OEP, VOOEP, *m*-TMP, luz e oxigênio. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral

Porfirinas	k_f para Trp / $10^{-4}s^{-1}$	k_f para BSA / $10^{-4}s^{-1}$
OEP	$2,80 \pm 0,05$	$2,50 \pm 0,1$
VOOEP	$0,81 \pm 0,08$	$0,62 \pm 0,04$
<i>m</i> -TMP	$1,62 \pm 0,07$	$1,53 \pm 0,06$

A foto-oxidação de proteínas na presença de fotossensibilizadores geralmente envolve o ataque de 1O_2 a resíduos de histidina⁸⁶. No caso de BSA, esta foto-oxidação pode ocorrer no aminoácido cisteína na posição 34 (Cys-34), levando a formação de radical (RS^\bullet), e em Trp nas posições 134 e 214, ocasionando a destruição do anel indol deste aminoácido (Fig. 16)⁸⁷. Isto pode explicar a semelhança entre os valores das constantes de foto-oxidação de Trp

e BSA apresentadas na Tabela 2.

Nesta etapa do projeto foi investigada, também, a influência da concentração das porfirinas nos valores de k_f (Fig. 20). Foi constatado que o aumento, na concentração destas porfirinas, acarreta num aumento nos valores de k_f . Pôde-se constatar também que OEP é mais eficiente do que *m*-TMP e ambos são mais ativos do que VOOEP. Embora k_f aumente com a concentração das porfirinas, este aumento não ocorre de maneira linear. Tal comportamento sugere que, à medida que se aumenta a concentração do fotossensibilizador a produção de EROs tende a declinar. Este acontecimento pode ser atribuído à ocorrência de foto-degradação e/ou agregação das porfirinas⁹. Os resultados das avaliações destes dois parâmetros estão descritos nas próximas seções.

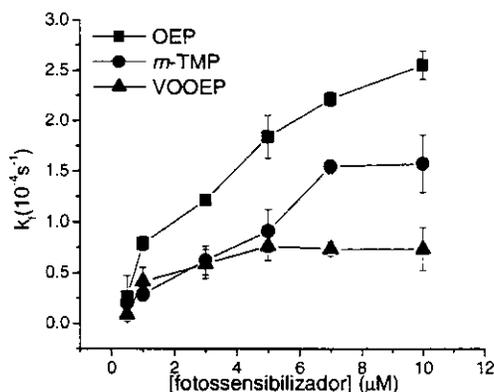


Figura 20. Valores de k_f em função das concentrações das porfirinas. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

4.3. Avaliação da foto-degradação

A foto-degradação de uma porfirina é a modificação da sua estrutura ocasionada, em geral, pela reação da mesma com EROs (principalmente $^1\text{O}_2$)

geradas durante o tratamento com TFD. Tal modificação reduz a quantidade de porfirinas intactas, no meio de reação, provocando uma diminuição na produção de EROs. Este evento reduz a eficiência do tratamento, tornando a destruição do tumor incompleta⁴⁴.

Uma maneira de medir a foto-degradação de uma porfirina é irradiá-la com luz visível, num meio saturado com oxigênio, e monitorar o comportamento de seu espectro de fluorescência durante um determinado período. Caso ocorra foto-degradação, a mesma será detectada através da queda na intensidade da fluorescência da porfirina⁴⁵. No caso das porfirinas, aqui avaliadas, pode-se notar, através da Figura 21, que durante 60 minutos de irradiação elas não apresentaram queda significativa nas suas intensidades de fluorescência. Isto demonstra que as estruturas de *m*-TMP, OEP e VOOEP não são fotodegradadas nestas condições experimentais. Tal resultado é importante, pois a ausência de foto-degradação, demonstra que estas porfirinas não tiveram suas capacidades de produção de EROs afetadas por este fator, durante a foto-oxidação de biomoléculas. No entanto, é importante ressaltar que, na presença de laser do tipo Nd-YAG, *m*-TMP sofreu uma rápida foto-degradação. Este foi o motivo pelo qual os parâmetros fotofísicos desta porfirina não puderam ser medidos. Isto é uma desvantagem, uma vez que o laser é a fonte luminosa mais empregada em tratamentos com TFD^{88,89}.

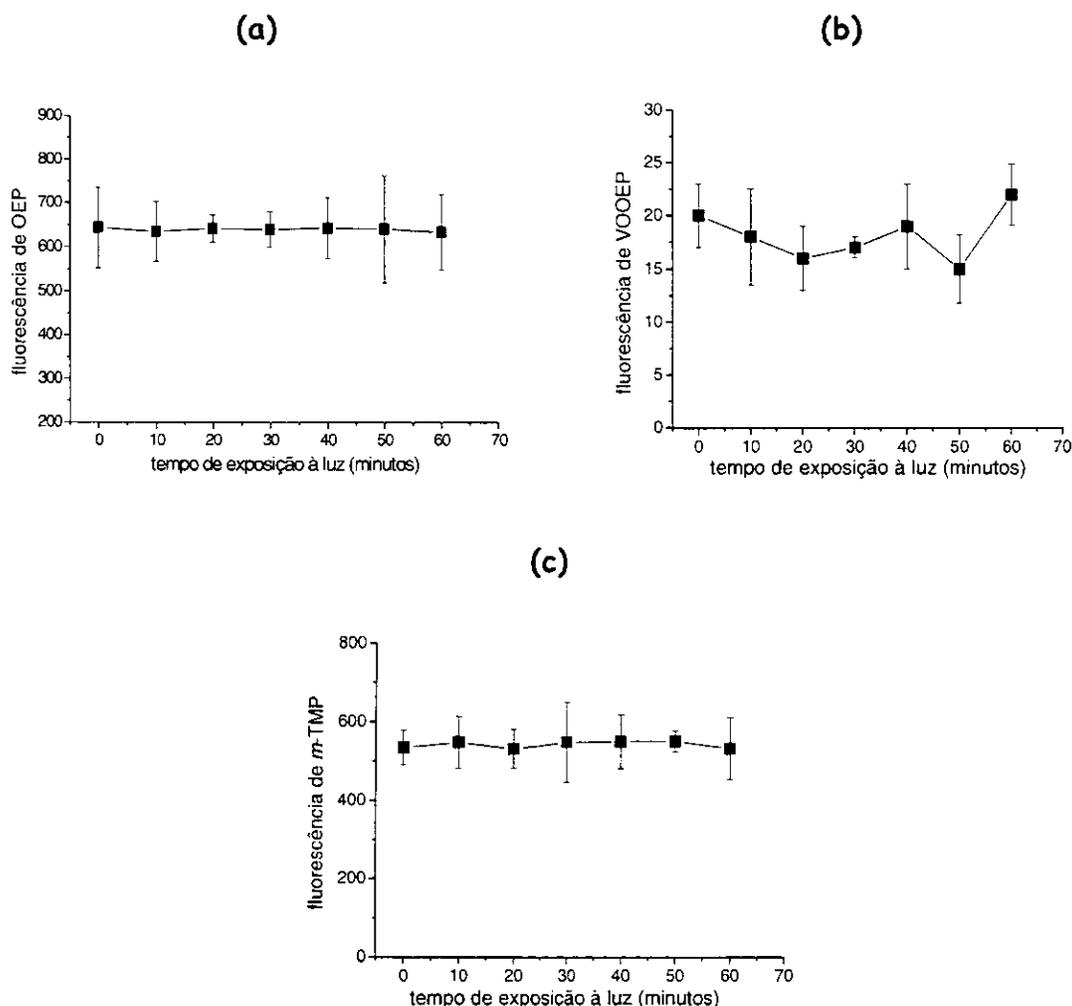


Figura 21. Intensidade de fluorescência de OEP em 620 nm (a), VOOEP em 623 nm (b) e *m*-TMP em 650 nm (c), na presença de luz e oxigênio. Este experimento foi realizado durante 60 minutos num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20[®] 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho óptico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

Apesar da importância da ausência de foto-degradação, durante o tratamento, vale a pena ressaltar que a ocorrência desta foto-degradação gradual é extremamente importante como forma de se eliminar o

fotossensibilizador do organismo. Evidências sugerem que baixo nível de iluminação ou iluminação controlada, de pacientes pós-terapia, pode efetivamente fotodegradar Photofrin® e remove-lo da pele diminuindo os riscos de exposição ao sol ao que o paciente é submetido após aplicações desta droga^{90,91}. A Figura 22 revela que na presença de luz ambiente e num período mais longo de 10 dias, apenas *m*-TMP apresentou foto-degradação.

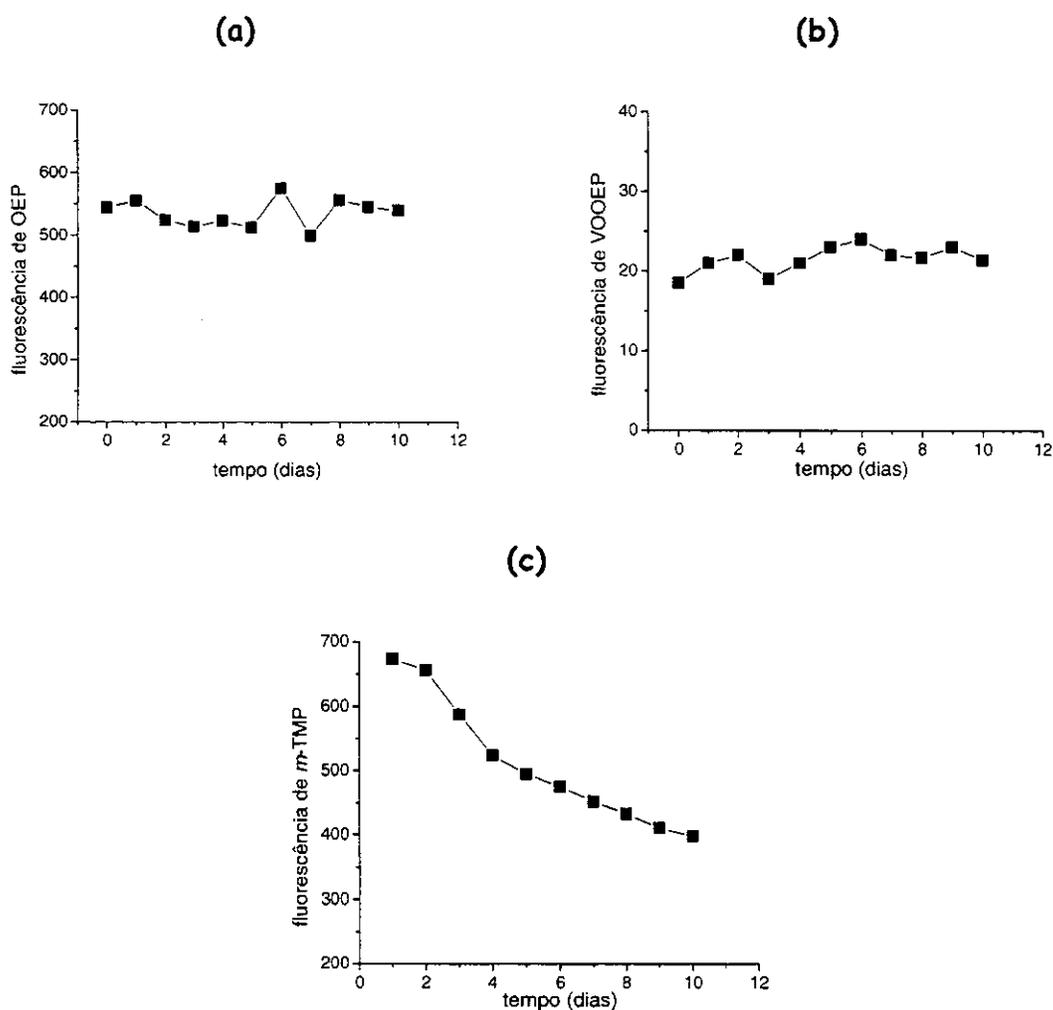


Figura 22. Fluorescência de OEP em 620 nm (a), VOOEP em 623 nm (b) e *m*-TMP em 650 nm (c). Meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v), caminho óptico de 0,5 cm e a 28°C.

A não ocorrência de foto-degradação gradual em OEP e VOOEP não chega a ser um empecilho em tratamentos clínicos, pois o próprio organismo dispõe de meios que facilita a eliminação de substâncias hidrofóbicas como OEP e VOOEP. O complexo do citocromo p450, por exemplo, favorece a eliminação destas substâncias, tornando-as relativamente solúveis⁹².

4.4. Determinação da constante de dimerização

A formação de agregados ocasiona mudanças nas propriedades fotofísicas de fotossensibilizadores^{93,94,95}. A agregação pode diminuir o tempo de vida de um FTS no estado triplete excitado ocasionando um decréscimo na produção de EROs. Prova disso são os estudos que demonstram que fotossensibilizadores agregados, *in vivo*, são menos eficientes dos que os não agregados^{9,61}.

Geralmente, as estruturas agregadas tendem se formar à medida que se aumenta a concentração do FTS. Estas estruturas agregadas suprimem a fluorescência do FTS, o que explica porque fotossensibilizadores, que tendem a se agregar, não apresentam aumento na intensidade de fluorescência proporcional ao aumento da concentração⁴⁵. No caso deste projeto, a avaliação da agregação sugere que tanto OEP quanto *m*-TMP são fotossensibilizadores que tendem a formar agregados, uma vez que o aumento de suas intensidades de fluorescência não foi proporcional ao aumento de suas concentrações. Isto foi mais evidente a partir da concentração de 2 μ M para OEP e 3 μ M para *m*-TMP (Fig. 23).

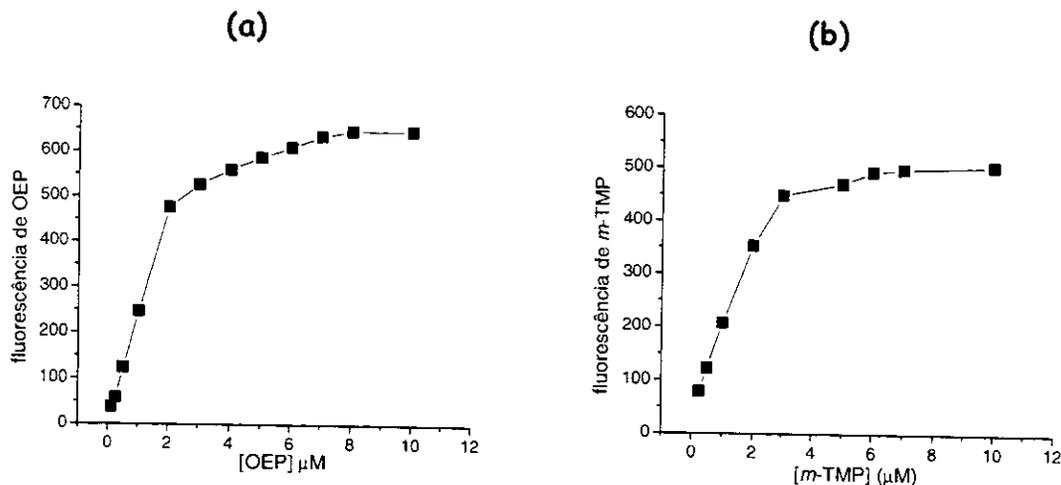


Figura 23. Intensidade de fluorescência de OEP medida 620 nm (a) e *m*-TMP em 650 nm (b) em função de suas concentrações. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho óptico de 0,5 cm e a 28°C.

Deve-se ressaltar, também, que apesar dos gráficos, da Figura 23, apresentarem faixas lineares, isto não significa que nestas regiões existam somente monômeros. Para se verificar a agregação dos fotossensibilizadores, nestas faixas lineares, calculou-se os valores de K_D . Quanto maiores estes valores, maior será a tendência do FTS em formar agregados⁴⁵.

A Tabela 3 demonstra valores de K_D para OEP e *m*-TMP. Tais valores estão de acordo com os apresentados por outras porfirinas hidrofóbicas⁹⁶. Pode-se notar, também, que os valores de K_D para OEP e *m*-TMP são bastante semelhantes entre si, indicando que a tendência de formar agregados, por parte de OEP, é semelhante a *m*-TMP. Estes dados demonstram, também, a ocorrência de agregação mesmo na faixa linear dos gráficos da Figura 23. Além disso, pode-se sugerir que a agregação seria o fator responsável pelo aumento não linear dos valores de k_f na foto-oxidação de biomoléculas (Fig. 20).

Tabela 3. Valores de K_D para OEP e *m*-TMP. Estes valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral

Porfirinas	Valores de $k_D/10^5$
OEP	$4,01 \pm 0,08$
<i>m</i> -TMP	$3,91 \pm 0,05$

Infelizmente não foi possível calcular K_D para VOOEP uma vez que esta substância, em meio aquoso, parece estar em estado de agregação mesmo em baixíssimas concentrações. A incorporação de VOOEP em lipossoma pode ser uma maneira de se tentar obter um espectro de fluorescência mais definido, o que indicaria, possivelmente, diminuição na formação de agregados desta porfirina. Os resultados desta avaliação serão descritos adiante.

4.5. Determinação do mecanismo de foto-oxidação de biomoléculas

Sabe-se que D_2O aumenta o tempo de vida de 1O_2 ^{97,98}. Portanto, a presença de D_2O deve aumentar o valor da constante de velocidade de foto-oxidação de biomoléculas caso o mecanismo preponderante seja do tipo II.

O NaN_3 é um eficiente supressor de 1O_2 ^{98,99}. Ele interage com 1O_2 através de uma reação irreversível na qual transfere elétrons para 1O_2 regenerando o oxigênio no estado fundamental e reduzindo, assim, o tempo de vida do 1O_2 ¹⁷. Portanto, a presença de NaN_3 deve diminuir o valor da constante de velocidade de foto-oxidação caso o mecanismo preponderante seja do tipo II.

Neste trabalho observou-se que a presença de NaN_3 diminuiu (Fig. 24) e a presença de D_2O aumentou (Fig. 25) os valores de k_f para Trp. Tais efeitos foram observados tanto na presença de *m*-TMP quanto de OEP e VOOEP.

Sendo assim, pode-se concluir que possivelmente o mecanismo preponderante na foto-oxidação de biomoléculas, mediada por OEP, VOOEP e *m*-TMP, é do tipo II.

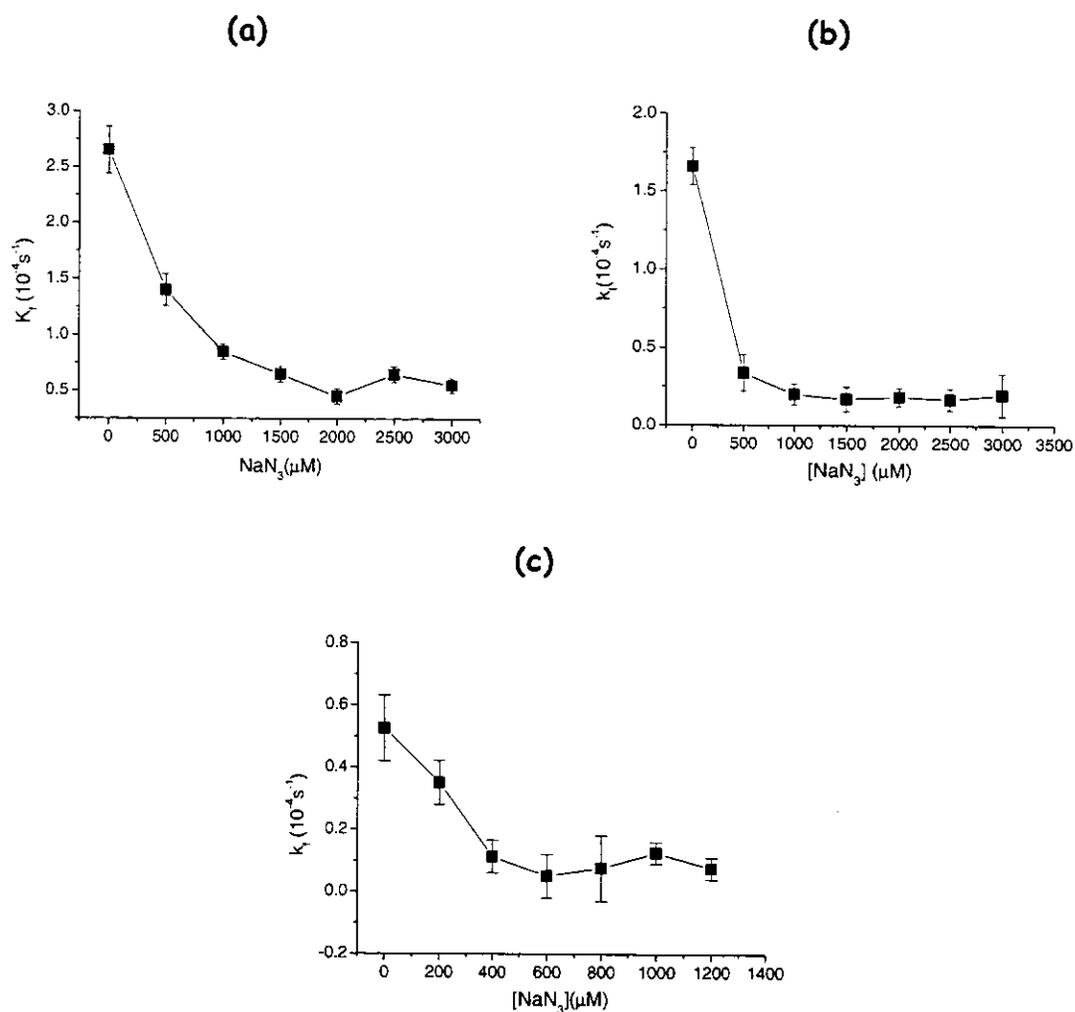


Figura 24. Influência de NaN₃ na foto-oxidação de Trp mediada OEP (a) VOOEP (b), *m*-TMP (c), luz e oxigênio. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20[®] 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho óptico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.

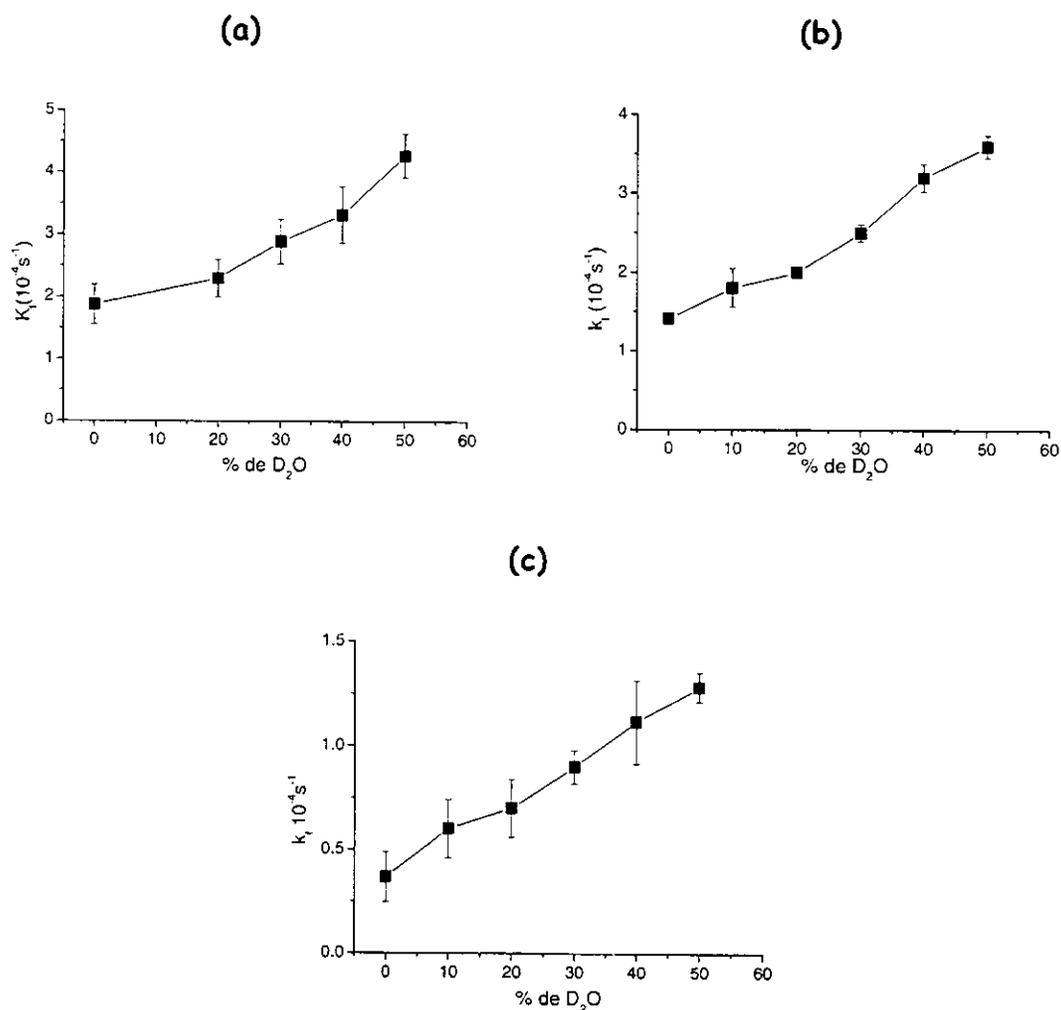


Figura 25. Influência de D₂O na foto-oxidação de Trp mediada OEP (a) VOOEP (b), *m*-TMP (c), luz e oxigênio. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,6% (m/v), solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahidrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

A vantagem da ocorrência do mecanismo tipo II é que o oxigênio singlete é mais reativo do que as outras EROs, possuindo um poder de destruição muito maior⁸⁹. Além disso, por ter um tempo de vida extremamente

curto, o raio de ação do 1O_2 fica restrito à região do tumor, o que reduz os danos aos tecidos saudáveis vizinhos. Outra vantagem do mecanismo tipo II, é que nos processos de transferência de energia, ao contrário do que ocorre nos processos de transferência de carga, não há modificação da estrutura do FTS. Isto faz com que uma mesma molécula de FTS possa ser excitada várias vezes, tornando, o processo de geração de 1O_2 , mais eficiente⁸⁹.

4.6. Influência de Tween 20 e solvente orgânico na hemólise de células sanguíneas

Antes da realização dos ensaios de foto-destruição de células, realizaram-se testes para se verificar qual a influência do surfactante e dos solventes orgânicos na hemólise destas células. Os resultados (Fig. 26) revelaram a necessidade de se diminuir as porcentagens tanto de Tween 20[®] quanto de acetato de etila e tetrahydrofurano, uma vez que a quantidade destes agentes, utilizada no estudo de foto-oxidação de biomoléculas, causou a destruição de uma quantidade excessiva de células, podendo comprometer os ensaios de foto-destruição celular por OEP, VOOEP e *m*-TMP. Além disso, estes resultados demonstraram a importância de se adotar uma formulação adequada (ex: lipossomas, nanopartículas, ciclodextrinas, dendrímeros) para possível aplicação *in vivo*, uma vez que o surfactante e o solvente orgânico mostram-se inadequados para este tipo de estudo. Em relação aos ensaios *in vitro*, com células de eritrócitos, optou-se pela utilização de uma menor porcentagem de Tween 20[®] (0,1% m/v) e solvente orgânico (0,25% v/v).

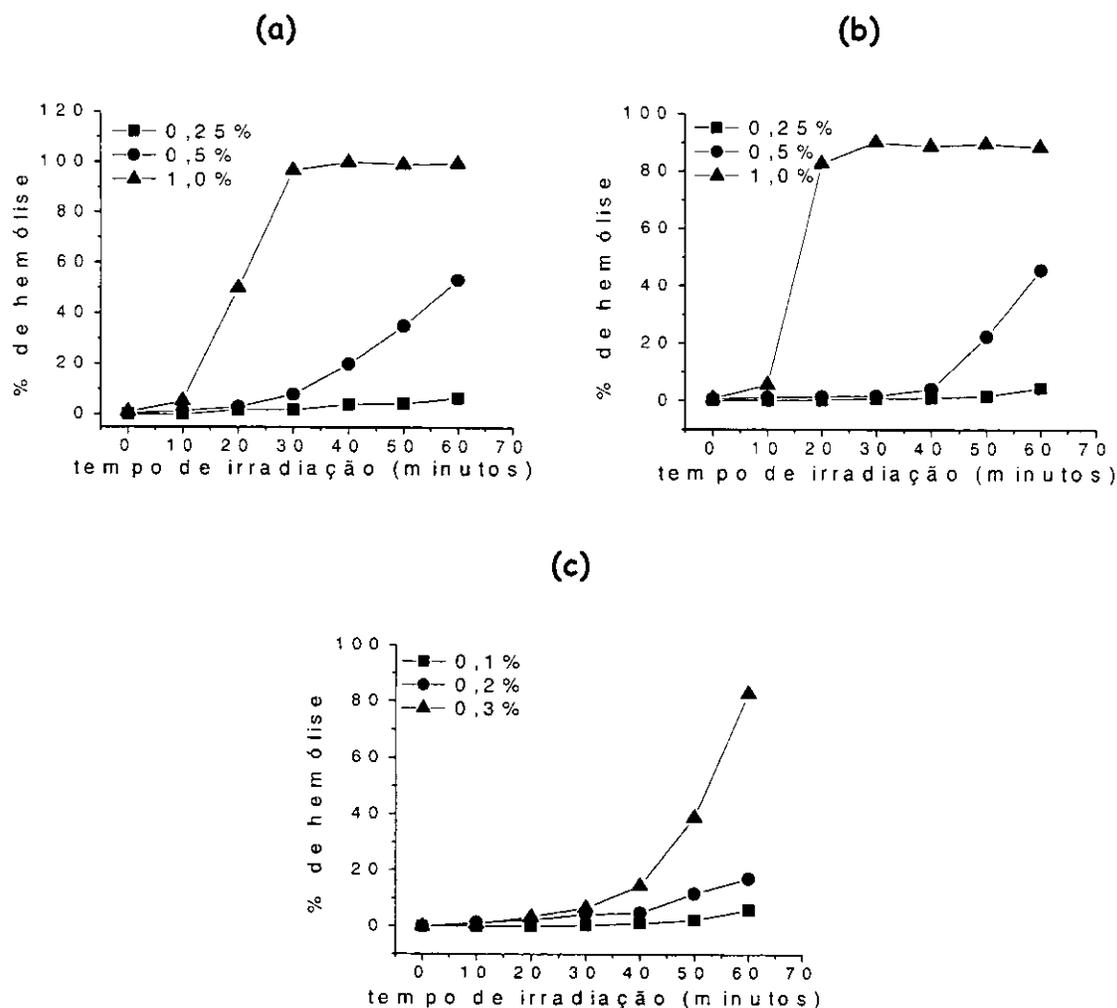


Figura 26. Influência de acetato de etila (a), tetrahidrofurano (b) e Tween 20[®] (c) na hemólise de células de eritrócitos. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4 com caminho óptico de 0,5 cm e a 28°C.

4.7. Foto-destruição de eritrócitos

A capacidade de foto-oxidar biomoléculas, demonstrada pelas porfirinas, estimulou a realização de experimentos com estruturas mais complexas. Para isso foram utilizados eritrócitos (como modelo de células) com a finalidade de se avaliar a capacidade de *m*-TMP, OEP e VOOEP em causar a

foto-destruição (hemólise) destas células, na presença de luz e $^3\text{O}_2$. Ensaio de foto-destruição de eritrócitos podem ser utilizados como forma de se avaliar o potencial fotossensibilizador de uma dada substância¹⁰⁰.

A irradiação de eritrócitos com luz visível, na presença das porfirinas e $^3\text{O}_2$, provocou a hemólise destas células e mostrou que OEP é mais eficiente do que VOOEP e *m*-TMP (Fig. 27).

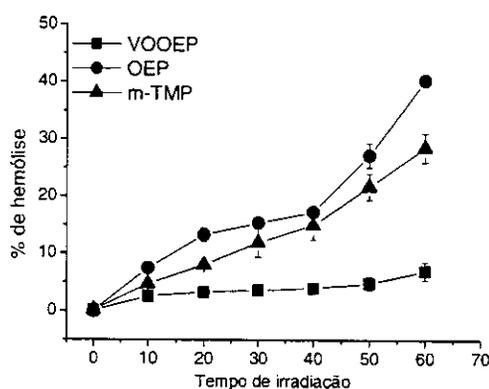


Figura 27. Porcentagem de hemólise de eritrócitos na presença de $10\mu\text{M}$ de OEP, VOOEP ou *m*-TMP, luz e oxigênio. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20[®] 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho óptico de 0,5 cm e a 28°C . Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

Esta hemólise foi verificada através da liberação de oxihemoglobina no meio de reação. Tal evento pôde ser monitorado através do aumento de intensidade no espectro de absorvância, em 542 nm, da oxihemoglobina em função do tempo de irradiação. Esta oxihemoglobina é liberada, devido ao rompimento da membrana celular, ocorrido durante o tratamento. Este rompimento ocorre como resultado da foto-oxidação de proteínas e

fosfolipídios presentes na membrana do eritrócito. Esta foto-oxidação, ocasionada, principalmente, por $^1\text{O}_2$, resulta na formação de poros que são consequência de um aumento na mobilidade dos fosfolipídios, o que provoca a ruptura da membrana e liberação de oxihemoglobina para o meio extracelular^{101,102}.

Pode-se sugerir que a maior eficiência de OEP, em relação a *m*-TMP, tanto na foto-oxidação de biomoléculas quanto na foto-destruição de eritrócitos pode ser explicada por diferenças entre as estruturas destas porfirinas. Mesmo na ausência de dados relativos aos parâmetros fotofísicos, pode-se supor que a presença de grupos fenilas no anel porfirínico de *m*-TMP, favorece a perda de energia por processos rotacionais e vibracionais¹⁰³ prejudicando sua eficiência fotodinâmica.

Ainda no experimento de foto-destruição, foi observado também, que o aumento na concentração de OEP, VOOEP e *m*-TMP, acarretou num aumento da porcentagem de hemólise dos eritrócitos (Fig. 28). No entanto, este aumento não foi proporcional ao aumento da concentração das porfirinas, sugerindo que a formação de agregados possa ser o fator responsável por uma possível diminuição na produção de EROs. Esta agregação pode ter sido resultado da diminuição da porcentagem de surfactante e solvente orgânico relatada no item anterior.

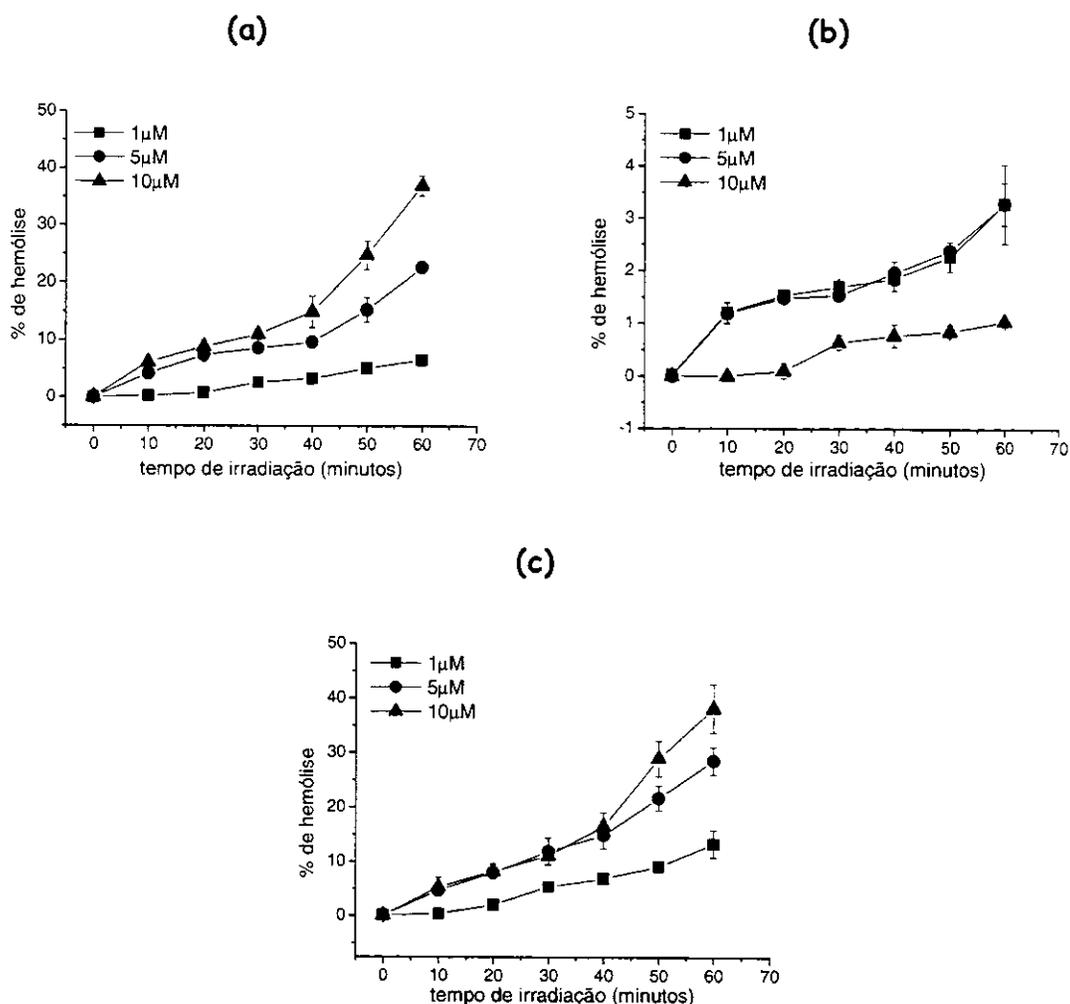


Figura 28. Influência da concentração de OEP (a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c) na foto-destruição de células de eritrócitos. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20[®] 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

Deve-se ressaltar, também, que nenhuma das três porfirinas causou a hemólise de eritrócitos na ausência de luz (Fig. 29). Isto é muito importante, já que um dos pré-requisitos, para que uma substância possa ser utilizada em TFD, é não apresentar toxicidade na ausência de luz⁷.

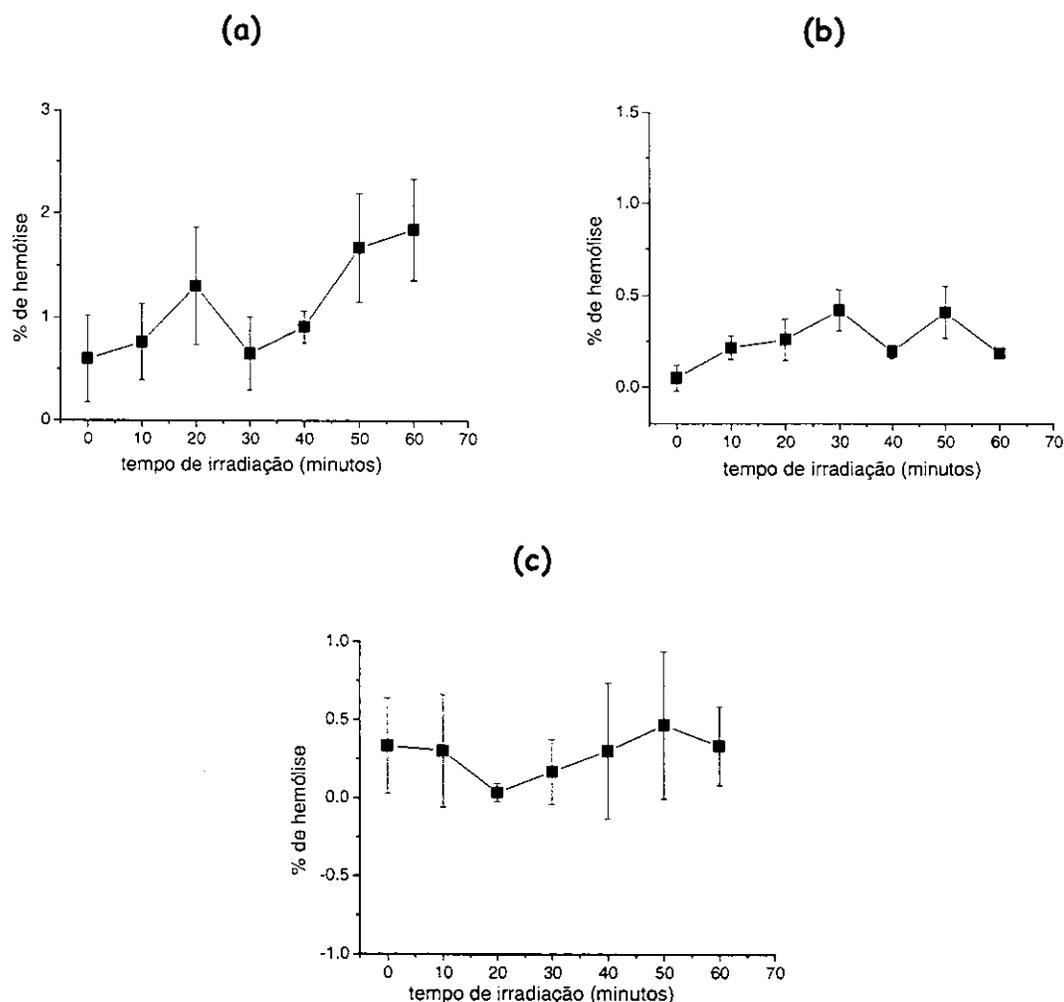


Figura 29. Hemólise de eritrócitos na ausência de luz e presença de OEP (a), VOOEP (b), *m*-TMP (c) e oxigênio. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20[®] 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

4.8. Determinação do mecanismo de foto-destruição de eritrócitos

A Figura 30 mostra que a adição de manitol, no meio de reação, provocou uma discreta queda na porcentagem de hemólise, de eritrócitos,

mediada pelas três porfirinas.

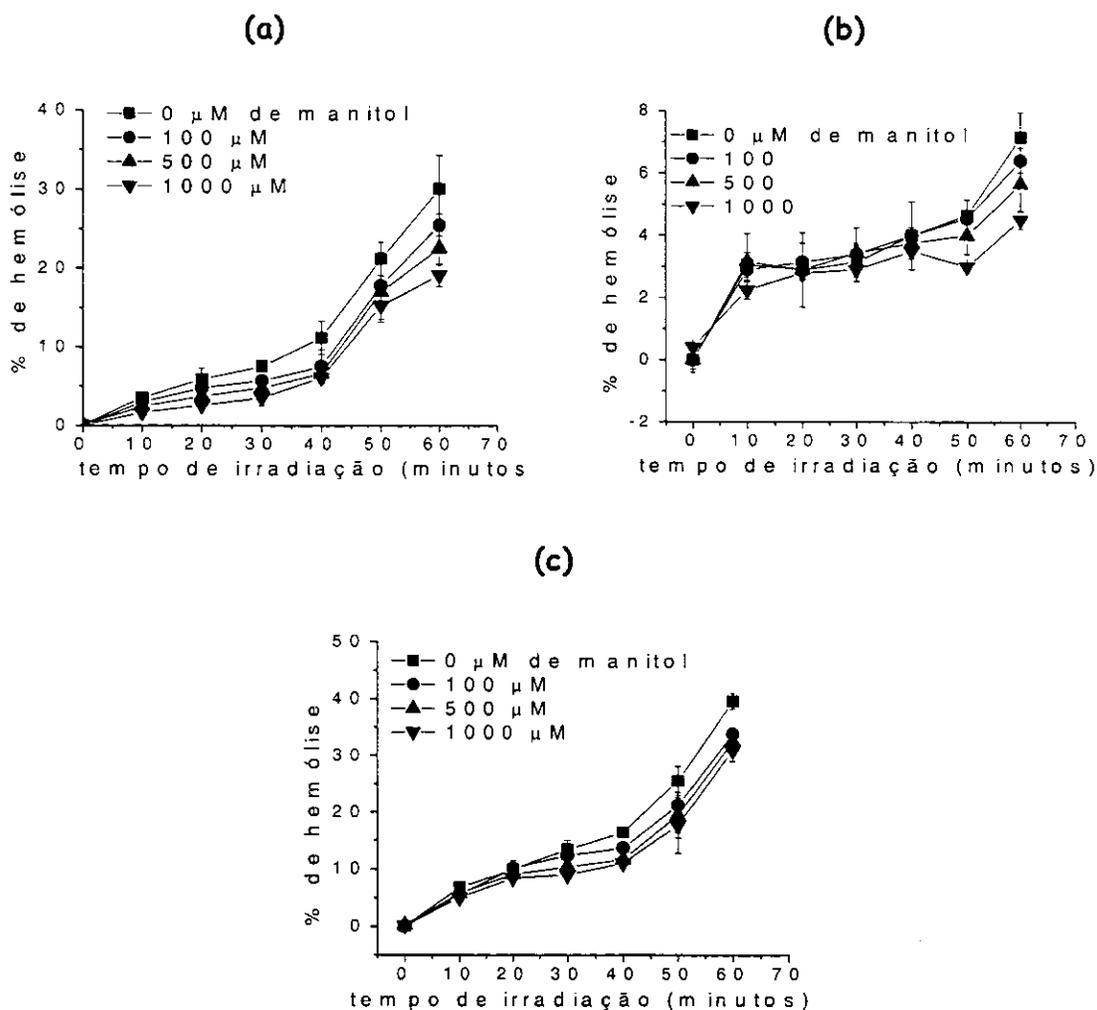


Figura 30. Efeito de diferentes concentrações de manitol na de foto-destruição de eritrócitos ocasionada por OEP (a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c). Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho óptico de 0,5 cm e a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.

Sendo o manitol, um supressor de HO[•], pode-se deduzir que esta

espécie favoreceu, discretamente, a hemólise dos eritrócitos. O aparecimento de HO^\bullet pode ter sido resultado da reação entre H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet -}$. Este último gerado, possivelmente, pelo mecanismo tipo I. No entanto, deve-se ressaltar, que o HO^\bullet pode, também, ser gerado no mecanismo tipo II, através, por exemplo, da inibição da enzima catalase pelo $^1\text{O}_2$ ¹⁰⁴. Esta enzima, presente nas células, é responsável pela conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 . Este processo protege as células dos efeitos deletérios ocasionados pelo H_2O_2 impedindo a transformação desta espécie em HO^\bullet . Logo, a inibição da catalase, favorece o aparecimento do radical hidroxila¹⁰⁵.

Uma forte evidência da participação do $^1\text{O}_2$, neste estudo, vem do fato de que a adição de D_2O provocou aumento na porcentagem de foto-destruição celular, ocasionada pelas três porfirinas (Fig. 31). O tempo de vida do oxigênio singlete é profundamente influenciado pela natureza do solvente. Em água comum, por exemplo, é cerca de $4,0\mu\text{s}$, já em água deuterada, este tempo de vida situa-se em torno de $70\mu\text{s}$ ⁷. Logo, ao aumentar o tempo de vida do $^1\text{O}_2$, D_2O provoca um aumento na porcentagem de foto-destruição de eritrócitos.

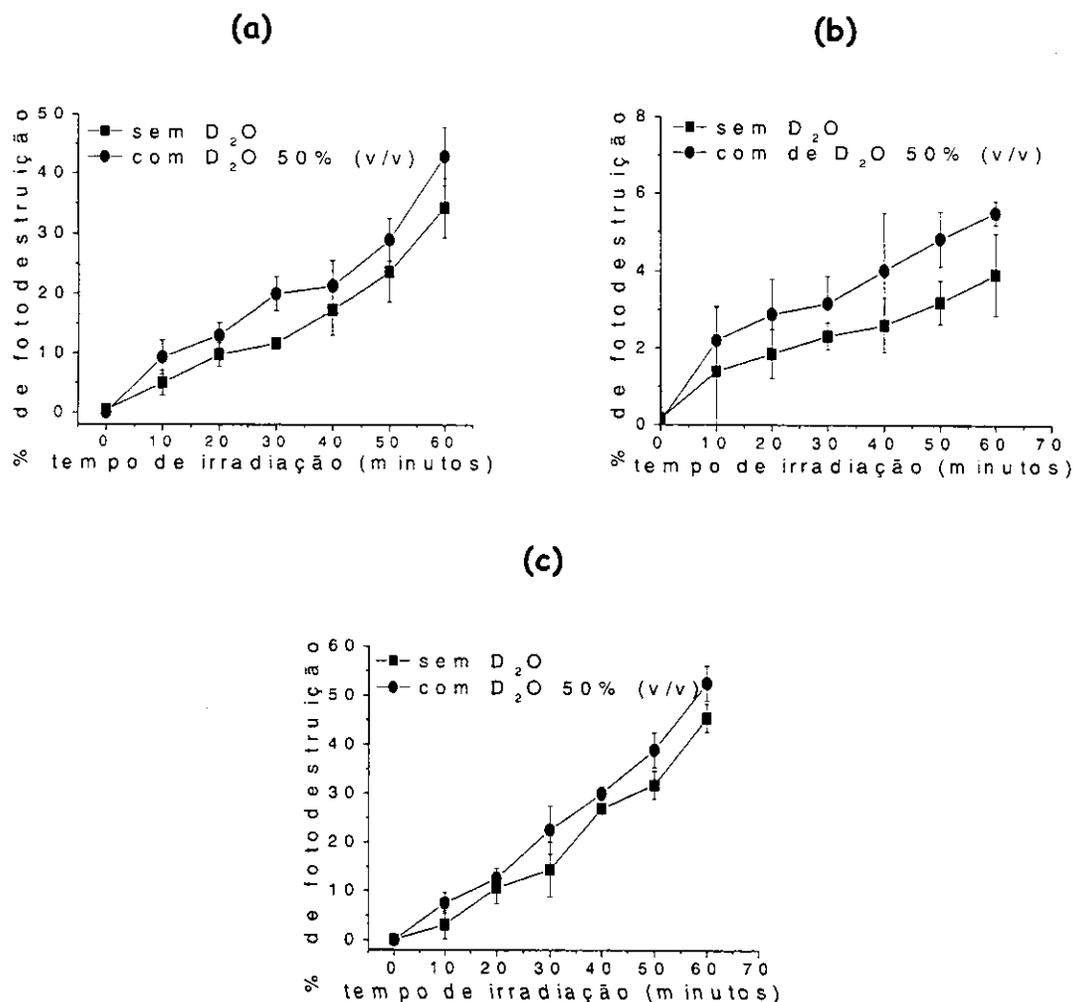


Figura 31. Efeito de D₂O na porcentagem de foto-destruição de eritrócitos ocasionada por OEP(a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c). Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahidrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho óptico 0,5 cm a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.

Outro fato que reforçou a participação do ¹O₂ foi a diminuição, da foto-destruição, provocada por azida (Fig. 32) e L-histidina (Fig. 33) A azida transfere elétrons para o ¹O₂ regenerando o oxigênio no estado fundamental o

que faz diminuir a quantidade de $^1\text{O}_2$ no meio de reação. A L-histidina, por sua vez, diminui a quantidade de $^1\text{O}_2$, reagindo com o mesmo para formar endoperóxidos que se decompõem em uma mistura complexa de produtos¹⁰⁶.

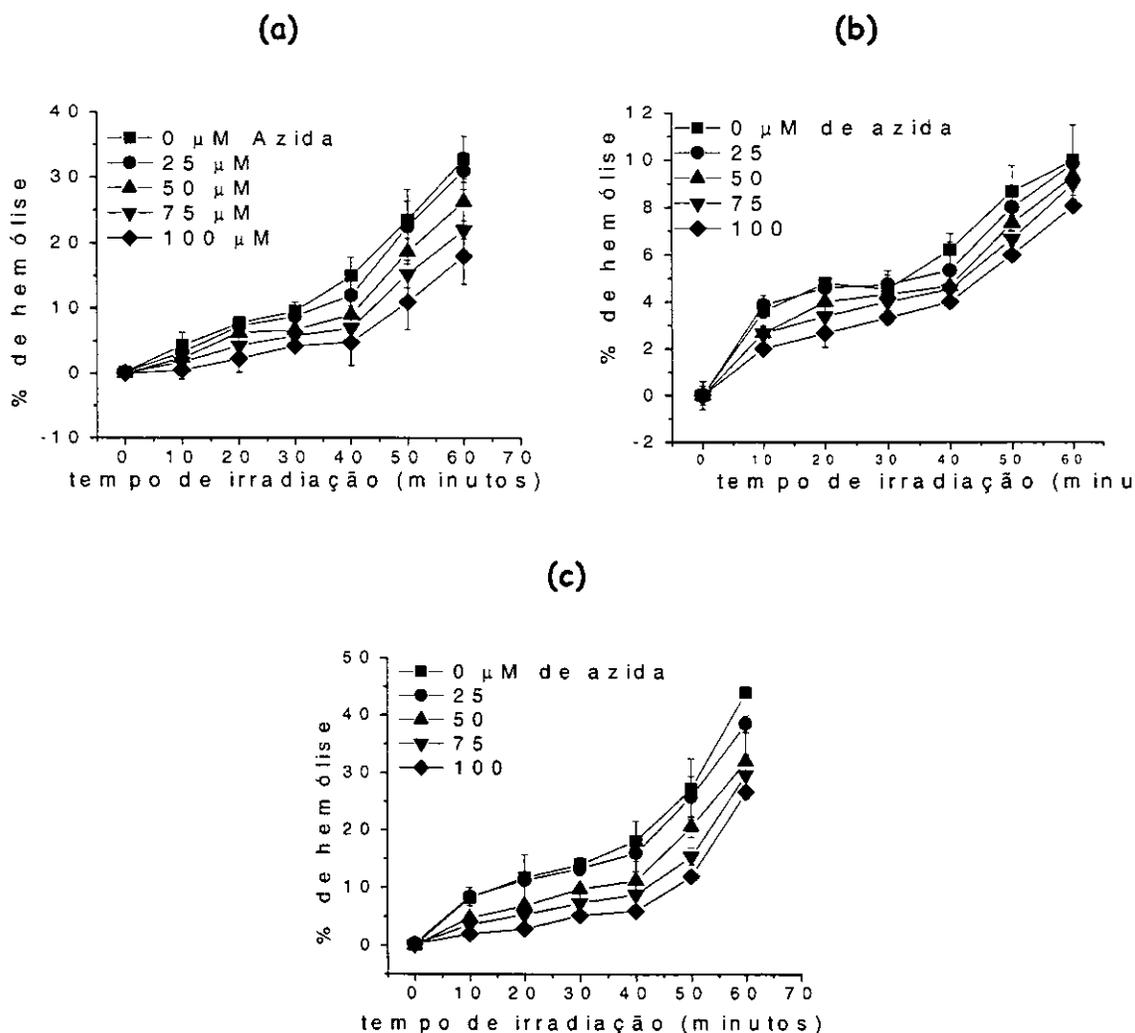


Figura 32. Efeito de diferentes concentrações de NaN_3 na porcentagem de foto-destruição de eritrócitos ocasionada por OEP (a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c). Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho ótico de 0,5 cm a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

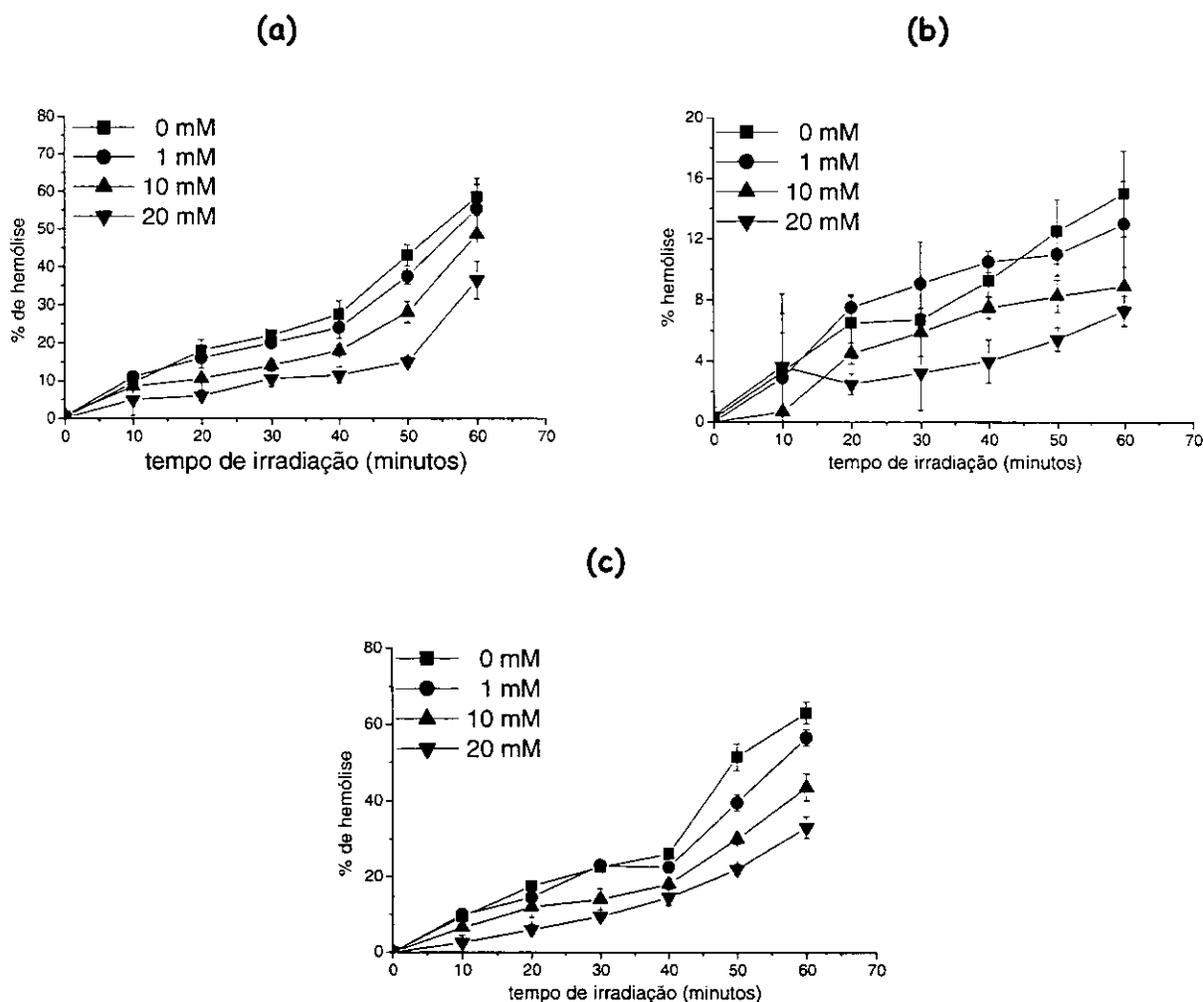


Figura 33. Efeito de diferentes concentrações de L-histidina na porcentagem de foto-destruição de eritrócitos ocasionada por OEP (a), VOOEP (b), *m*-TMP (c). Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4; Tween 20® 0,1% (m/v) e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) e caminho óptico de 0,5 cm a 28°C. Os valores apresentados representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

Os resultados obtidos sugerem a preponderância do mecanismo tipo II, mas não se descarta a ocorrência também do mecanismo tipo I.

4.9. Incorporação das porfirinas em lipossomas

Alguns trabalhos têm demonstrado aumentos consideráveis no potencial fototerapêutico de alguns fotossensibilizadores, quando os mesmos são encapsulados em lipossomas. Muito do deste sucesso deve-se, em parte, a uma melhor penetração nas células tumorais e a uma diminuição na formação de agregados do fotossensibilizador^{107,108}. Sendo assim, optou-se pelo encapsulamento de OEP, VOOEP e *m*-TMP em vesículas lipossomais, com o objetivo de melhorar a eficiência fotodinâmica destas porfirinas. Os resultados deste estudo serão demonstrados a seguir.

4.10. Fluorescência das porfirinas em função da concentração de lipossomas

A Figura 34 mostra que à medida que se aumenta a concentração do lipossoma, ocorre um aumento considerável da intensidade de fluorescência das três porfirinas. No entanto, a partir de uma dada concentração do lipossoma, a intensidade de fluorescência destas porfirinas tende a ser constante levando a crer que uma grande parte do fotossensibilizador, presente no meio, interagiu com as vesículas lipossomais. Pode-se sugerir, então, que o aumento na intensidade de fluorescência, das porfirinas, deve-se ao fato das mesmas passarem da forma agregada, na fase aquosa, para a forma de monômeros, na fase lipídica¹⁰⁷. Isto foi observado também com uma outra porfirina conhecida como bacterioclorina. De acordo com Damoiseau e seus colaboradores¹⁰⁷, a fluorescência desta porfirina aumenta consideravelmente na presença de concentrações crescentes de lipossoma do tipo DMPC, indicando a

monomerização da bacterioclorina.

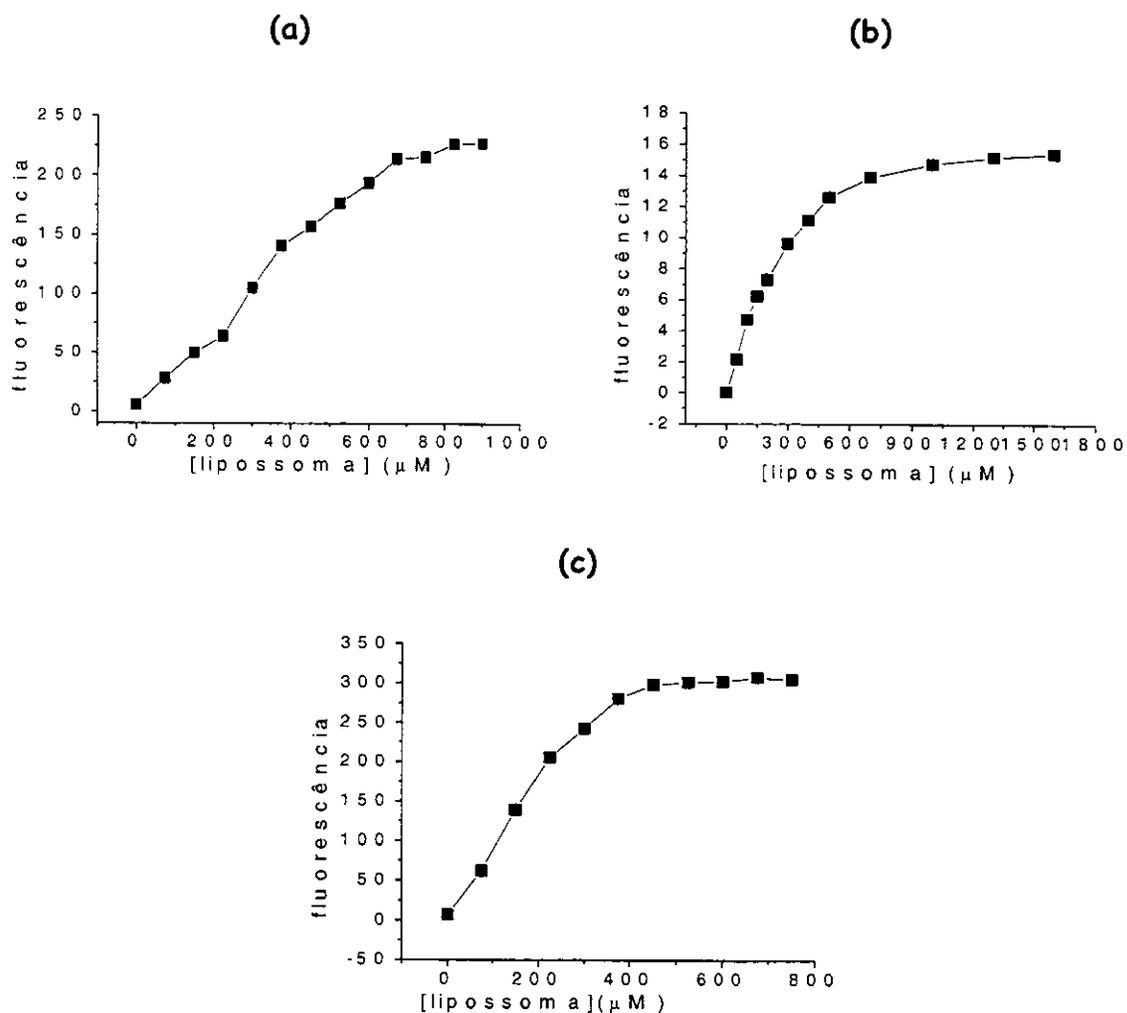


Figura 34. Fluorescência de OEP em 620 nm (a), VOOEP em 623 nm (c) e *m*-TMP em 650 nm (b) em função da concentração de lipossoma. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4 e solvente orgânico 0,25% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP) mantido a 45°C.

4.11. Determinação da concentração de porfirina encapsulada pelos lipossomas

A Figura 35 mostra um exemplo de curva padrão (curva de *m*-TMP) das absorvâncias das porfirinas em função de suas concentrações em octanol.

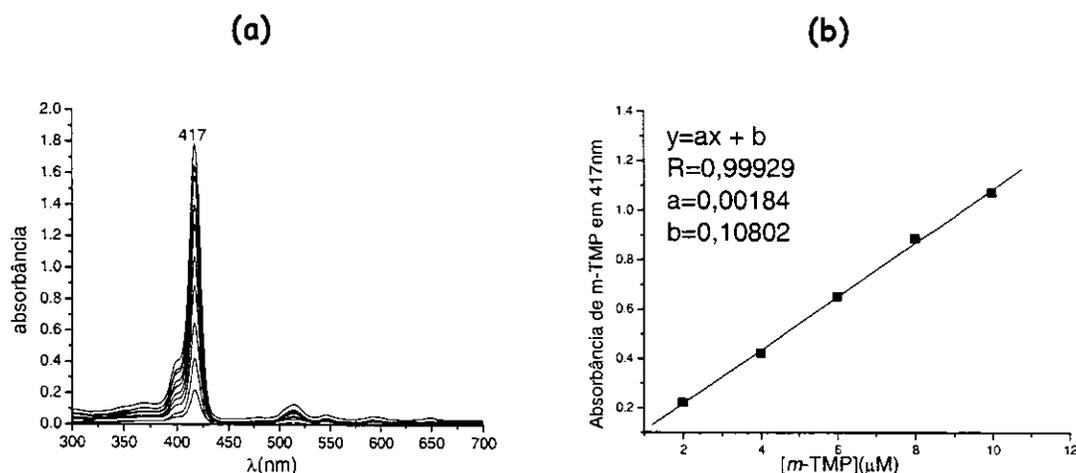


Figura 35. (a) Aumento da absorvância de *m*-TMP em função de sua concentração em octanol e (b) equação da reta determinada para *m*-TMP.

Observa-se que a absorvância da porfirina aumenta linearmente com a sua concentração. Este comportamento permite que esta curva seja usada para determinar a concentração das porfirinas não incorporadas nos lipossomas e que, no sistema bifásico, migraram para o octanol. A Figura 36 mostra as absorvâncias das porfirinas não incorporadas, que migraram para o octanol. Diminuindo-se a concentração de porfirina não incorporada, da concentração total de porfirina, utilizada no processo de encapsulamento, obteve-se as porcentagens de encapsulamento das porfirinas nos lipossomas (Tabela 4).

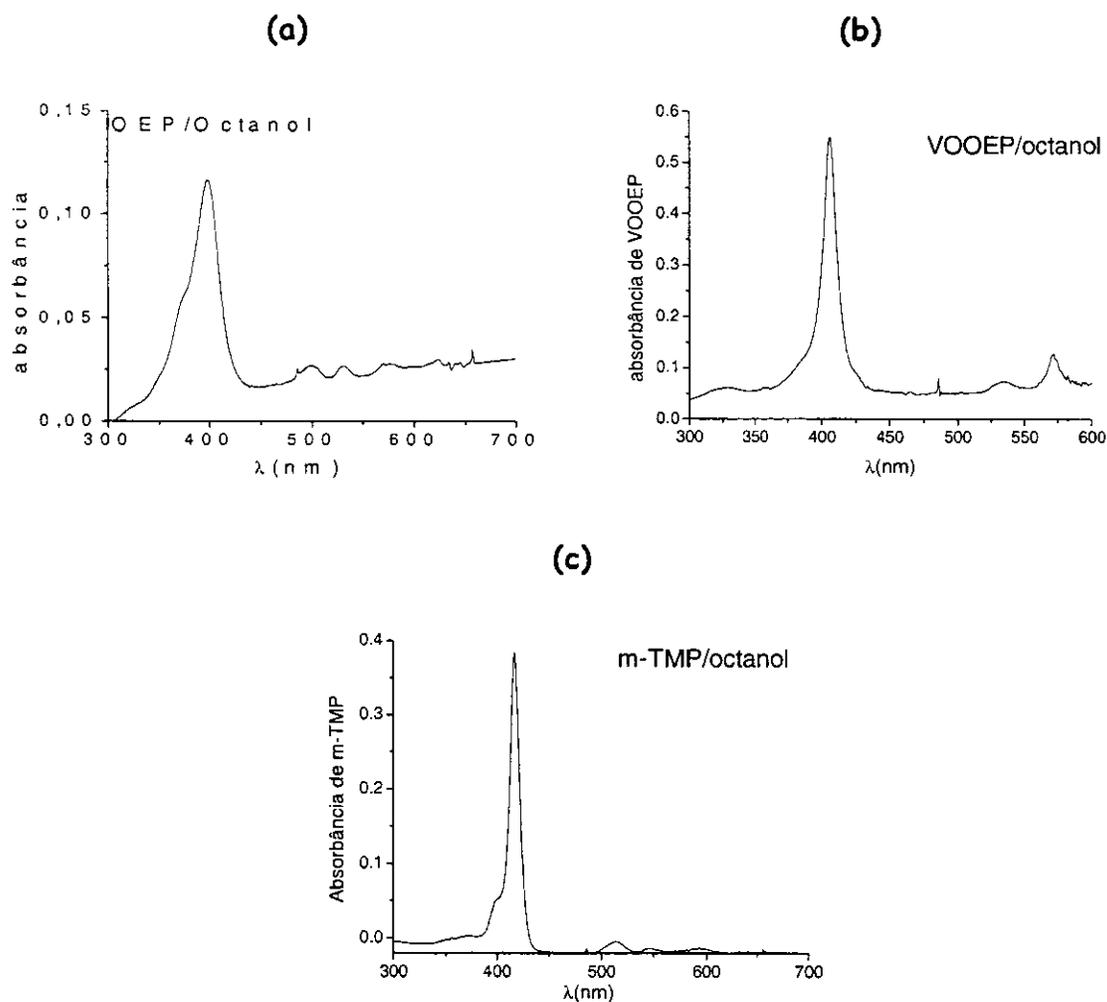


Figura 36. Espectros de absorvância de moléculas de OEP (a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c) que não foram incorporadas em lipossomas e migraram para octanol no sistema bifásico composto de solução aquosa de lipossoma e octanol.

Tabela 4. Valores de porcentagem de incorporação das porfirinas em lipossomas. Os valores representam a média de três processos de encapsulamento \pm desvio padrão amostral

Porfirinas	% de encapsulamento
OEP	79,7 \pm 10,6
VOOEP	61,3 \pm 14,7
<i>m</i> -TMP	65,8 \pm 12,4

4.12. Determinação da constante de supressão de fluorescência

Em 1993 Chatterjee e seus colaboradores¹⁰⁹ demonstraram que o método de supressão de fluorescência, utilizando-se um agente supressor, pode ser empregado para se descobrir a localização de um fotossensibilizador num lipossoma. Sendo assim, utilizou-se o método de supressão de fluorescência, empregando-se o iodeto como agente supressor. Este método teve como finalidade, verificar se houve a incorporação das porfirinas pelas vesículas lipossomais, especificamente entre as cadeias dos fosfolipídios. As Figuras 37 e 38, mostram que, na ausência de lipossoma, as fluorescências de m-TMP e OEP, são eficientemente suprimidas pelo iodeto. No entanto, na presença de lipossoma isso não ocorre.

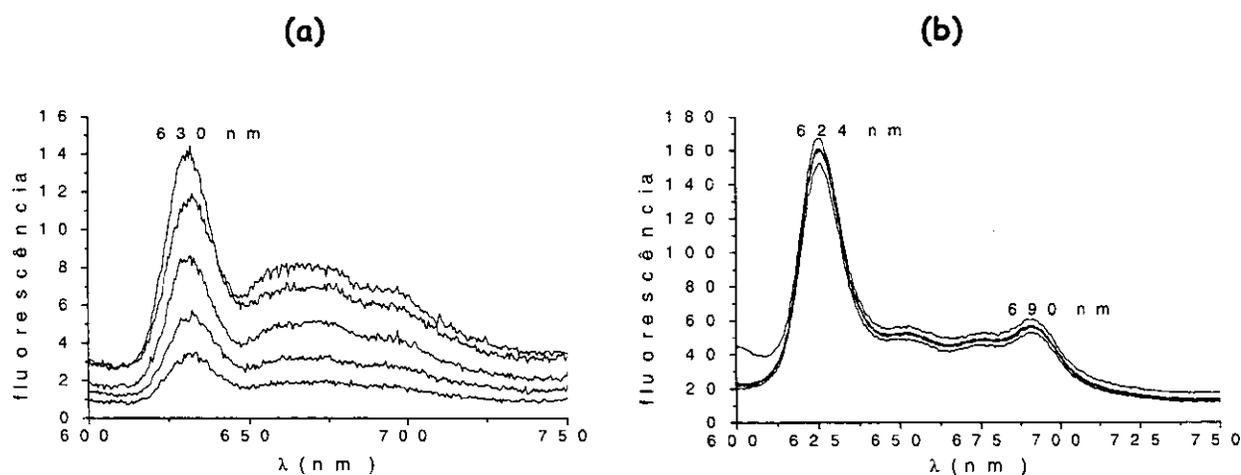


Figura 37. Supressão da fluorescência de OEP, por iodeto, na ausência (a) e presença (b) de lipossoma. Experimento realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4.

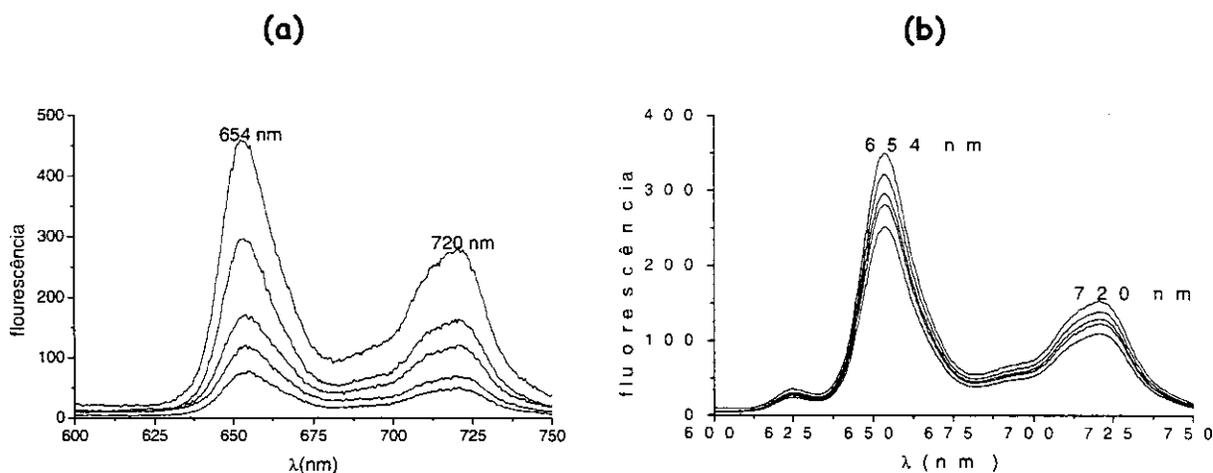


Figura 38. Supressão da fluorescência de *m*-TMP, por iodeto, na ausência (a) e presença (b) de lipossoma. Experimento realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4.

Sabe-se que o íon iodeto suprime a fluorescência de uma substância somente quando a mesma estiver na região hidrofílica, fora da vesícula lipossomal¹¹⁰. Sendo assim, pode-se concluir que, neste caso, as porfirinas OEP e *m*-TMP foram incorporadas pelas vesículas lipossomais. A Tabela 5 também confirma este fato mostrando que os valores da constante de supressão são maiores na ausência de lipossoma.

Tabela 5. Valores das constantes de supressão de fluorescência de OEP e *m*-TMP, por iodeto, na ausência e presença de lipossoma

Porfirinas	ks na ausência de lipossoma (L.mol ⁻¹)	ks na presença de lipossoma (L.mol ⁻¹)
OEP	15,21	0,50
<i>m</i> -TMP	25,18	1,83

Para VOOEP não foi possível tirar conclusões, sobre a incorporação desta porfirina, baseando-se em constante de supressão, uma vez que em meio aquoso esta substância não possui um espectro de fluorescência definido para se fazer uma comparação com o espectro das moléculas de VOOEP incorporadas nos lipossomas. No entanto temos uma evidência de que esta porfirina pode ter sido incorporada pelos lipossomas, já que, na presença das vesículas lipossomais, o espectro de VOOEP possui uma melhor definição. A Figura 39 mostra os espectros de VOOEP, em meio aquoso, na presença e ausência de lipossoma. Pode-se concluir então que se VOOEP possui um espectro bem definido somente em meio apolar, como acontece quando está em clorofórmio (Fig. 14), então é bem provável que tenha sido incorporado pelas vesículas lipossomais estando alojado entre as cadeias apolares dos fosfolipídios.

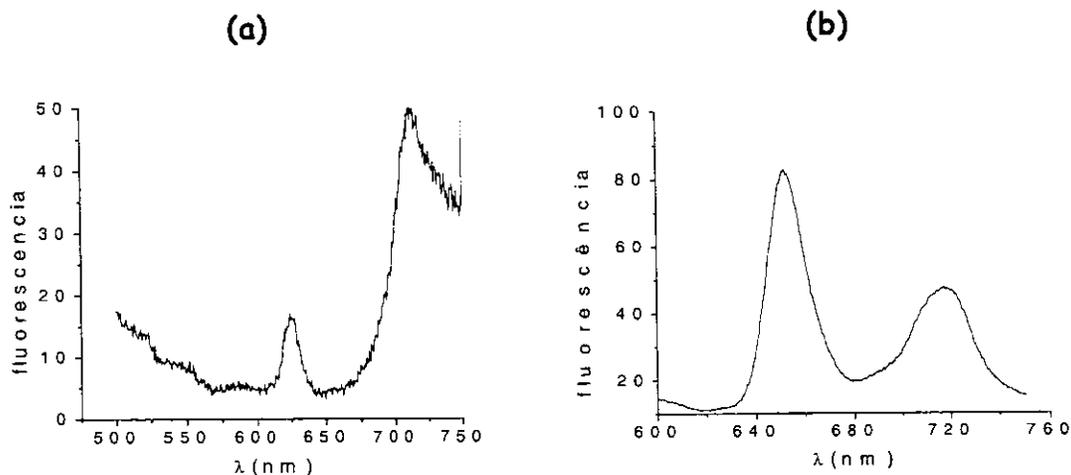


Figura 39. Espectros de fluorescência de 10 μ M de VOOEP na ausência (a) e presença de lipossoma (b). Na ausência de lipossoma o meio utilizado continha tampão PBS pH 7,4; Tween 20[®] 0,6% (m/v) e solvente orgânico 2% (v/v) (tetrahydrofurano para OEP e VOOEP e acetato de etila para *m*-TMP). Na presença de lipossoma utilizou-se um meio tamponado com PBS pH 7,4.

4.13. Foto-destruição de células e determinação de constante de dimerização na presença de lipossoma

A Figura 40 revela que na presença de lipossoma as porfirinas são mais eficientes na foto-destruição de células de eritrócitos.

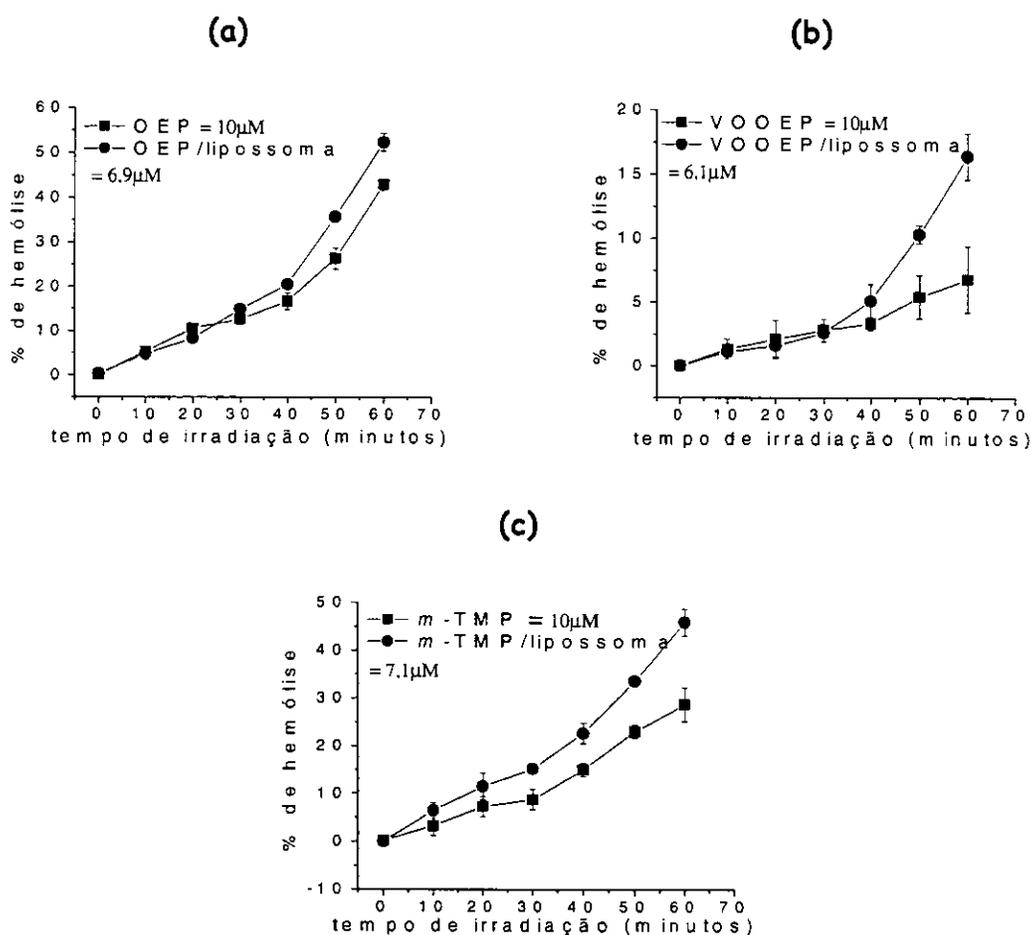


Figura 40. Foto-destruição de células de eritrócitos na presença e ausência de lipossoma e de OEP (a), VOOEP (b) e *m*-TMP (c). Experimento realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4.

É interessante ressaltar que, para este experimento, as concentrações de OEP, VOOEP e *m*-TMP, em lipossomas, foram determinadas como sendo 6,9;

6,1; e 7,1 μ M respectivamente, sendo menores do que a concentração de 10 μ M utilizada para as porfirinas não encapsuladas. Isto mostra que o encapsulamento aumentou a eficiência fotodinâmica das porfirinas, já que as mesmas apresentaram um melhor resultado mesmo em menores concentrações. Estes resultados são interessantes em termos de tratamento clínico, pois menores dosagens acarretam menos efeitos colaterais e menor custo de tratamento. A melhora na eficiência destas porfirinas pode ser devido ao fato de que o processo de encapsulamento pode ter diminuído a agregação das mesmas. Sabe-se que monômeros absorvem mais energia e possuem um tempo de vida maior no estado triplete excitado tornando mais eficiente o processo de transferência de energia e/ou elétrons para o oxigênio e assim, gerando mais EROs. Neste estudo pode-se verificar, através dos valores da constante de dimerização na Tabela 6, que houve formação de menos agregados das porfirinas, na presença de lipossomas. As porfirinas encapsuladas apresentaram valores de K_D menores do que as não encapsuladas. Esta menor formação de dímeros pode ser decorrente da interação das moléculas das porfirinas com a cadeia hidrofóbica dos fosfolipídios, o que diminui a interação entre as próprias moléculas das porfirinas¹¹¹. Além disso, o processo de encapsulamento, ao isolar as moléculas de porfirinas uma das outras, evita a perda de energia por processos colisionais e vibracionais¹¹².

Tabela 6. Valores de K_D para OEP e *m*-TMP, na ausência e presença de lipossoma. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral

Porfirinas	$K_D/10^5$ na ausência de lipossoma	$K_D/10^5$ na presença de lipossoma
OEP	4,01 \pm 0,08	1,93 \pm 0,07
<i>m</i> -TMP	3,91 \pm 0,05	2,11 \pm 0,15

4.14. Estabilidade das vesículas lipossomais na presença e ausência de colesterol

Um dos principais problemas em se utilizar formulações à base de lipossomas, é a estabilidade¹¹³. A mobilidade dos fosfolipídios, que constituem a membrana do lipossoma, permite a entrada de água para o interior da vesícula, e perda do fármaco para o meio externo. Uma maneira de evitar este problema é preparar a formulação na presença de colesterol. Este último fará parte da bicamada fosfolipídica, se localizando na parte hidrofóbica da mesma. Sua presença aumenta a interação hidrofóbica entre as cadeias, diminuindo a mobilidade dos fosfolipídios. Isto proporciona maior uma rigidez na membrana lipossomal, aumentando sua estabilidade¹¹⁴.

Uma maneira de se verificar a estabilidade de lipossomas, contendo fotossensibilizador, é medir a absorbância do FTS durante um dado período de tempo. Uma queda significativa na absorbância do FTS pode indicar baixa estabilidade da formulação. Isto ocorre provavelmente devido a dois fatores principais. Primeiro, o inchamento da vesícula lipossomal leva a um aumento da turbidez do meio. Tal evento provoca espalhamento da radiação e diminui a absorção de luz por parte do FTS. Segundo, a mobilidade da camada fosfolipídica permite que o FTS escape para o meio exterior aquoso e forme agregados. Uma vez que os agregados absorvem menos radiação do que os monômeros, isto explicaria a diminuição da absorção de luz pelo FTS, à medida que o lipossoma perde sua estabilidade.

A Figura 41 revela que quando o colesterol está presente na formulação, a queda na intensidade das absorbâncias de OEP, VOOEP e *m*-TMP é consideravelmente menor do que a que ocorre em formulações com ausência

de colesterol. Além disso, nota-se também, que após um período de 10 dias, uma nova sonicação, das formulações, faz com que as absorbâncias das porfirinas aumentem a intensidade novamente.

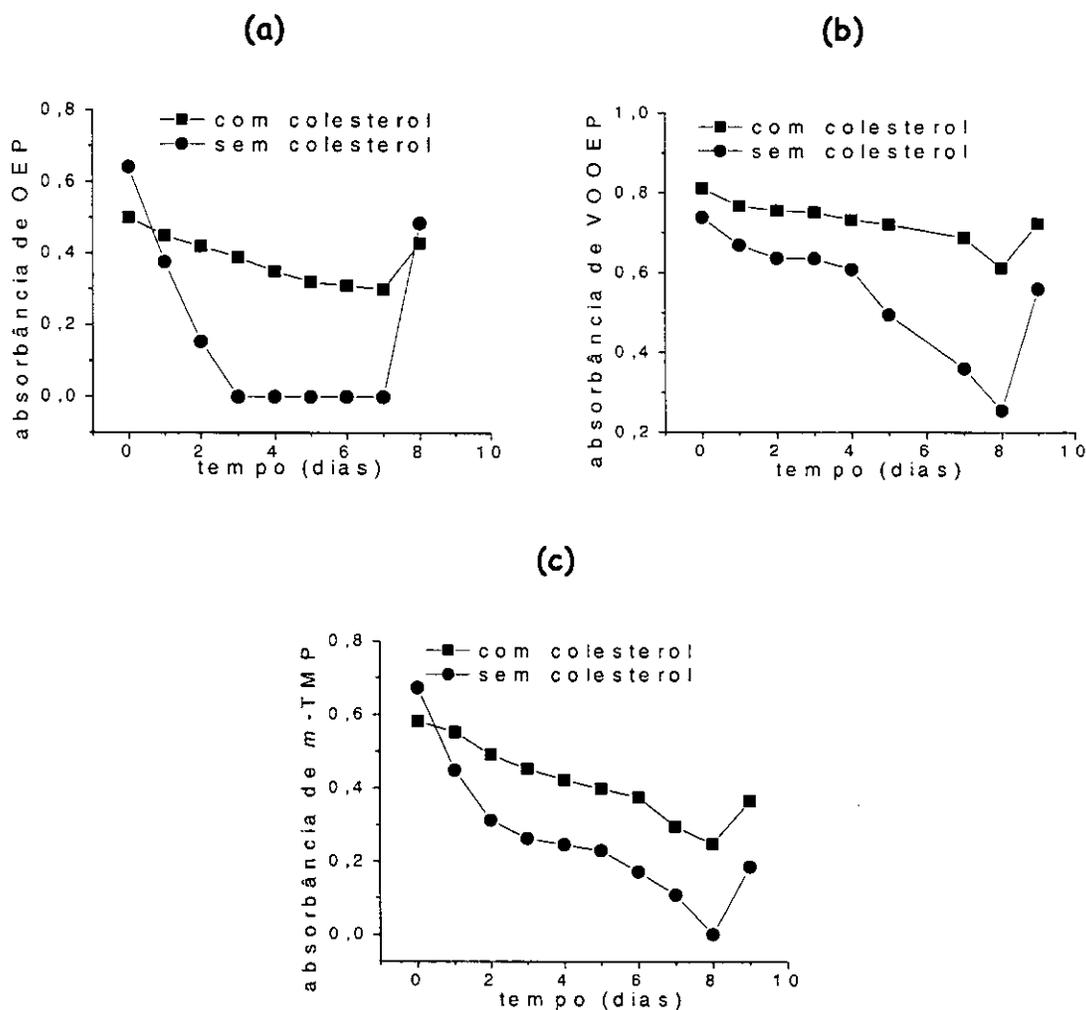


Figura 41. Estabilidade das formulações (porfirina/lipossoma) na presença e ausência de colesterol. Estabilidade verificada através da absorbância de OEP medida em 398 nm (a), de VOOEP medida em 408 nm (b) e de *m*-TMP medida em 418 nm (c) em função do tempo. No nono dia foi realizada a sonicação para restabelecer a absorbância. Este experimento foi realizado num meio contendo tampão PBS pH 7,4.

Os resultados desta etapa indicam que, ao reduzir o tamanho das vesículas lipossomais, a sonicação diminui a turbidez do meio, reduzindo, assim, o espalhamento de luz. No entanto, a sonicação não recupera totalmente a absorbância que as porfirinas tinham no primeiro dia de "vida" da formulação. Este evento sugere que houve perda de porfirinas para o meio exterior.

É interessante ressaltar que as células do nosso corpo vivem a uma temperatura de 37°C. Nesta temperatura, há uma maior mobilidade das cadeias dos fosfolipídios formadores da membrana celular. O fato é que a presença de colesterol nestas membranas, ajuda a diminuir a mobilidade dos fosfolipídios, aumentando a estabilidade^{115,116,117,118,119}. Isto pode ser comparado ao que ocorreu neste projeto. As vesículas lipossomais utilizadas aqui, são do tipo DMPC e possuem um ponto de fusão próximo dos 25 °C. O que significa que, acima desta temperatura, o lipossoma passa da fase cristal, para a fase gel, onde os fosfolipídios possuem maior mobilidade¹¹³. Uma vez que a estabilidade foi avaliada a temperatura ambiente, isto explicaria o porque da baixa estabilidade das formulações sem colesterol. A exemplo do que ocorre nas células do nosso corpo, a adição de colesterol às formulações deu maior estabilidade às mesmas na temperatura ambiente.

Deve-se ressaltar, também, que o emprego de colesterol nas formulações é bastante útil em termos de aplicação clínica, pois as vesículas lipossomais estarão circulando pelo organismo que possui uma temperatura de 37 °C. Tal temperatura está bem acima da temperatura de transição de fase (fusão) do fosfolipídio DMPC.

5. Conclusões

Os resultados obtidos indicam que tanto OEP, quanto VOOEP e *m*-TMP são capazes de causar a foto-oxidação de biomoléculas e a foto-destruição de eritrócitos via mecanismo tipo II, ou seja, com participação do oxigênio singlete. Além disso, pôde-se constatar que OEP é mais eficiente que *m*-TMP e VOOEP. Estes resultados concordam com as medidas de parâmetros fotofísicos que demonstram uma maior eficiência de OEP em relação a VOOEP. É possível notar que a presença do grupo vanadil (V=O), no anel porfirínico de OEP, diminui a seu tempo de vida no estado triplete e rendimento quântico de produção de oxigênio singlete, o que acarreta numa menor eficiência na foto-oxidação de biomoléculas e na foto-destruição de eritrócitos. Este efeito negativo pode estar relacionado com o paramagnetismo de V=O. Em relação à *m*-TMP, a sua rápida foto-degradação, na presença de laser, dificulta sua aplicação clínica, uma vez que o laser é a fonte de radiação mais empregada em TFD.

Um outro fato interessante é que as porfirinas não apresentaram toxicidade no escuro. Isto é um pré-requisito muito importante para que uma substância possa ser empregada em TFD. Foi observado, também, que é possível encapsular OEP, VOOEP e *m*-TMP, em vesículas lipossomais e que a estabilidade destas formulações é maior na presença de colesterol. Este resultado é bastante relevante, pois em tratamentos clínicos existe a necessidade do encapsulamento do fármaco para evitar problemas como falta de seletividade, baixa solubilidade, baixa penetração na célula e perda do medicamento durante seu trajeto para o tecido alvo. Além disso, o

encapsulamento diminuiu a formação de agregados, o que resultou num aumento da eficiência fotodinâmica das porfirinas.

6. Referências bibliográficas

¹ WYNGAARDEN JB, SMITH Jr. LH, BENNETT JC. *Tratado de Medicina Interna*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 19ª edição, vol.1, 1215p., 1992.

² MORI L. *Ciência Hoje*, v.30, n.180, p.32, 2002.

³ BRADSHAW RA, PRENTIS S. *Oncogenes and Growth Factors*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1st edition, 306p., 1987.

⁴ FORMAN MR, HURSTING SD, UMAR A, BARRETT JC. *Ann. Rev. Nutr.*, v.24, p.223, 2004.

⁵ SRAELS LG, ISRAELS ED. *Stem Cells*, v.17, p.306, 1999.

⁶ PIVETTA M. *Pesquisa Fapesp*, n.99, p.46, 2004.

⁷ MACHADO AEH. *Quim. Nova*, v.23, n.2, p.237, 2000.

⁸ DUARTE CJ.

http://www.cienciaviva.mct.pt/healthXXI/topics.asp?lang=pt&acao=cnc3_doc_pt. Acessada em agosto de 2004.

⁹ MACDONALD IJ, DOUGHERTY TJ. *J. Porphyrins Phthalocyanines.*, v.5, p.105, 2001.

¹⁰ BONNETT R. *Chem. Soc. Rev.*, v.24, n.1, p.19, 1995.

¹¹ OLEINICK NL, MORRIS RL, BELICHENKO I. *Photochem Photobiol. Sci.*, v.1, p.1, 2002.

-
- ¹² LEE WY, LIM DS, KO SH, PARK YJ, RYU KS, AHN MY, KIM YR, LEE DW, CHO CW. *J Photochem. Photobiol. B.*, v.75, n.3, p.119, 2004.
- ¹³ KANEKO T, CHIBA H, YASUDA T, KUSAMA K. *Oral Oncology*, v.40, n.8, p.787, 2004.
- ¹⁴ FOOTE CS. *Photochem. Photobiol.* v.54, n.5, p.659, 1991.
- ¹⁵ PARKER JP, STANBRO WD. *J. Am. Chem. Soc.*, v.104, p.2067, 1982.
- ¹⁶ FOOTE CS. *Free Radical Biol.*, v.2, p.85, 1976.
- ¹⁷ WASSERMAN HH, MURRAY RW. *Singlet Oxygen*. Academic Press, 1st edition, 337p., 1979.
- ¹⁸ VIA DL, MAGNO SM. *Curr. Med. Chem.*, v.8, p.1405, 2001.
- ¹⁹ RIBEIRO JN, SILVA AR, JORGE RA. *J. Braz. Med. Lab.*, v.40, n.6, p.385, 2004.
- ²⁰ ARVELO F. *Acta Cient. Venez.*, v.53, p.297, 2002.
- ²¹ VALLS V, PEIRO C, MUNIZ P, SAEZ GT. *Process Biochemistry* v.40, n.2, p.903, 2005.
- ²² USUDA J, CHIU SM, AZIZUDDIN K, XUE LY, LAM M, NIEMINEN AL, OLEINICK NL. *Photochem. Photobiol.*, v.76, n.2, p.217, 2002.
- ²³ REINERS JJ, CARUSO JA, MATHIEU P, CHELLADURAI B, YIN XM, KESSEL D. *Cell Death Differ.*, v.9, n.9, p.934, 2002.
- ²⁴ XUE LY, CHIU SM, OLEINICK NL. *Oncogene*, v.20, n.26, p.3420, 2001.
- ²⁵ ZHUANG SG, LYNCH MC, KOICHEVAR IE. *Exp. Cell Res.*, v.250, n.1, p.203, 1999.
- ²⁶ CHAN WH, YU JS, YANG SD. *Biochem. J.*, v.351, p.221, 2000.

-
- ²⁷ LAM M, OLEINICK NL, NIEMINEN AL. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.47379, 2001.
- ²⁸ KESSEL D, CASTELLI M. *Photochem. Photobiol.*, v.74, n.2, p.318, 2001.
- ²⁹ GRANVILLE DJ, CASSIDY BA, RUEHLMANN DO, CHOY JC, BRENNER C, KROEMER G, VAN BREEMEN C, MARGARON P, HUNT DW, MCMANUS BM. *Am. J. Pathol.*, v.159, n.1, p.305, 2001.
- ³⁰ ALI SM, CHEE SK, YUEN GY, OLIVO M. *Int. J. Mol. Med.*, v.9, n.6, p.601, 2002.
- ³¹ GREBENOVA D, KUZELOVA K, SMETANA K, PLUSKALOVA M, CAJTHAMLOVA H, MARINOV I, FUCHS O, SOUCEK J, JAROLIM P, HRKAL Z. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.69, n.2, p.71, 2003.
- ³² KIM KK, KAWANO Y, YAMAZAKI Y. *Anticancer Res.*, v.23, n.3B, p.2355, 2003.
- ³³ CAI XW, GU Y, LIU TCY, DING XM, LIU FG. *Lasers Surg. and Med.*, v.141, p.45, 2004.
- ³⁴ BARBERI-HEYOB M, VEDRINE PO, MERLIN JL, MILLON R, ABECASSIS J, POUPON MF, GUILLEMIN F. *Int. J. Oncol.*, v.24, n.4, p.951, 2004.
- ³⁵ NONAKA M, IKEDA H, INOKUCHI T. *Photochem. Photobiol.*, v.79, n.1, p.94, 2004.
- ³⁶ BARGE J, DECREAU R, JULLIARD M, HUBAUD JC, SABATIER AS, GROB JJ, VERRANDO P. *Exp. Dermatol.*, v.13, n.1, p.33, 2004.
- ³⁷ FERREIRA SDRM, TEDESCO AC, SOUSA G, ZANGARO RA, SILVA NS, PACHECO MTT, PACHECO-SOARES C. *Lasers Med. Sci.*, v.18, n.4, p.207, 2004.

- ³⁸ SPIKES JD. *Photobiology of porphyrins. In porphyrin localization and treatment of tumors*. DOIRON DR, GOMER CJ (eds). ALAN R Liss, New York, 257p., 1984.
- ³⁹ NYMAN ES, HYNINEM PH. *J. Photochem. Photobiol B*, v.73, p.1, 2004.
- ⁴⁰ SIMPLÍCIO, FI. *Quim. Nova*. v.25, n.5, p.801, 2002.
- ⁴¹ KIM CS, LEE CH, LEE PH, HAN S. *Mol. Cells*, v.17, n.2, p.347, 2004.
- ⁴² DAZIANO, JP. *Photochem. Photobiol.*, v.69, n.4, p.712, 1996.
- ⁴³ CROUCH AM, LANGFORD CH. *J. Photoch. Photobiol. A*, v.52, p.55, 1990.
- ⁴⁴ YU C, XU S, CHEN S, ZHANG M, SHEN T. *J. Photochem. Photobiol B*, v.68, p.73, 2002.
- ⁴⁵ SILVA AR. *Análise das propriedades fotossensibilizantes do In (III)-mesotetrafenilporfirina para uso em terapia fotodinâmica*. Campinas-SP. Dissertação de mestrado- Instituto de Química-UNICAMP, 97p., 2003.
- ⁴⁶ KESSEL D. *Photochem. Photobiol.*, v.54, n.2, p.193, 1991.
- ⁴⁷ RODER B. *Chem. Phys.*, v.269, p.339, 2001.
- ⁴⁸ KONAN YN, GURNY R, ALLÉMANN E. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.66, p.89, 2002.
- ⁴⁹ LICHTENBERG D, BARENHOLZ Y. *Method Biochem. Anal.*, v.33, p.337, 1988.
- ⁵⁰ SZOKA Jr. F, PAPAHA DJOPOULOS D. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, v.9, p.467, 1980.
- ⁵¹ SANTOS NC, CASTANHO MARB. *Quim. Nova*, v.25, n.6B, p.1181, 2002.
- ⁵² www.avantilipids.com. Acessada em julho de 2004.

- ⁵³ BANGHAM AD. *J. Mol. Biol.*, v.13, p.238, 1965.
- ⁵⁴ SESSA G, WEISSMANN G. *J. Lipid Res.*, v.9, p.310, 1968.
- ⁵⁵ GREGORIARDIS G. *FEBS Lett.*, v.14, p.95, 1971.
- ⁵⁶ NUNES SMT, SGUILLA FS, TEDESCO AC. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, p.587, 2003.
- ⁵⁷ JIANG F, LILGE L, LOGIE B, LI Y, CHOPP M. *Photochem. Photobiol.*, v.65, n.4, p.701, 1997.
- ⁵⁸ BOURRE L, THIBAUT S, FIMIANI M, FERRAND Y, SIMONNEAUX G, PATRICE T. *Pharmacol. Res.*, v.47, n.3, p.253, 2003.
- ⁵⁹ RODRIGUEZ ME, AWRUCH J, DICELIO L. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, v.6, n.2, p.122, 2002.
- ⁶⁰ KRISTIAN B, MOAN J. *Photochem. Photobiol.*, v.65, n.3, p.403, 1997.
- ⁶¹ POSTIGO F, MORA M, MADARIAGA MA, NONELL S, SAGRISTÁ ML. *Int. J. Pharm.*, v.278, p.239, 2004.
- ⁶² DOUGHERTY TJ, GOMER CJ, HENDERSON BW, JORI G, KESSEL D, KORBELIK M, MOAN J, PENG Q. *J. Nat. Cancer. Inst.*, v.90, p.889, 1998.
- ⁶³ Laser Medical Research Foundation. <http://209.41.253.5:80/pdt@lmrf>. Acessada em janeiro 2004.
- ⁶⁴ National Cancer Institute. <http://cancernet.nci.nih.gov>. Acessada em janeiro de 2004.
- ⁶⁵ DOUGHERTY TJ. *Photochem. Photobiol.*, v.45, p.879, 1987.
- ⁶⁶ RAZUM N, BALCHUM OJ. *Photochem. Photobiol.*, v.46 p.925, 1987.
- ⁶⁷ TABER SW, FINGAR VH, COOTS CT, WIEMAN TJ. *Clin. Cancer. Res.*, v.4, p.2741, 1998.

- ⁶⁸ MANG TS, ALLISON R, HEWSTON G. *Cancer J. Sci. Am.*, v.4, p.378, 1998.
- ⁶⁹ PRIMBS GB, CASEY R, WAMSER K. *Ophthalmic Surg. Lasers*, v.29, p.832, 1998.
- ⁷⁰ PASCU ML, STAIKU A, VOICU L, BREZEANU M, CARSTOCEA B, PASCU R, GAZDARU D. *Anticancer Res.*, v.24, n.5A, p.2925, 2004.
- ⁷¹ BREZOVA V, DVORANOVA D, KOSTALOVA D. *Phytotherapy Res.*, v.18, n.8, p.640, 2004.
- ⁷² KOSTENICH GA, ZHURAVKIN IN, ZHAVRID EA. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.22, p.211, 1994.
- ⁷³ HOSTANSKA K, REICHLING J, BOMMER S, WEBER M, SALLER R. *Pharmazie*, v.57, n.5, p.323, 2002.
- ⁷⁴ GLINSKI JA, DAVID E, HANSEN G, LEONARD SF, PITNER P, PAV S, ARVIGO R, BALICK MJ, PANTI E, GROB PM. *Photochem. Photobiol.*, v.62, n.1, p.144, 1995.
- ⁷⁵ KIM KK, KAWANO Y, YAMAZAKI Y. *Anticancer Res.*, v.23, n.23B, p.2355, 2003.
- ⁷⁶ OLDHAM TC, PHILLIPS D. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.55, p.16, 2000.
- ⁷⁷ TEDESCO AC, ROTTA JCR, LUNARDI CN, *Curr. Org. Chem.*, v.7, p.187, 2003.
- ⁷⁸ MARGALIT R, ROTENBERG M. *Biochem. J.*, v.219, p.445, 1984.
- ⁷⁹ JEFFREY GH, BASSETT J, MENDHAN J, DENNEY RC. *Vogel: Análise Química Quantitativa*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 5ª edição, 712p., 1992.
- ⁸⁰ EICHWURZEL I, STIEL H, RODER B. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.54, p.194, 2000.

-
- ⁸¹ GOUTERMAN M. *J. Mol. Spectrosc.*, v.6, p.138, 1961.
- ⁸² KALYANASUNDARAM K. *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*. Academic Press, New York, 626p., 1992.
- ⁸³ SIBATA CH, COLUSSI VC, OLEINICK NL, KINSELLA TJ. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.33, p.869, 2000.
- ⁸⁴ LI R, BOUNDS DJ, GRANVILLE D, IP SH, JIANG H, MARGARON P, HUNT DWC. *Apoptosis*, v.8, n.3, p.269, 2003.
- ⁸⁵ SEGALLA A, BORSARELLI CD, BRASLAVSKY SE, SPIKES JD, RONCUCCI G, DEI D, CHITI G, JORI G, REDDI E. *Photochem. Photobiol. Sci.*, v.1, p.641, 2002.
- ⁸⁶ WESTHEAD EW. *Methods Enzymol.*, v.25B, p.401, 1972.
- ⁸⁷ SILVESTER JA. *Free Rad. Biol. Med.*, v.24, n.5, p.754, 1998.
- ⁸⁸ BAGNATO VS, MARCASSA LG, MARCASSA JC, CESTARI G, FERREIRA J, KURACHI C. *Guia Prático de Terapia Fotodinâmica para o Tratamento de Tumores*. São Carlos, 1ª edição, 111p., 2002.
- ⁸⁹ Ciba Foundation Symposium 146. *Photosensitizing Compounds: Their Chemistry, Biology and Clinical Use*. John Wiley & Sons Ltd, London, 241p., 1989.
- ⁹⁰ SPIKES JD. *Photochem. Photobiol.*, v.55, p.797, 1992.
- ⁹¹ POTTER WR, MANG TS, DOUGHERTY TJ. *Photochem. Photobiol.*, v.46, p.97, 1987.
- ⁹² BARREIRO EJ, SILVA JFM, FRAGA CAM. *Quim. Nova*, v.19, n.6, p.641, 1996.
- ⁹³ AGOSTIANO A, CATUCCI L, COSMA P, FINI P. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v.5, p.2122, 2003.

-
- ⁹⁴ YU JH, WANG XS, ZHANG BW, WENG YX, ZHANG L. *Langmuir*, v.20, n.5, p.1582, 2004.
- ⁹⁵ KUZNETSOVA NA, GRETSOVA NS, DERKACHEVA VM, KALIYA OL, LUKYANETS EA. *J. Porphyrins and Phthalocyanines*, v.7, n.3, p.147, 2003.
- ⁹⁶ MUSSI L. *Eficiência fotodinâmica das protoporfirinas IX de magnésio e zinco*. Campinas-SP. Dissertação de mestrado - Instituto de Química-UNICAMP, 73p., 2003.
- ⁹⁷ SCONFIENZA C, VANDEVORST A, JORI G. *Photochem. Photobiol.*, v.31, n.4, p.351, 1980.
- ⁹⁸ INOUE K, MATSUURA T, SAITO I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, v.55, p.2959, 1995.
- ⁹⁹ SPIKES JD, VANLIER JE, BOMMER JC. *J. Photochem. Photobiol. A*, v.91, p.193, 1995.
- ¹⁰⁰ PAOLIS A, CHANDRA S, CHARALAMBIDES AA, BONNETT R, MAGNUS IA. *Biochem. J.*, v.226, p.757, 1985.
- ¹⁰¹ ZAVODNIK IB. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.67, p.1, 2002.
- ¹⁰² ALI IA. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1523, p.225, 2000.
- ¹⁰³ ATKINS P, PAULA J. *Físico Química*. 7ª edição, Editora LTS, Rio de Janeiro, 593p., 2002.
- ¹⁰⁴ GANTCHEV TG, VANLIER JE. *Photochem. Photobiol.*, v.62, n.1, p.123, 1995.
- ¹⁰⁵ MCCORD JM, FRIDOVIC I. *Federation Proceedings*, v.28, n.2, p.346, 1969.
- ¹⁰⁶ HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3th edition, Oxford University Press, New York, 936p., 1999.

-
- ¹⁰⁷ DAMOISEAU X, SCHUITMAKER HJ, LAGERBERG JWM, HOEBEKE M. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.60, p.50, 2001.
- ¹⁰⁸ HOEBEKE M, DAMOISEAU X, SCHUITMAKER HJ, VAN DE VORST A. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1420, p.73, 1999.
- ¹⁰⁹ CHATTERJEE M, BERA SC, CHATTERJEE AB, NANDY P, ROHATGIMUKHERJEE KK. *J. Photochem. Photobiol. A*, v.72, n.3, p.209, 1993.
- ¹¹⁰ MONTERO MT, BORRELL JH, NAG K, KEOUGH KMW. *Anal. Chim. Acta*, v.90, p.290, 1994.
- ¹¹¹ BRAULT D. *J. Photochem. Photobiol. B*, v.6, p.79, 1990.
- ¹¹² RENDELL D. *Fluorescence and Phosphorescence*. John Wiley & Sons, New York, 419p., 1987.
- ¹¹³ LASIC DD, PAPAHAJDOPOULOS D. *Medical Applications of Liposomes*. Elsevier, Amsterdam, 779p., 1998.
- ¹¹⁴ JANOFF AS. *Liposomes Rotational Design*. Marcel Dekker Inc., New York, 451p., 1999.
- ¹¹⁵ LEHNINGER AL, NELSON DL, COX MM. *Princípios de Bioquímica*. 2ª Edição, Editora Sarvier, São Paulo, 839p., 2000.
- ¹¹⁶ BERG JM, TYMOCZKO JL, STRYER L. *Biochemistry*. 5th edition, W.H. Freeman and Company, New York, 974p., 2001.
- ¹¹⁷ BLOOM M, EVANS E, MOURISTSEN OG. *Q. Rev. Biophys.*, v.24, p.413, 1990.
- ¹¹⁸ YEAGLE PL, ALBERT AD, BOESZE-BATTAGLIA K, YOUNG J, FRYE J. *Biophys. J.*, v.57, p.413, 1990.
- ¹¹⁹ NEAGLE JF, TRISTRAM-NEAGLE S. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.10, p.474, 2000.