

**Instituto de Química
Universidade Estadual de Campinas _ UNICAMP**

Dissertação de Mestrado

**“EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA DAS
PROTOPORFIRINAS IX DE MAGNÉSIO E ZINCO”**

Lilian Mussi

Orientador: Prof. Dr. Renato Atílio Jorge

Abril – 2003

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Atílio Jorge (Orientador)

Profa. Dra. Adelaide Faljoni Aláριο (IQ-USP-SP)

Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero (IQ-UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **LILIAN MUSSI**, aprovada pela Comissão Julgadora em 28 de abril de 2003.

Prof. Dr. Renato Atílio Jorge
(Presidente da Banca)

"A garantia de nos tornarmos invencíveis está em nossas próprias mãos.
Tornar o inimigo vulnerável só depende dele próprio."

Sun Tzu
A Arte da Guerra

AGRADECIMENTOS

- × Ao *Prof. Dr. Renato Atílio Jorge*, pela orientação, dedicação, paciência e amizade durante todos esses anos de trabalho: *Muito Obrigada!*
- × Aos meus pais, *Agenor e Elisabeta*, a quem devo muito do que sou e muito do que consegui: *Não imagino minha vida sem vocês!*
- × A *Liliane*, pela presença contagiante: *Não existe ninguém no mundo que acredite mais em você do que eu!*
- × Ao *João Marcos*, pela presença, paciência, carinho e amor: *Você mora no meu coração...*
- × Ao *André Romero da Silva*, que muito me ajudou nesse final de tese: *Muitíssimo obrigado pela ajuda e amizade.*
- × Aos *Amigos* que fiz durante os anos de trabalho no Laboratório B200-204: *Agradeço por tê-los conhecido.*
- × A todos os *Funcionários* do Instituto de Química que, de alguma maneira, colaboraram com a realização desse trabalho, em especial, à *Cláudia Martelli*, pela paciência, dedicação e amizade e ao *Sr. Fontana* pela alegria e pelos preciosos ensinamentos de como ser um bom ser humano.
- × Ao *Prof. Fernando Coelho* pelo auxílio no início do trabalho.
- × A *Dilmara Lopes Vicentim* e *Aline Cristina Prezedel* do Hemocentro da UNICAMP, pelas amostras de sangue doadas.
- × Ao *Faep* e *CNPq*, pelo auxílio financeiro no início do projeto.
- × À *FAPESP*, pelo auxílio financeiro na forma de reserva técnica e bolsa.

Lilian Mussi

SÚMULA CURRICULAR

× **Formação Acadêmica**

Bacharel em Química e Bacharel em Química Tecnológica

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Campinas – SP

Técnica em Química

Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antônio Prado” – ETECAP -Campinas -SP

× **Prêmios**

2000 - Prêmio Lavoisier

Concedido pelo Conselho Regional de Química IV Região ao melhor aluno do Instituto de Química da Unicamp no período de 1997 a 2000.

× **Projetos de Pesquisa**

1997 – 1999 Iniciação Científica

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP - Campinas – SP

Orientador: Prof. Dr. Renato Atílio Jorge - Instituto de Química - Depto Físico-Química

Linha de Pesquisa: Interação de metais em plantas: estudo das causas e efeitos do estresse de cátions metálicos sobre grãos.

- Estudo do papel da calmodulina como sítio primário da toxidez do alumínio em trigo.
- Estudo do efeito do Al^{3+} , Ga^{3+} , La^{3+} e de inibidores de canais de ânions na indução de proteínas em um cultivar de trigo resistente ao alumínio.
- Estudo do papel de inibidores de canais de cálcio no mecanismo de toxidez do alumínio em milho.

Apoio: CNPq e FAPESP

× **Participações em Congressos**

Mussi, L.; Jorge, R.A.; *Photodynamic efficiency of Magnesium Protoporphyrin IX and Zinc Protoporphyrin IX*, Caxambu, MG, BRASIL, XXXI Reunião Anual da SBBq, Livro de Resumos J2, v.1, 112, (2002).

Mussi, L.; Jorge, R.A.; Menossi, M., *Aluminum and calcium channel blockers are not altered in the organic acid exudation in maize*, Caxambu, MG, BRASIL, XXIX Reunião Anual da SBBq, Livro de Resumos E75, v.1, 75, (2000).

Mussi, L.; Menossi, M.; Ottoboni, L.M.M.; Arruda, P.; Jorge, R.A., *Effect of trivalent cations and anion channel antagonist in the protein profile of wheat roots*, Caxambú, MG, BRASIL, XVIII Reunião Anual da SBBq, Livro de Resumos E59, v.s/i, 59, (1999).

Mussi, L.; Jorge, R.A., *Efeito de cátions trivalentes e antagonista de canais de anions no perfil de proteínas de raízes de trigo*, Campinas, SP, BRASIL, VII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, Livro de Resumos, v.s/i, 65, (1999).

Mussi, L.; Menossi, M.; Ottoboni, L.M.M.; Arruda, P.; Jorge, R.A., *Organic acids exudation and the role of calmodulin in aluminum toxicity in wheat*, Caxambu, MG, BRASIL, XXVII Reunião Anual da SBBq, Livro de Resumos E-40, v.s/i, 36, (1998).

Mussi, L.; Jorge, R.A., *Estudo do papel da calmodulina como sítio primário da toxidez do alumínio em trigo*, Campinas, SP, BRASIL, VI Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp, (1998).

RESUMO

Título: Eficiência fotodinâmica das Protoporfirinas IX de Magnésio e Zinco

Autora: Lilian Mussi

Orientador: Prof. Dr. Renato Atilio Jorge

Palavras Chave: Terapia fotodinâmica, protoporfirinas, câncer

A eficiência fotodinâmica da protoporfirina IX (PpIX) e de seus derivados de magnésio (MgPpIX) e zinco (ZnPpIX) foram investigados através da comparação da velocidade de fotoxidação de triptofano (Trp), albumina bovina (BSA) e hemácias.

As soluções de biomoléculas foram irradiadas com uma lâmpada de mercúrio, por um período máximo de 120 minutos, e a fotoxidação foi monitorada através de medidas de fluorescência (Trp e BSA) ou absorvância durante a formação de oxihemoglobina (hemácias).

A constante de velocidade de fotoxidação de Trp por PpIX é 0.9 vezes menor que a da ZnPpIX e 3.4 vezes maior que a da MgPpIX. A velocidade de fotoxidação de BSA pela PpIX é 0.8 vezes menor e 1.05 vezes maior (respectivamente, 6 minutos ou 48 minutos de irradiação) que a da ZnPpIX é 1.7 e 1.48 vezes maior (respectivamente, 6 minutos ou 48 minutos de irradiação) que a da MgPpIX.

Soluções de 0.5% (v/v) de hemácias foram irradiadas na presença de $15 \mu\text{mol. L}^{-1}$ de fotossensibilizador. Foi observado que as porcentagens de fotoxidação, após 75 minutos de irradiação, das soluções de hemácias não submetidas a um período de pré-incubação com sensibilizador foi 68%, 57% and 79% para PpIX, MgPpIX e ZnPpIX, respectivamente. A porcentagem de hemólise das células vermelhas do sangue, após 90 minutos de irradiação das soluções submetidas a um período de pré-incubação com sensibilizador foi 97%, 84% e 100% para PpIX, MgPpIX e ZnPpIX, respectivamente.

Os resultados mostraram que a ZnPpIX possui uma eficiência muito similar a da PpIX, tanto para a fotoxidação de moléculas simples como o triptofano, quanto para estruturas complexas como macromoléculas (BSA) e células (hemácias). A eficiência da MgPpIX quando comparada a da PpIX depende do tipo de substrato analisado. Os resultados mostraram que, com o aumento da complexidade da estrutura do substrato (triptofano, BSA e hemácias) ocorre uma diminuição da diferença entre a eficiência fotodinâmica da MgPpIX e da PpIX.

Além disso, verificou-se que o MgPpIX é, dentre os três fotossensibilizadores estudados, o composto que mais está susceptível a fotodegradação nas condições em que foram realizados os estudos. Através da observação do comportamento do MgPpIX com relação a fotodegradação verificou-se que existe a possibilidade de controlar a velocidade de fotodegradação do sensibilizador de modo a manter a capacidade de fotoxidação de biomoléculas enquanto for conveniente e depois degradar totalmente o sensibilizador somente com o aumento da velocidade de fotobranqueamento.

Apesar da MgPpIX apresentar uma menor eficiência no caso do aminoácido, deve-se levar em consideração que a aplicação *in vivo* envolve estruturas complexas. Sendo assim, tanto a ZnPpIX quanto a MgPpIX devem ser consideradas como agentes potenciais para aplicação em PDT.

ABSTRACT

Title: Photodynamic Efficiency of Magnesium and Zinc Protoporphyrins IX

Author: Lilian Mussi

Advisor: Prof. Dr. Renato Atilio Jorge

Key Words: Photodynamic therapy, protoporphyrins, cancer

The photodynamic efficiency of protoporphyrin IX (PpIX) and its magnesium (MgPpIX) and zinc (ZnPpIX) derivatives were investigated by comparing the rate of tryptophan (Trp), bovine albumin (BSA) and erythrocytes photooxidation.

The solutions of the biomolecules were irradiated with a mercury lamp, for a maximum period of 120 minutes and their photooxidations were monitored in measuring the fluorescence (Trp and BSA) or absorbance of oxyhemoglobin formation (erythrocytes).

The photooxidation rate constant of PpIX is found to be 0.9 times lower than ZnPpIX and 3.4 times greater than MgPpIX. The BSA photooxidation rates of PpIX were found to be 0.8 times lower or 1.05 times greater than ZnPpIX and 1.7 times or 1.48 times greater than MgPpIX after 6 or 48 minutes of irradiation, respectively.

Solutions of 0.5% (v/v) erythrocytes were irradiated in the presence of 15 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ photosensitizers. It was observed that the percentages of erythrocytes photo-oxidation, after 75 minutes of irradiation of the solution not submitted to a pre-incubation time with the sensitizer, were 68%, 57% and 79% for PpIX, MgPpIX and ZnPpIX, respectively. The percentages of red blood cell haemolysis, after 90 minutes of irradiation of the solution submitted to a pre-incubation time were 97%, 84% and 100%, respectively.

These results show that ZnPpIX has similar efficiency as PpIX for the photooxidation of simple molecules as Trp, as well as for complex structures of macromolecules (BSA) and cells (red blood cells). The efficiency of MgPpIX when compared with PpIX depends on the kind of substrate analyzed. The results show that the increasing of the structure complexity decreases the difference between the MgPpIX and PpIX photodynamic efficiency.

In addition, it was verified that MgPpIX is, among the three photosensitizers studied, the most susceptible compound for photobleaching under the conditions studied. Through MgPpIX photobleaching behavior it was verified that it is possible to control the

velocity of sensitizer photobleaching and keep the photooxidation capacity of biomolecules when it is convenient, and then, to degrade totally the photosensitizer by just increasing the photobleaching rate.

Despite the fact that the MgPpIX is less efficient for aminoacids, it must be considered that *in vivo* application of photodynamic therapy involves complex structures. Thus, ZnPpIX and MgPpIX should be considered as potential agents for photodynamic therapy.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Histórico.....	1
1.2	Mecanismos.....	2
1.3	Crítérios básicos para a eficiência de um fotossensibilizador.....	4
1.3.1	Pureza.....	4
1.3.2	Toxicidade e estabilidade.....	5
1.3.3	Parâmetros fotofísicos.....	5
1.3.4	Absorção de luz.....	5
1.3.5	Hidrofilicidade e hidrofobicidade.....	6
1.3.6	Estado de agregação do fotossensibilizador.....	6
1.3.7	Transporte e incorporação do fotossensibilizador pelas células.....	7
1.4	Como determinar a eficiência de um fotossensibilizador.....	7
1.5	Os fotossensibilizadores.....	9
2	OBJETIVO E JUSTIFICATIVA.....	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1	Reagentes e Equipamentos.....	16
3.2	DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FOTOFÍSICAS DAS PROTOPORFIRINAS.....	17
3.2.1	Determinação dos comprimentos de onda de excitação de emissão do fotossensibilizador.....	17
3.2.2	Otimização das condições de fotoxidação.....	17
3.2.2.1	Escolha do solvente e estudo do estado de agregação do fotossensibilizador.....	18
3.2.2.1.1	Influência de surfactantes no estado de agregação do fotossensibilizador.....	18
3.2.2.1.2	Otimização do meio: Tampão / Surfactante.....	18
3.2.2.2	Otimização da lâmpada de irradiação.....	19
3.2.3	Estudo do estado de agregação do fotossensibilizador.....	21
3.2.3.1	Determinação da Constante de Dimerização.....	21
3.2.4	Constante de velocidade de fotodegradação.....	23
3.3	EFICIÊNCIA DOS FOTOSSENSIBILIZADORES.....	23
3.3.1	Fotoxidação de Biomoléculas.....	23
3.3.1.1	Triptofano (Trp):.....	23

3.3.1.2	Albumina Bovina (BSA):	24
3.3.2	Hemólise de células vermelhas do sangue.....	24
3.3.2.1	Lise das hemácias por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.....	24
3.3.2.2	Influência da concentração de MgPpIX, PpIX e ZnPpIX na hemólise de células vermelhas do sangue.	25
3.3.2.3	Hemólise pós-irradiação por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.....	26
3.3.2.4	O cálculo da porcentagem de hemácias lisadas.....	26
3.3.2.5	Controle do fotobranqueamento dos fotossensibilizadores.	27
3.3.3	Cálculo das Constantes de Velocidade.	28
3.3.4	Cálculo da média amostral e do desvio padrão.	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRABALHO.....	30
4.1.1	Influência da concentração de Tween 20 no estado de agregação do MgPpIX.	30
4.1.1.1	Influência de surfactantes e da lâmpada de irradiação na fotoxidação de L-triptofano.	31
4.2	ESPECTROS DE EMISSÃO E EXCITAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES.....	35
4.3	ESTUDO DO ESTADO DE AGREGAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR	38
4.3.1	Determinação da Constante de Dimerização de MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.	39
4.4	EFICIÊNCIA DOS FOTOSSENSIBILIZADORES.....	42
4.4.1	Fotoxidação de Biomoléculas por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.	42
4.4.1.1	Triptofano.	42
4.4.1.2	Albumina Bovina (BSA).....	44
4.4.2	Hemólise de células vermelhas do sangue.....	48
4.4.2.1	Lise das hemácias por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.....	48
4.4.2.2	Influência da concentração de MgPpIX, PpIX e ZnPpIX na hemólise de células vermelhas do sangue.	51
4.4.2.3	Hemólise pós-irradiação por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.....	55
4.4.3	Considerações finais sobre a fotoxidação de biomoléculas e hemácias.....	58
4.5	FOTOBANQUEAMENTO DE MgPpIX, PpIX E ZnPpIX.	59
4.5.1	Controle de fotobranqueamento dos fotossensibilizadores em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v).	59
4.5.2	Controle de fotobranqueamento dos fotossensibilizadores em PBS pH 7,4 / Tween 20 0,045% (v/v).	61
5	CONCLUSÃO	66
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Geração de estados excitados em fotossensibilizadores e espécies reativas de oxigênio. A faixa de energia do estado singlete excitado do fotossensibilizador é referente a naftalocianina de zinco tetrassulfonada ($\lambda=770$ nm) e porfirina de zinco ($\lambda=470$ nm), respectivamente. A faixa de energia do estado triplete excitado do fotossensibilizador é referente à porfirina ($\lambda_T=798$ nm) e ftalocianina de zinco ($\lambda_T=470$ nm), respectivamente'.....	3
Figura 2: Estrutura da Porfina	9
Figura 3: Protoporfirina IX.	10
Figura 4: Biossíntese do grupo Heme e formação da Protoporfirina IX.....	11
Figura 5: Metaloprotoporfirina IX. Nesse projeto M pode ser zinco ou magnésio.	13
Figura 6: Sistema montado durante os ensaios que envolviam irradiação de soluções.	17
Figura 7: Espectros de absorção na região do UV-Vis do (A) Triptofano em Tampão Fosfato pH 7,2/T20 1,0% (v/v) (B) Triton X-100 1,0% (v/v) em Tampão Fosfato pH 7,2 e (C) Tween 20 1,0% (v/v) em Tampão Fosfato pH 7,2.	19
Figura 8: Espectro de emissão da lâmpada de halogênio.	19
Figura 9: (A) Espectro de emissão da lâmpada de mercúrio e Espectro de emissão da lâmpada de mercúrio sobreposto ao espectro de absorção de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de (B) PpIX (C) MgPpIX e (D) ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v).	20
Figura 10: Efeito da concentração de Tween 20 na intensidade de fluorescência de MgPpIX $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em Tampão Fosfato pH 7,2 /Tween 20 ($\lambda_{\text{excitação}} = 422$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 595$ e 650 nm).	30
Figura 11: A) Perfil de fotoxidação de $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triptofano e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 /TX-100 1,0% (v/v) ($\lambda_{\text{excitação}} = 285$ nm) B) Perfil de emissão dos solventes: Tampão Fosfato pH 7,2 /TX-100 1,0% ($\lambda_{\text{excitação}} = 288$ nm) e Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 2,0% ($\lambda_{\text{excitação}} = 272$ nm).	32
Figura 12: Fotoxidação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Trp por $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 /Tween 20 1,0%: variação da intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação com lâmpada de halogênio ($\lambda_{\text{excitação}} = 285$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 350$ nm).....	33
Figura 13: Fotobranqueamento de uma solução contendo $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX em tampão Fosfato pH 7,2/ T20 1,0% (v/v), na ausência de Trp, durante irradiação com A) lâmpada de Hg e B) lâmpada de halogênio ($\lambda_{\text{excitação}} = 422$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 650$ nm).	34
Figura 14: Espectros de absorção e de emissão de uma solução $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de (A) PpIX (B) MgPpIX e (C) ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v). Para a obtenção do perfil de emissão, $\lambda_{\text{excitação}} = 408$ nm para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX	36
Figura 15: Espectro de absorbância na região de 450 a 700 nm de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de (A) Protoporfirina IX ou (B) Protoporfirina IX de Zinco e Tampão Fosfato pH 7.2 / Tween 20 1,0% (v/v).	38

Figura 16: Relação entre intensidade de fluorescência relativa (fluorescência/ fluorescência inicial) e concentração total de PpIX, ZnPpIX e MgPpIX em PBS pH 7.2/Tween 20 1,0% (v/v). [$\lambda_{excitação}$ = 408 nm para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{emissão}$ = 636 nm para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX]. 39

Figura 17: I) Relação entre intensidade de fluorescência e concentração total de porfirina em Tampão fosfato pH 7,2/T20 1,0% (v/v): (A) MgPpIX, (B) PpIX e (C) ZnPpIX. [$\lambda_{excitação}$ = 408 nm para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{emissão}$ = 636 nm para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX] II) Determinação da constante de equilíbrio de dimerização através do gráfico [T]/F x F de (D) MgPpIX (obtido a partir de (A)) (E) PpIX (obtido a partir de (B)) e (F) ZnPpIX (obtido a partir de (C)). 40

Figura 18: Análise da influência da % de Tween 20 na fotoxidação de 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Trp: constante de velocidade de fotoxidação (inclinação da reta) em um meio contendo uma concentração de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de (A) PpIX ou (B) MgPpIX ou (C) ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 0,2%; 0,4% e 1,0% (v/v). [Triptofano: $\lambda_{excitação}$ = 285 nm e $\lambda_{emissão}$ = 350 nm]. Os dados são a média \pm s (n=3). 43

Figura 19: Fotoxidação de BSA por soluções contendo 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de (A) MgPpIX ou (B) PpIX ou (C) ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 1,0% (v/v) [BSA: $\lambda_{excitação}$ = 295 nm e $\lambda_{emissão}$ = 330 nm]. 46

Figura 20: Consumo de aminoácidos triptofano da BSA em soluções contendo 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 1,0% (v/v) irradiação com lâmpada de Hg [BSA: $\lambda_{excitação}$ = 295 nm e $\lambda_{emissão}$ = 330 nm]. Os dados são a média \pm s (n=3). 47

Figura 21: Eficiência da hemólise por irradiação contínua causada por 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX, MgPpIX ou ZnPpIX em soluções de 0,5% (v/v) de hemácias em PBS pH 7,4 / Tween 20 0,045% (v/v) (A) não submetidas à pré-incubação e (B) submetidas à pré-incubação. Os dados são a média \pm s (n=3). 49

Figura 22: Eficiência da hemólise por irradiação contínua causada por (A) PpIX, (B) MgPpIX ou (C) ZnPpIX em soluções de 0,5% (v/v) de hemácias em PBS pH 7,4/ Tween 20 0,045% (v/v) não submetidas à pré-incubação. Os dados são a média \pm s (n=3). 53

Figura 23: Eficiência da hemólise pós-irradiação causada por PpIX 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, MgPpIX 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou ZnPpIX 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; soluções de 0,5% (v/v) de hemácias em PBS/Tween 20 0,045% (v/v). Os dados são a média \pm s (n=2). O tempo anterior ao tempo 0 (zero) minutos corresponde à condição da amostra antes do início da irradiação e o tempo 0 (zero) minutos corresponde à condição da amostra imediatamente após a irradiação. 56

Figura 24: Perfil de fotobranqueamento de soluções contendo 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de (A) MgPpIX (B) PpIX e (C) ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v) submetidas à irradiação com lâmpada de Hg. [$\lambda_{excitação}$ = 408 nm para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{emissão}$ = 636 nm para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX]. 59

Figura 25: Análise de fotodegradação de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX, PpIX ou ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v) submetidas à irradiação com lâmpada de Hg. Os dados são a média \pm s (n=2 para PpIX e MgPpIX e n=3 para ZnPpIX). [$\lambda_{\text{excitação}} = 408 \text{ nm}$ para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{\text{emissão}} = 636 \text{ nm}$ para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX]. 61

Figura 26: Perfil de fotodegradação de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de (A) PpIX (B) MgPpIX e (C) ZnPpIX em PBS/Tween 20 0,045% submetidas à irradiação com lâmpada de Hg [$\lambda_{\text{excitação}} = 408 \text{ nm}$ para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{\text{emissão}} = 636 \text{ nm}$ para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX]. Espectros de Absorção de (A) PpIX (B) MgPpIX e (C) ZnPpIX em PBS/Tween 20 0,045% após 2 horas de irradiação. 63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Condições de análise para determinação da constante de dimerização das Protoporfirinas 22

Tabela 2: Constante de velocidade de fotodegradação de MgPpIX $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em Tampão Fosfato pH 7,2/T20 1,0%. Os dados são a média \pm s (n=3)..... 34

Tabela 3: Constantes de velocidade de fotoxidação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Triptofano em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v). Os dados são a média \pm s (n=3)..... 35

Tabela 4 : Constante de equilíbrio de dimerização (K_d) das protoporfirinas estudadas e faixa de concentração para determinação da constante. Os valores representam a média \pm s (n=3)... 41

Tabela 5:Constantes de dimerização de porfirinas em meio neutro de Tampão Fosfato Salino pH 7,2 e temperatura de 25°C e meio neutro de Tampão Fosfato pH 7,2 contendo 1,0% (v/v) de Tween 20 (nesse caso os dados são a média \pm s; n=3). 42

Tabela 6: Constantes de velocidade de fotodegradação (k_F) do triptofano por Protoporfirina IX, Protoporfirina IX de Magnésio e Protoporfirina IX de Zinco em Tampão Fosfato pH 7,2 contendo diferentes concentrações de Tween 20. Os dados são a média \pm s (n=3). 43

Tabela 7: Análise da eficiência do fotossensibilizador através da razão entre k_F (PpIX) e k_F (metaloPpIX). Os dados são a média \pm s (n=9, para MgPpIX e PpIX e n=10 para ZnPpIX). 44

Tabela 8: Porcentagem de BSA consumida em soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em Tampão Fosfato pH7,2 / Tween 20 1,0% (v/v) após 6 e 48 minutos de irradiação com lâmpada de Hg. e relação % de BSA consumida pela PpIX / % de BSA consumida pela metaloprotoporfirina. Os dados são a média \pm s (n=3). 47

Tabela 9: Porcentagem de hemólise por irradiação contínua em soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em PBS pH 7,4/ Tween 0.045% (v/v) após 90 minutos de irradiação (ensaio sem pré-incubação), e após 75 minutos (ensaio com pré-incubação) de

irradiação com lâmpada de Hg e relação % de hemólise PpIX / % hemólise metaloprotoporfirina . Os dados são a média \pm s (n=3).....	50
Tabela 10: Porcentagem de hemólise por irradiação contínua em soluções contendo PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em PBS pH 7,4/ Tween 0.045% (v/v), após 30 e 90 minutos de com lâmpada de Hg. Os dados são a média \pm s (n=3).	54
Tabela 11: Tempo de irradiação necessário para que soluções contendo PpIX, MgPpIX ou ZnPpIX em PBS pH 7,4/ Tween 0.045% (v/v) atinjam 50% de hemólise. Os dados são a média \pm s (n=3).....	55
Tabela 12: Tempo necessário (pós-irradiação) para que soluções contendo PpIX 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, MgPpIX 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ou ZnPpIX 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em PBS pH 7,4/ Tween 0.045% (v/v) atinjam 50% de hemólise.....	57
Tabela 13: Constante de velocidade de fotodegradação de soluções contendo 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de protoporfirina em Tampão Fosfato pH 7,2 ou PBS pH 7,4 contendo Tween 20. Os dados são a média \pm s (n=2 para PpIX e MgPpIX e n=3 para ZnPpIX). Entre parênteses estão relacionadas às porcentagens de fotossensibilizador consumido (em relação à concentração inicial em solução) após 48 minutos de irradiação com lâmpada de Hg.....	62

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1:Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) e rendimento quântico do estado triplete (ϕ_T) para derivados de mesoporfirinas IX (MESO), tetrafenilporfinas (TPP) e etioporfirinas I (ETIO).	58
--	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A luz tem sido utilizada no tratamento de doenças desde a antiguidade. No entanto, somente na segunda metade do Século XX passou a ser aplicada de maneira significativa na medicina. Uma dessas utilizações, Terapia Fotodinâmica (PDT), é um promissor tratamento para câncer uma vez que essa técnica consiste na administração de um composto fotossensível seguida de sua ativação pela luz, restringindo a ação das drogas à área afetada pela doença. Em geral, os tratamentos contra o câncer têm como alvo células que se multiplicam indiscriminadamente, formando um tumor, no entanto, tratamentos convencionais como a radioterapia e a quimioterapia atingem também tecidos saudáveis.^{1,2}

Os primeiros experimentos envolvendo morte celular através da utilização de luz e fotossensibilizadores foram relatados em 1900 por Oscar Raab. No mesmo ano foi relatada a administração parenteral de fotossensibilizadores em humanos para tratamento de epilepsia, que acabou induzindo dermatites nas áreas expostas ao sol. Essa descoberta levou, em 1903, à primeira aplicação de fotossensibilizadores no tratamento de câncer por Tappenier e Jesionek³⁻⁶.

No entanto, essa descoberta ficou praticamente “esquecida” até a década de 60, quando Lipson e Baldes demonstraram que os fotossensibilizadores (mais precisamente, os derivados de hematoporfirinas) poderiam ser utilizados na localização de tumores. Em 1975, Dougherty *et al* relataram o primeiro caso bem sucedido de cura de tumores em animais utilizando-se PDT^{1,6-10}.

Em 1976, Kelly e Snell realizaram o primeiro estudo de aplicação de PDT em humanos e obtiveram resultados positivos ao tratarem câncer na bexiga com hematoporfirina e luz branca. No mesmo ano, um grupo no Roswell Park Cancer Institute iniciou os estudos clínicos de PDT em tumores cutâneos em estágios avançados cujos resultados foram reportados em 1977 e 1978^{7,11,12}.

Clinicamente, PDT tem sido utilizada no tratamento de câncer cervical, na bexiga, pulmões, estômago, boca, esôfago, órgãos reprodutivos e pele. Devido aos mecanismos de ação, que podem variar entre a morte direta das células do tumor e a oclusão vascular,

a previsão é de que a PDT poderá ser bem efetiva, não somente na oncologia (tratamento de câncer), mas também em oftalmologia (tratamento de degenerações maculares), em dermatologia (tratamento de psoríase) e em imunologia (tratamento de doenças autoimunes)^{1,13-16}.

O processo de tratamento através da PDT inicia-se com a administração sistêmica e/ou tópica do fotossensibilizador, após a qual são aguardadas algumas horas (3 a 96 horas) para que o mesmo seja distribuído no corpo e que se obtenha a máxima diferenciação entre tecido normal e tecido afetado e irradia-se o tumor com luz visível¹⁷.

A regressão de um tumor cutâneo tratado através de PDT envolve, geralmente, as seguintes etapas: necrose massiva do tumor durante as 72 horas posteriores à exposição à luz; formação de uma ferida na região do tumor 3-4 dias após a fototerapia, desaparecimento da ferida e completa regressão do tumor a um tumor não palpável em 7-13 dias, seguida de cicatrização da pele e crescimento dos pelos após 3 semanas¹⁸.

Não existem danos significantes relacionados com a terapia, principalmente depois do desenvolvimento dos chamados fotossensibilizadores de segunda geração: os resultados funcionais após PDT freqüentemente têm se mostrado superiores aos das terapias convencionais¹.

1.2 Mecanismos

A ação fotodinâmica pode ocorrer por dois possíveis mecanismos freqüentemente designados Tipo I e Tipo II. O processo envolvido em ambos os mecanismos está resumido no diagrama de Jablonski (Figura 1)^{17,19,20}.

O mecanismo da reação depende do meio, do fotossensibilizador, do tempo de meia vida do $^1\text{O}_2$ e da estabilidade dos radicais gerados. Em geral, baixas concentrações de oxigênio e estruturas moleculares facilmente oxidadas (fenóis, amins, etc.) ou reduzidas (quinonas, etc.) facilitam reações do Tipo I. Além disso, os aminoácidos cisteína, histidina, tirosina, triptofano e metionina também são susceptíveis a fotoxidação via mecanismo I²¹.

Ácidos nucleicos, enzimas, membranas celulares, mitocôndrias, lisossomos e núcleos são os maiores alvos biológicos dos radicais produzidos e do oxigênio singlete. Eles são rapidamente atacados e provocam a liberação de uma grande variedade de produtos patologicamente reativos, como as prostaglandinas, os tromboxanos e os

leucotrienos. A ativação do sistema complementar e a infiltração de células sanguíneas imunologicamente ativas na região do tumor aumentam o efeito prejudicial desses intermediários iniciando a necrose do tumor²¹.

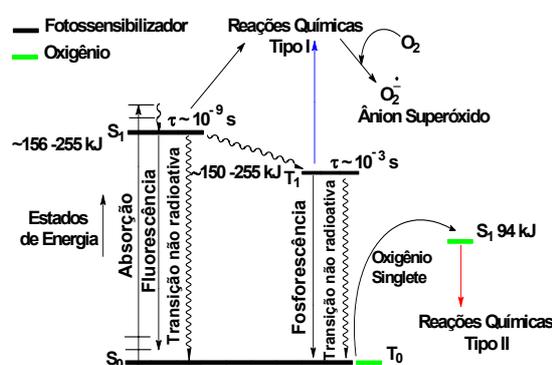
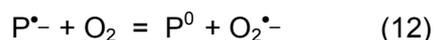
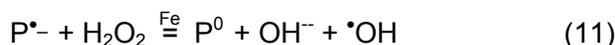
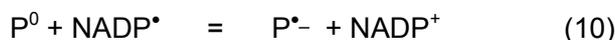
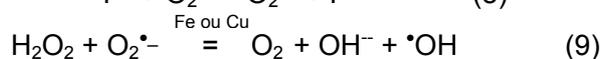
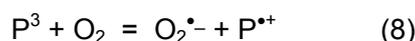
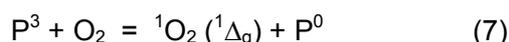
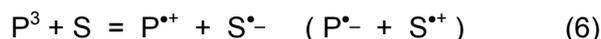
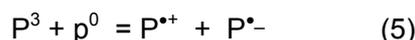
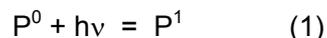


Figura 1: Geração de estados excitados em fotossensibilizadores e espécies reativas de oxigênio. A faixa de energia do estado singlete excitado do fotossensibilizador é referente a naftalocianina de zinco tetrassulfonada ($\lambda=770$ nm) e porfirina de zinco ($\lambda=470$ nm), respectivamente. A faixa de energia do estado triplete excitado do fotossensibilizador é referente à porfirina ($\lambda_T=798$ nm) e ftalocianina de zinco ($\lambda_T=470$ nm), respectivamente^{17,22}.

Oxidações biológicas causadas por sensibilizadores acontecem através de mecanismos fotoquímicos. Um fotossensibilizador no estado fundamental (P^0) absorve fótons de luz, é excitado passando para o estado singlete excitado (P^1) (Eq.1), do qual fluoresce retornando ao estado fundamental (Eq.2). O fotossensibilizador excitado (P^1) inverte seu spin espontaneamente ao passar do estado singlete excitado, para o estado triplete excitado (P^3), através de cruzamento intersistemas (Eq.3). Uma vez formado, o P^3 reage através de:²³

- 1) decaimento radioativo para o estado fundamental com emissão de fosforescência (Eq.4);²³
- 2) reação anaeróbica com sensibilizador no estado fundamental (Eq.5);²³
- 3) reação anaeróbica do Tipo I com substratos orgânicos com formação de radicais aniônicos ou estados catiônicos do sensibilizador e do substrato (Eq.6);²³
- 4) reação do Tipo II, com oxigênio molecular para formar oxigênio molecular singlete (1O_2) através de transferência de energia (Eq.7) ou radical superóxido $O_2^{\bullet-}$ através de transferência de elétrons (Eq. 8).²³



O 1O_2 e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) podem oxidar macromoléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e ácidos graxos polinsaturados e promover a peroxidação de lipídeos. No entanto o papel do $O_2^{\bullet-}$ no efeito fotodinâmico não é claro. O radical superóxido e o seu produto de dismutação, H_2O_2 , podem participar do ciclo de Haber-Weiss e produzir radicais hidroxila (Eq.9), os quais contribuem para o estresse oxidativo. Porfirinas podem sofrer redução por $NADP^{\bullet}$ durante oxidações enzimáticas catalisadas por NADPH e formar um ânion radical de porfirina (Eq.10), que pode substituir o radical superóxido em reações de Fenton (Eq.11) ou produzir $O_2^{\bullet-}$ através da redução de oxigênio molecular (Eq. 12).²³

1.3 Critérios básicos para a eficiência de um fotossensibilizador.

A eficiência de um fotossensibilizador como agente terapêutico está relacionada a determinadas características do composto.

1.3.1 Pureza

Substâncias puras simplificam a interpretação da relação dose-resposta¹⁷.

1.3.2 Toxicidade e estabilidade

A substância deve ter pouca ou nenhuma toxidez na ausência de luz. É desejável que a molécula seja cinética e termodinamicamente estável e que a síntese seja rápida, conveniente e de alto rendimento¹⁷.

1.3.3 Parâmetros fotofísicos

Para aplicações terapêuticas, os parâmetros mais importantes do fotossensibilizador são o rendimento quântico (Φ_T), o tempo de meia vida (τ_T) e a energia (E_T) do estado triplete. A energia do estado triplete deve ser maior ou igual a 94 kJ.mol⁻¹, para que a transferência de energia para o estado fundamental do oxigênio seja eficiente. O tempo de vida do estado singlete de um fotossensibilizador é, em geral, menor que 1 μ s e o principal papel desse estado no mecanismo de fotossensibilização é agir como um precursor do estado triplete metaestável. Para as reações do oxigênio singlete o principal parâmetro é o rendimento quântico do mesmo (Φ_Δ)^{17,24}.

1.3.4 Absorção de luz

A absorção e o espalhamento de luz pelos tecidos aumenta conforme diminui o comprimento de onda (λ).

Os fotossensibilizadores mais eficientes possuem forte banda de absorção, com um alto valor do coeficiente de extinção, chamada banda Q, na região final do vermelho do espectro visível (640 - 700nm). No entanto, os valores de λ não podem ser muito altos por dois motivos: 1) a energia do estado triplete do fotossensibilizador deve ser maior que 94 kJmol⁻¹ (1270nm) para que a transferência de energia do estado triplete do sensibilizador para o estado fundamental do oxigênio seja possível (Figura 1); 2) poderá ocorrer uma redução do potencial de oxidação do sensibilizador, tornando-o menos estável cineticamente e deixando o composto sujeito ao fotobranqueamento^{15,17}

Atualmente, uma grande gama de fontes coerentes e não-coerentes de iluminação podem ser utilizadas na irradiação de fotossensibilizadores, as mais comuns são os lasers: lasers pulsados de argônio, vapor de metal eNd:YAG. No entanto, existem também outros tipos de fontes como o filamento de tungstênio, arco de xenônio, lâmpadas fluorescentes, além daquelas que ainda estão sobre estudo como os LEDs e os lasers de femtosegundo²⁵.

1.3.5 Hidrofilicidade e hidrofobicidade

O caráter hidrofílico/hidrofóbico de um fotossensibilizador influi diretamente no estado de agregação do mesmo e também no seu transporte e incorporação pelas células.

Fotossensibilizadores são compostos sólidos, no entanto, é necessário um meio líquido para propósitos de injeção ou uma emulsão para aplicação tópica. Moléculas anfífilas e polares podem ser dissolvidas em solventes polares, enquanto sensibilizadores hidrofílicos têm sido administrados em lipossomas fosfolipídicas, cujo transporte é feito com a ajuda de lipoproteínas do plasma, ou em emulsão de base óleo¹⁷.

Muitas vezes opta-se por introduzir substituintes polares nas moléculas do fotossensibilizador a fim de conferir certo grau de anfifilicidade e seletividade. Compostos sulfonados, carboxilados, hidroxilados ou substituídos com sal de amônio quaternário são os mais estudados e diferentes interações têm sido observadas em nível molecular, celular e com tecidos do tumor. Tem sido observado que quanto mais hidrofóbico o fotossensibilizador, maior a sua incorporação pelas células do tumor e melhor o efeito da PDT¹⁷.

1.3.6 Estado de agregação do fotossensibilizador

Ao serem introduzidas em um meio incompatível com seu caráter hidrofílico/hidrofóbico, moléculas de fotossensibilizador tendem a sofrer agregação, através da formação de ligações entre as próprias moléculas do sensibilizador de maneira a “criar uma proteção contra o meio em que estão dispersas”, perdendo assim, parte de seu efeito fotodinâmico. A agregação modifica as propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores, diminuindo o tempo de meia vida do estado triplete e o rendimento quântico do oxigênio singlete através da dissipação de energia por conversão interna. Sendo assim, sensibilizadores que facilmente se agregam quando em meio biológico são considerados os menos eficientes no tratamento de câncer por PDT²⁶⁻²⁸.

A agregação pode ser evitada através da adição de baixas concentrações de solventes orgânicos, detergentes, proteínas do sangue ou a incorporação do fotossensibilizador em micelas^{1, 29,30}.

Sabe-se, através de ensaios *in vitro*, que a formação de dímeros e polímeros é um processo rápido e comum em fases aquosas. Então, para analisar-se a amplitude da agregação costuma-se determinar a constante de dimerização de um sensibilizador³¹⁻³³.

1.3.7 Transporte e incorporação do fotossensibilizador pelas células.

In vivo, o transporte de sensibilizadores até os tecidos atingidos pelo tumor é feito através de proteínas do sangue. A albumina é a principal proteína do sangue, encontrada em uma concentração de aproximadamente $0,6 \text{ mmol.L}^{-1}$, em cujas funções inclui-se o transporte de vários metabólitos (ex.: bilirrubina, tetrapirroles, ácidos graxos, triptofano, pequenos cátions, etc.) e moléculas exógenas (ex.: drogas, aditivos de alimentos, etc.) no sistema circulatório^{14,34, 35}.

As lipoproteínas são as responsáveis pela internalização do fotossensibilizador nas células do tumor. Células cancerosas possuem uma elevada concentração de receptores (lipoproteínas de baixa concentração) na membrana citoplasmática. A associação de um fotossensibilizador com a albumina e com a lipoproteína depende do caráter hidrofílico/hidrofóbico do composto³⁵.

1.4 Como determinar a eficiência de um fotossensibilizador

A fotoxidação de aminoácidos é o método mais comum de determinação da eficiência fotodinâmica de um composto. E dentre esses métodos, a análise da supressão da fluorescência do triptofano devido a fotoxidação causada pela excitação do sensibilizador é o mais difundido. A eficácia do fotossensibilizador, (medida em geral através da constante de velocidade de fotoxidação de triptofano), como já foi citado anteriormente (item 1.3) depende de fatores como tipo de mecanismo fotodinâmico, rendimento quântico do oxigênio singlete, coeficiente de extinção do fotossensibilizador utilizado, hidrofobicidade, carga, estado de agregação, meio utilizado para dissolução, etc.^{17,20,21}.

Não só o estudo da fotoxidação de aminoácidos livres como também estudos da fotoxidação de proteínas e, portanto, dos aminoácidos componentes dessas macromoléculas (principalmente o triptofano) servem como parâmetro para a análise da eficiência de um fotossensibilizador. Uma das proteínas mais estudadas é a albumina, a mais abundante proteína do sangue, cuja capacidade de se associar a diferentes compostos justifica a sua função de transportadora de substâncias.

A albumina, como carregador de múltiplos ligantes, interage com substâncias naturais e artificiais através de diferentes sítios de ligação de maneira independente e cooperativa ou competitiva e não competitiva. Essa capacidade de ligação da albumina

está relacionada com sua estrutura flexível que permite a ligação de uma única ou de várias drogas ao mesmo tempo^{34,35}.

As albuminas do sangue contêm dois sítios primários de ligação localizados nos subdomínios IIA e IIIA da proteína. Nesses subdomínios existem cavidades compostas, de um lado, por uma superfície hidrofóbica e de outro, por uma superfície carregada positivamente, o que está diretamente relacionado à capacidade dessa proteína de permitir a ligação indiscriminada de diversos tipos de compostos. Em geral, utiliza-se albumina humana (HSA) ou albumina bovina (BSA) nos experimentos para avaliação da eficiência, no entanto, existem algumas diferenças entre os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do subdomínio IIA da HSA e da BSA, enquanto os aminoácidos e as ligações químicas do sítio de ligação do subdomínio IIIA são praticamente as mesmas. Além disso, a HSA contém somente um resíduo de Trp situado na posição 214, no subdomínio IIA, enquanto a BSA, além do Trp-214, possui um outro resíduo de Trp na posição 135 do subdomínio IB^{36,37}

Alguns estudos têm mostrado que o processo de ligação de sensibilizadores à albumina é acompanhado por mudanças em seus parâmetros fotofísicos, tais como o tempo de meia vida do estado tripleto. Outros estudos indicam que a PDT pode gerar espécies radiculares de tempo de meia vida curto ou espécies no estado excitado que podem danificar a proteína carregadora do fotossensibilizador através de modificações na composição de aminoácidos, denaturação, fragmentação, ligações cruzadas e perda da função original³⁸.

Além do triptofano e da albumina, as células vermelhas do sangue têm sido muito utilizadas como modelo para estudos fototóxicos *in vitro* e assim prever os efeitos *in vivo* dos fotossensibilizadores. A falta de capacidade de prever o comportamento farmacocinético, o metabolismo e a variação de composição das diferentes células é, de certa forma, compensada pela velocidade, facilidade e baixo custo dos ensaios com hemácias, uma vez que célula nenhuma conseguiria reproduzir fielmente *in vitro* o que acontece *in vivo*. As hemácias são, em geral, utilizadas na investigação de mecanismos de fototoxicidade incluindo estudos oxigênio-dependentes e investigação do efeito de “trapeadores” de radicais³⁹.

1.5 Os fotossensibilizadores

Os compostos mais usados em Terapia Fotodinâmica são as porfinas (Figura 2). A porfina é o esqueleto básico para a construção de uma ampla variedade de porfirinas, clorinas, ftalocianinas, etc. A molécula de porfirina e seus derivados químicos são largamente encontrados nos seres vivos: são as unidades centrais em moléculas como a clorofila, hemoglobina e a vitamina B12. As porfirinas de origem animal são completamente substituídas nas posições de 1-8 e diferem uma das outras pela natureza de suas substituições (Figura 2)^{30,40}.

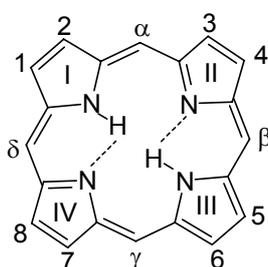


Figura 2: Estrutura da Porfina

O fotossensibilizador mais utilizado atualmente em PDT é o Photofrin[®] (nome comercial do éter/éster de dihematoporfirina), uma mistura complexa de porfirinas derivadas da hematoporfirina com máximo de absorção em $\lambda = 630\text{nm}$ ^{1,13,14}.

Apesar de ser um fotossensibilizador efetivo no tratamento de vários tipos de câncer, o Photofrin[®] apresenta algumas desvantagens como a fotossensibilidade prolongada da pele (4-6 semanas) e uma fraca absorção na região do vermelho. Para sanar esses inconvenientes, novos fotossensibilizadores estão sendo desenvolvidos. Esses novos produtos são quimicamente puros, a fotossensibilidade da pele é pequena e absorvem luz em comprimentos de onda próximos a 650 nm ou maior e com $\epsilon > 10^5 \text{ mol.L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ^{1,7,13,41}.

Dentre esses novos fotossensibilizadores podemos citar os estudos feitos com sensibilizadores de segunda geração, como por exemplo, as clorinas: derivados de benzoporfirina mono ácido (BPD) de $\lambda_{\text{absorção}} = 690 \text{ nm}$ de reduzido período de fotossensibilidade da pele (3-5 dias), mono-l-aspartil clorina e6 (NPe6) de $\lambda_{\text{absorção}} = 654 \text{ nm}$, cuja utilização em PDT tem sido bem efetiva tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esse composto se liga à proteínas do sangue, principalmente albumina, e lipoproteínas de alta densidade^{1,7,42}.

Uma das mais promissoras clorinas é o m-tetrahidroxifenil clorina (mTHPC, Foscan[®]), um composto puro com alta absorção em 652 nm, $\epsilon = 22000 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e alta seletividade por tumores, além de alta velocidade de fotobranqueamento o que reduz os riscos de danos à pele^{1,7,13}.

Outra clorina, cuja eficiência *in vivo* já está sendo estudada, é a 2,3-dihidro-5,15-di(3,5-dihidroxifenil)porfirina, a SIM01. Essa difenilclorina, de forte absorção em 647 nm, apresentou uma alta eficiência fotossensibilizante e uma rápida eliminação pelo tecido quando incorporada em lipossomas de dimiristoil fosfatidilcolina e aplicadas em ratos portadores de adenocarcinoma humano⁴³.

Estudos recentes chamam a atenção para benzoclorina imínio de cobre, um fotossensibilizador catiônico muito seletivo, de $\lambda_{\text{absorção}} = 755 \text{ nm}$ e cujo modo de ação permanece sem elucidação^{7,17}.

Sensibilizadores de terceira geração já começaram a ser estudado também, como é o caso das porfirinas dendrimer, que combinam efeito fotossensibilizante de alta seletividade e reduzida toxicidade sistêmica⁴⁴.

Em tratamento de tumores com Terapia Fotodinâmica a hematoporfirina, considerada um fotossensibilizador externo, pode ser substituída por uma porfirina endógena: a Protoporfirina IX (Figura 3). A protoporfirina IX é substituída por grupos metila, vinila e $-(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$. A nomenclatura oficial para a protoporfirina IX é ácido 1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinilporfina-6,7-dipropiônico^{45,46}.

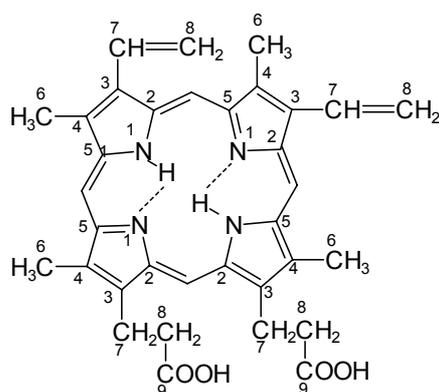
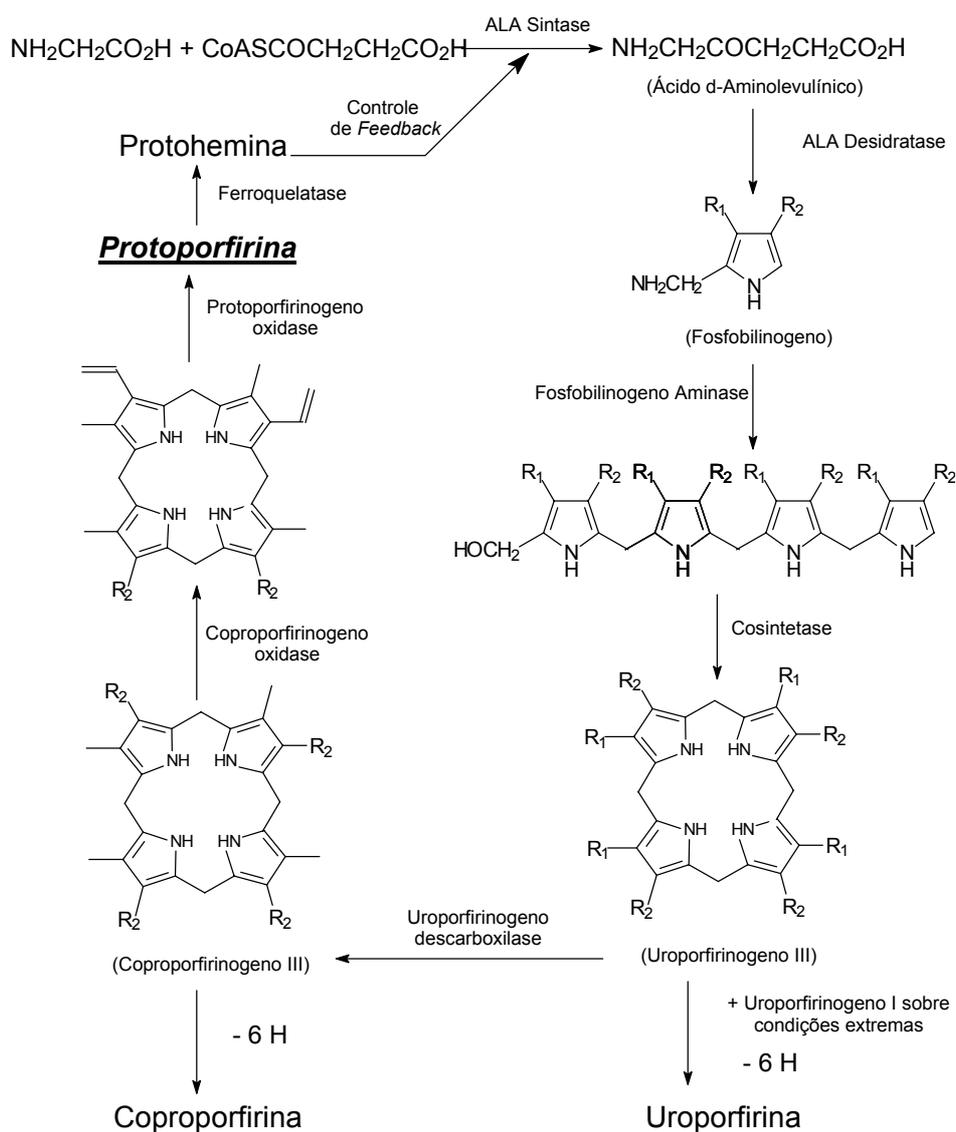


Figura 3: Protoporfirina IX.

A Protoporfirina IX (PpIX) é induzida endogenamente por ácido δ -aminolevulínico (δ -Ala ou simplesmente ALA) e pode ser usada para destruir fotodinamicamente células tumorosas. A geração de PpIX é observada na mitocôndria, seguida pela realocização no

citoplasma e na membrana nuclear. A princípio ALA induz a acumulação de PpIX em tecidos superficiais: epiderme e mucosas conjuntiva, oral, respiratória, vaginal e retal^{45,47}.

O ALA é o iniciador da biossíntese do grupo heme do sangue. Essa biossíntese é controlada por um mecanismo de *feedback* baseado na regulação da produção de ácido δ -aminolevulínico pela concentração de grupo heme (Figura 4). No entanto, se o ALA é artificialmente adicionado ao sistema, as enzimas responsáveis pelos sucessivos estágios da síntese são ativadas e durante a etapa de síntese do grupo heme a protoporfirina é gerada¹⁷.



Onde $\text{R}_1 = -\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ e $\text{R}_2 = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$

Figura 4: Biossíntese do grupo Heme e formação da Protoporfirina IX¹⁷.

Atualmente a utilização de ALA como pró-droga (substância administrada no paciente que, através de reações químicas *in vivo* gera a droga (o metabólito) responsável pelo efeito clínico⁴⁸) está sendo bastante estudada devido às facilidades que esse apresenta, principalmente para aplicações dermatológicas. Seu uso em queratoses actínicas múltiplas já é autorizado pelo FDA nos Estados Unidos desde dezembro de 1999. Além disso, já está em fase de triagem (I e II) em tratamentos de psoríase, carcinoma de células basais e doença de Bowen. O uso de ALA (e conseqüentemente, a geração de PpIX) é considerado um valioso tratamento para câncer de pele não melanômico, bem como para câncer em condições hiperproliferativas e hipervasculares. Existem inúmeros estudos relatando a aplicação de ALA no tratamento de verrugas virais, acne e linfoma de células *T* cutâneas, além de aplicações em outras doenças de pele (eritoplasmia de Queyrat, histiocitose, escleroderma, doença de Paget, etc.). O estudo da aplicação de ALA também abrange PDT em gliomas humanos, sarcoma de Lewis, cistadenocarcinomas no ovário, tumores na bexiga, gastroenterologia (Esofago de Barrett), neoplasia, intraepitelia cervical e sinovite, fotorejuvenescimento, fotodiagnose, etc. No entanto, devido ao curto período de estudo (cerca de 10 anos), não existe nenhum resultado conclusivo sobre o efeito a longo prazo do excesso de ALA e dos derivados gerados durante o processo de síntese do grupo heme. Entretanto sabe-se que os efeitos colaterais em pacientes tratados com protoporfirina IX são reduzidos quando comparados com o tratamento com sensibilizadores exógenos devido à rápida degradação da PpIX em tecidos normais, levando a um curto período de sensibilização da pele^{45, 47-67}.

Em contraste com os inúmeros dados clínicos existentes sobre ALA e PpIX e da preocupação crescente de analisar os efeitos dos derivados produzidos a partir do ALA durante a biossíntese do grupo heme, existe, até o momento, somente um estudo sobre a aplicação de protoporfirina IX exógena em culturas de células tumorais, alguns estudos sobre a aplicação de derivados do ALA (ALA éster de hexila ou éster de metila) para avaliação de distribuição da pró-droga e produção de PpIX, síntese e avaliação de PpIX éster de metila, etc. No entanto, não há relatos sobre a fototoxicidade da molécula se esta estiver complexada a um metal(Figura 5)⁶⁸⁻⁷³.

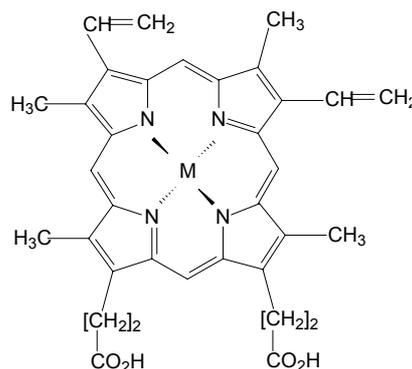


Figura 5: Metaloprotoporfirina IX. Nesse projeto M pode ser zinco ou magnésio.

Uma revisão feita por Labbé *et al*⁷⁴ apresenta um levantamento sobre a protoporfirina IX de zinco, um metabólito natural formado durante a biossíntese do grupo heme quando há insuficiência de íons ferro. Nessa revisão a porfirina de zinco é citada como sendo uma ferramenta de avaliação da nutrição e metabolismo de ferro e um indicativo das condições da medula óssea com reação ao estoque de ferro. Além disso, há indícios de que a ZnPP IX está relacionada à regulação do catabolismo do grupo heme, à produção de monóxido de carbono e de óxido nítrico. É citado também que a ZnPP IX pode ter alguma aplicação terapêutica no controle da formação de bilirrubina em recém-nascidos e servir como medida preventiva para hiperbilirrubinemia. Entretanto não há menção da utilização da metaloprotoporfirina em Terapia Fotodinâmica⁷⁴.

Um outro exemplo de uso da ZnPP IX está relatado em um estudo feito por Zhao *et al*⁷⁵ que analisou a capacidade da ZnPP IX, da protoporfirina e do zinco em reduzir isquemia cerebral focal em ratos no qual chegaram a conclusão de que todos esses compostos contribuíam para a proteção do cérebro contra a isquemia⁷⁵.

Também para a protoporfirina de magnésio não existem estudos relacionados à PDT. A maioria dos estudos analisa as enzimas envolvidas com esse composto (quelatases, transferases).

Karger *et al*⁷⁶ estudaram as subunidades H da enzima protoporfirina de magnésio quelatase de *Synechocystis* e *Rhodobacter* visando analisar a formação dos diferentes anéis pirrólicos necessários a esses organismos. A protoporfirina de magnésio quelatase foi escolhida para estudo, pois catalisa o primeiro passo na síntese de (bacterio)clorofilas: a inserção de um íon magnésio em um anel de protoporfirina IX. Foram analisados parâmetros relacionados à formação de porfirina utilizando-se deuteroporfirina como substrato para a enzima.⁷⁶

Além de estar relacionada à síntese de anéis pirrólicos em bactérias, a enzima protoporfirina de magnésio quelatase também é parte integrante da síntese de clorofila em plantas e por isso é muito estudada. Enquanto Papenbrock *et al*⁷⁷ investigaram a contribuição regulatória da enzima no fluxo de metabólitos em plantas de tabaco transgênicas, Petersen *et al*^{78,79} analisaram a distribuição de ATPase e a troca entre ATP e ADP fosfatase nas subunidades da protoporfirina de magnésio quelatase de *Chlorobium vibrioforme* e *Synechocystis* PCC6803 e a estrutura e organização de uma região do genoma da bactéria *Chlorobium vibrioforme* que continha os genes de codificação da proteína⁷⁷⁻⁷⁹.

Popperl *et al*⁸⁰ analisaram precursores da clorofila em plantas de tabaco e cevada que cresceram em regime de luz/escuridão e determinaram níveis flutuantes de MgPpIX e seu monometil éster relacionando essa flutuação a mudanças dependentes de luz⁸⁰.

2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

A constante procura por compostos que apresentem ótimo efeito terapêutico e mínimo efeito colateral além da possibilidade de utilização da terapia fotodinâmica não só no tratamento de câncer, mas também em outras áreas da medicina faz como que o estudo de novos fotossensibilizadores seja de grande importância.

Desse modo, o objetivo desse projeto é analisar a eficiência *in vitro* dos derivados metálicos da Protoporfirina IX: a Protoporfirina IX de Magnésio e a Protoporfirina IX de Zinco comparando-as à eficiência da própria PpIX de modo a avaliar a possibilidade futura da utilização desses derivados como fotossensibilizadores em PDT.

Primeiramente é necessário avaliar as características do fotossensibilizador (estado de agregação e fotobranqueamento do sensibilizador) nas condições de análise. Determinadas essas características, o estudo da eficiência dos fotossensibilizadores é feito *in vitro* através da análise da fotoxidação de biomoléculas (aminoácido triptofano e proteína albumina bovina) e hemólise de células do sangue (modelo celular).

A análise dos dados obtidos através dos ensaios propostos permitirá avaliar a capacidade fotodinâmica da MgPpIX e da ZnPpIX frente à eficiência da PpIX.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Equipamentos

A Protoporfirina IX (sal dissódico), a Protoporfirina IX de Magnésio (sal dissódico) e a Protoporfirina IX de Zinco foram obtidos da empresa Porphyrin Products, Inc.

Os surfactantes Triton X-100 e Tween -20 juntamente com o aminoácido L-Triptofano e o reagente Fosfato de Sódio Monobásico são da empresa Sigma. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água deionizada.

O sangue utilizado para o ensaio de hemólise foi gentilmente cedido pelo Hemocentro do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Os equipamentos utilizados estão listados a seguir:

- Balança Analítica Mettler AE200
- Microbalança Perkin Elmer AD-6 Autobalance
- Espectrofluorímetro:
 - PTI® LS-100™ -Luminescence System LS-100™
 - SLM Aminco® SPF-500TM- Spectrofluorometer with Nozone
 - ISS Spectrophotometer
- Espectrofotômetro
 - Hewlett Packard 8452A - Diode Array
 - Agilent 8453 - Diode Array
- Lâmpadas de Irradiação:
 - Lâmpada Tubular de Halogênio R75 500W da Sylvania
 - Lâmpada de Mercúrio HPLN 80 W da Phillips
- Banho Termocontrolador B. Braun Melsungen 851253
- Ultrassom ULTRASONIK da Ney Tech
- Centrífugas:
 - NT-811 da Nova Técnica
 - Revan Centrífuga 14000D da Revan Instrumentos Científicos

A Figura 6 mostra a aparelhagem utilizada durante os ensaios que envolviam irradiação de soluções.

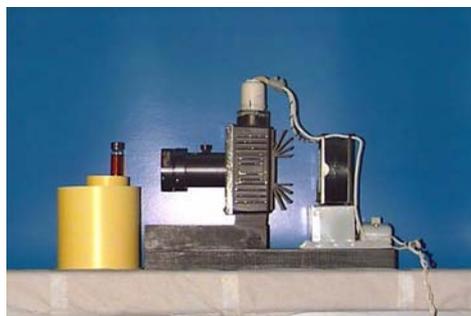


Figura 6: Sistema montado durante os ensaios que envolviam irradiação de soluções.

3.2 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FOTOFÍSICAS DAS PROTOPORFIRINAS

3.2.1 Determinação dos comprimentos de onda de excitação de emissão do fotossensibilizador.

O comprimento de onda de excitação de uma solução $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada fotossensibilizador em Tampão Fosfato pH 7,2 contendo 1,0% (v/v) de Tween 20 foi obtido através do espectro de absorção na região do UV-Visível. Os comprimentos de onda de emissão dos fotossensibilizadores foram obtidos no Espectrofluorímetro PTI através da excitação da molécula no comprimento de onda de máxima absorção previamente determinado através do espectro de absorção de cada fotossensibilizador.

3.2.2 Otimização das condições de fotoxidação.

Utilizou-se o fotossensibilizador MgPpIX para a realização dos testes de otimização do meio e da lâmpada. Para isso foram realizados os seguintes experimentos:

3.2.2.1 Escolha do solvente e estudo do estado de agregação do fotossensibilizador.

3.2.2.1.1 Influência de surfactantes no estado de agregação do fotossensibilizador.

Sabe-se que porfirinas podem existir nas formas monomérica ou agregada quando em solução aquosa. Sabe-se também que a adição de surfactantes ao meio causa a monomerização da porfirina via incorporação dentro das micelas. Essa incorporação, consequentemente, provoca um aumento da absorvidade molar da banda de Soret, desse modo, é possível verificar a influência da concentração de surfactante no estado de agregação da porfirina através do acompanhamento da variação da absorbância ou da intensidade de fluorescência do fotossensibilizador com a variação da porcentagem de tensoativo presente. Nessa análise optou-se por acompanhar a variação da fluorescência do composto⁸¹.

Para otimização da concentração de surfactante presente em tampão fosfato, fixou-se a concentração de MgPpIX em $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e variou-se a porcentagem de Tween 20 em Tampão Fosfato pH 7,2 (0,0 a 1,0%).

A excitação do MgPpIX foi feita no comprimento de onda de 422 nm (banda de Soret). A emissão foi verificada em uma faixa de comprimento de onda de 575 a 730 nm. Utilizaram-se fendas de excitação e de emissão de 4 nm. Para essa análise foi utilizada uma cubeta de quartzo triangular de lados iguais a 1,4x1x1 cm.

3.2.2.1.2 Otimização do meio: Tampão / Surfactante.

Durante a otimização das condições para realização da fotoxidação de triptofano verificou-se que o meio estava interferindo diretamente na análise. Desse modo, foi necessário verificar se a emissão dos solventes Tampão Fosfato pH 7,2 / TX-100 1,0% (v/v) e Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 2,0% (v/v) estava ligada à essa interferência. Foram obtidos espectros de absorção na região de 190 a 820 nm de forma a verificar o comprimento de onda de maior absorbância do conjunto tampão/surfactante.

Como tanto o Triton X-100, quanto o Tween 20 apresentaram $\lambda_{\text{excitação}}$ muito próximo do $\lambda_{\text{excitação}}$ do triptofano (Figura 7), foi necessário verificar se a emissão de ambos era significativa o suficiente para interferir na emissão do triptofano. Desse modo, os meios foram excitados nos comprimentos de onda pré-determinados pelos espectros

de absorção correspondentes e a fluorescência foi medida numa faixa de comprimento de onda de 305 a 750 nm. Para essas análises foi utilizada uma cubeta de quartzo triangular de lados iguais a 1,4x1x1 cm. As fendas de excitação e de emissão foram mantidas em 4nm.

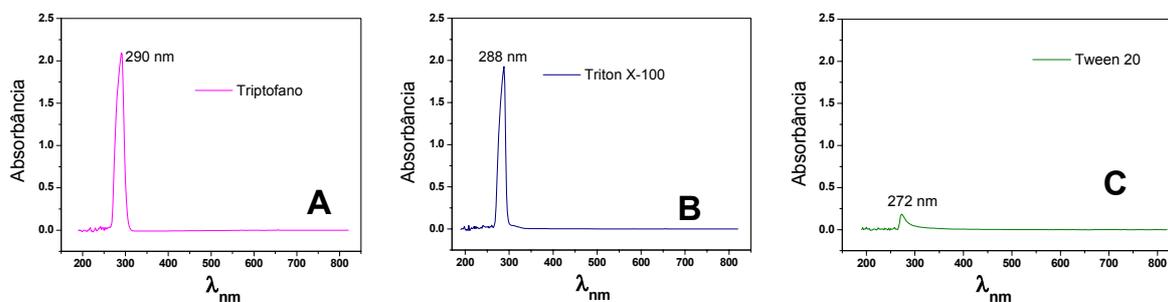


Figura 7: Espectros de absorção na região do UV-Vis do **(A)** Tryptofano em Tampão Fosfato pH 7,2/T20 1,0% (v/v) **(B)** Triton X-100 1,0% (v/v) em Tampão Fosfato pH 7,2 e **(C)** Tween 20 1,0% (v/v) em Tampão Fosfato pH 7,2.

3.2.2.2 Otimização da lâmpada de irradiação

Iniciaram-se os experimentos de irradiação utilizando uma lâmpada de halogênio. Essa escolha foi feita após observar-se o espectro de emissão da lâmpada (Figura 8), que comprovou a emissão da mesma na faixa de comprimento de onda de interesse para excitação do fotossensibilizador, isto é, de 400nm à 600 nm.

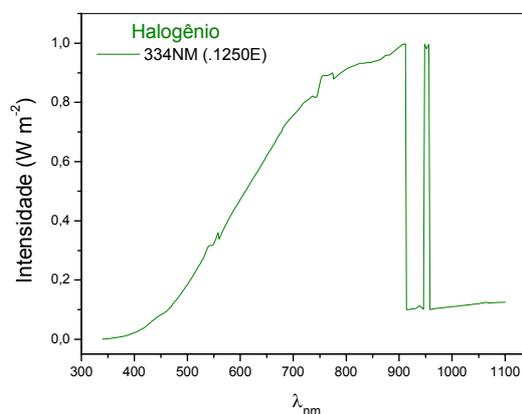


Figura 8: Espectro de emissão da lâmpada de halogênio.

No entanto, durante a otimização da fotoxidação do triptofano, feita através da irradiação de uma solução contendo até $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triptofano e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 / Triton X-100 1,0% (v/v) ou Tween 20 1,0% (v/v), também se observou que a vida útil do fotossensibilizador era muito curta (cerca de 20 minutos) quando se utilizava uma lâmpada de halogênio de 500 W para irradiar o conjunto solvente / MgPpIX / Triptofano.

Optou-se, então por substituir a lâmpada de halogênio por uma lâmpada de mercúrio de 80 W. A lâmpada de Hg emite somente em determinados comprimentos de onda. Além disso, é possível minimizar a quantidade de luz que chega até a amostra através do uso de filtros.

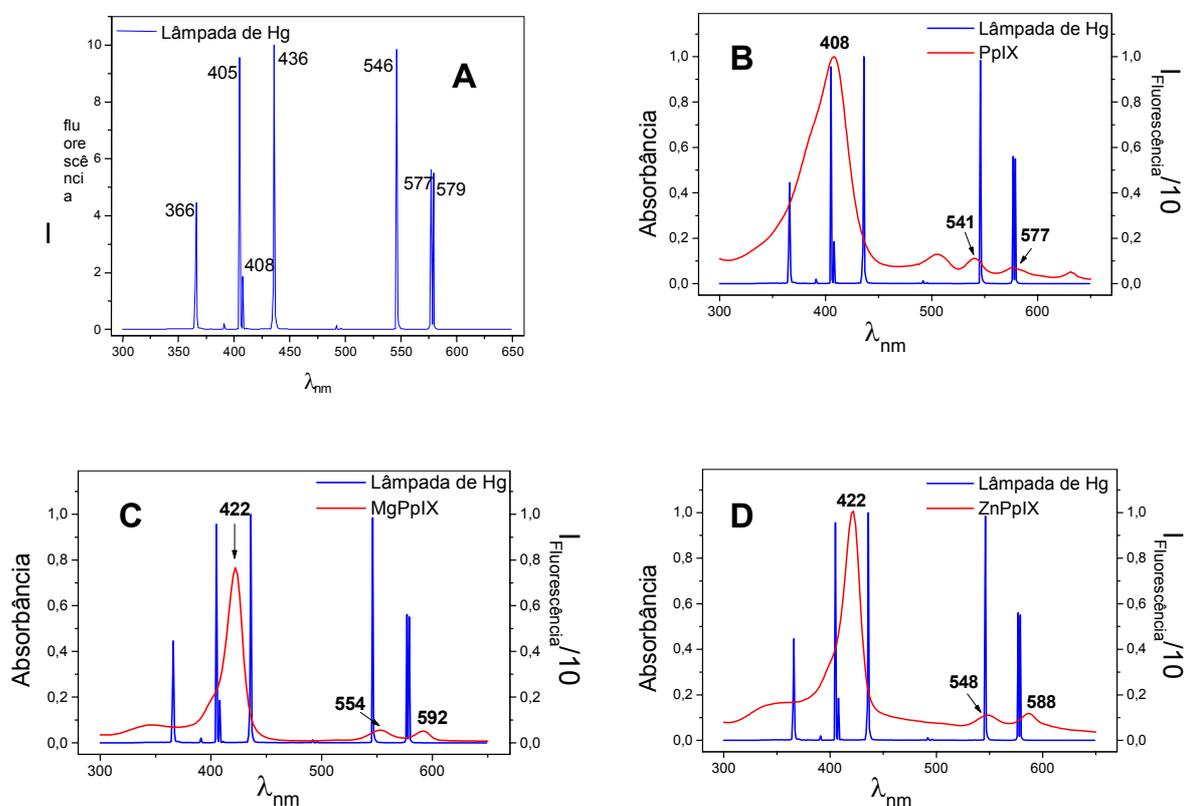


Figura 9: (A) Espectro de emissão da lâmpada de mercúrio e Espectro de emissão da lâmpada de mercúrio sobreposto ao espectro de absorção de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de (B) PpIX (C) MgPpIX e (D) ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v).

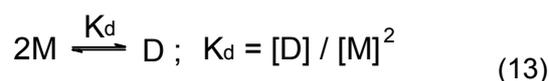
No caso de MgPpIX, os comprimentos de onda de excitação de interesse são 422, 550 e 592 nm. Para a ZnPpIX, 422, 548 e 588 nm e para PpIX, 408, 505, 541, 577 e 631 nm. Desse modo, filtrou-se a emissão de luz na região do Infravermelho da lâmpada com água contida em um aparato acoplado à própria lâmpada. Os comprimentos de onda abaixo de 370 e acima de 600 nm foram bloqueados utilizando-se um filtro de cor azul. A cubeta de irradiação foi mantida a 5 cm da saída da luz. Um espectro de emissão da lâmpada contendo o filtro azul (Figura 9A) foi obtido no Espectrofluorímetro Aminco através do acoplamento de uma fibra óptica à saída de luz da lâmpada. Utilizou-se fenda de emissão de 0,25 nm e voltagem da fotomultiplicadora igual a 700 HVA.

3.2.3 Estudo do estado de agregação do fotossensibilizador

3.2.3.1 Determinação da Constante de Dimerização.

O cálculo da constante de dimerização foi baseado nos trabalhos de Margalit *et al.* Para o cálculo da constante de dimerização algumas considerações devem ser feitas: 1) a baixas concentrações de fotossensibilizador, a dimerização é o processo de agregação dominante, podendo ser negligenciada a fração de agregados de ordem maior que dímeros. 2) Somente os monômeros fluorescem³¹⁻³³.

Dessa forma, podemos representar o processo³¹:



$$[T] = [M] + 2 [D] \quad (14)$$

onde: [M] é a concentração do monômero

[D] é a concentração do dímero

[T] = concentração analítica do fotossensibilizador

k_d é a constante de equilíbrio

Substituindo-se (14) em (13):

$$[T] / [M] = 2 K_d [M] + 1 \quad (15)$$

Como a intensidade de fluorescência (I_F) é proporcional à concentração de monômeros em solução $[M]$, isto é:

$$I_F = \alpha [M] \quad (16)$$

Podemos substituir $[M]$ em (3):

$$[T] / I_F = 2 k_d \alpha^{-2} I_F + \alpha^{-1} \quad (17)$$

Construindo um gráfico de $[T] / I_F$ contra I_F tem-se um gráfico linear e o valor de K_d pode ser obtido da inclinação e do intercepto da reta.

A dimerização foi avaliada utilizando-se soluções das Protoporfirinas em Tampão Fosfato/ Tween 20 1,0% (v/v) numa faixa de concentração entre 5 a 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de MgPpIX, 0,5 a 1,7 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de PpIX e 2 a 3,7 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de ZnPpIX.

As porfirinas foram excitadas nos comprimentos de onda da banda de Soret: 422 nm para MgPpIX e ZnPpIX e 408 nm para PpIX. Esses comprimentos de onda foram previamente determinados como sendo o comprimento de onda de máxima absorção do composto. A fluorescência no comprimento de onda de máxima emissão (650 nm para MgPpIX, 645 nm para ZnPpIX, e 636 nm para PpIX) foi utilizada para a obtenção da constante.

Como correu um contratempo durante as análises (quebra do fluorímetro utilizado) a determinação da constante de dimerização do MgPpIX não foi realizada no mesmo equipamento que a determinação das constantes de dimerização da PpIX e da ZnPpIX. Sendo assim algumas condições tiveram que ser otimizadas (Tabela 1):

Tabela 1: Condições de análise para determinação da constante de dimerização das Protoporfirinas.

	Espetrofluorímetro Utilizado	Fendas (Emissão e Excitação)
PpIX e ZnPpIX	ISS Spectrophotometer	8 nm
MgPpIX	PTI® LS-100™ -	4 nm

A faixa de concentração de fotossensibilizador segura para trabalho, isto é, a concentração onde não está ocorrendo dimerização do composto também foi determinada. Para isso, variou-se a concentração da protoporfirina e mediu-se a intensidade de fluorescência do composto. A análise foi feita utilizando-se soluções de MgPpIX, PpIX e ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/ Tween 20 1,0% (v/v) numa faixa de concentração que variou de 5 a 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de fotossensibilizador. Foi utilizada de

cubeta de quartzo triangular de lados iguais a 1,4x1x1 cm para a análise de todos os sensibilizadores.

3.2.4 Constante de velocidade de fotodegradação.

A fotodegradação de cada protoporfirina foi analisada através da medida da intensidade de fluorescência de soluções irradiadas de fotossensibilizador 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em Tampão Fosfato pH 7,2/ Tween 20 1,0% (v/v). As excitações das porfirinas foram feitas no comprimento de onda da banda de Soret: 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e 408 nm para PpIX. A emissão medida no comprimento de onda de máxima emissão (645 nm para ZnPpIX, 650 nm para MgPpIX e 636 nm para PpIX) foi utilizada para a obtenção da constante. Utilizaram-se fendas de excitação e de emissão de 4 nm. Para essas análises foi utilizada uma cubeta de quartzo triangular de lados iguais a 1,4x1x1 cm. A irradiação foi feita com lâmpada de mercúrio por períodos de 6 minutos, durante 54 minutos. As análises foram feitas em duplicata.

3.3 EFICIÊNCIA DOS FOTOSSENSIBILIZADORES

3.3.1 Fotoxidação de Biomoléculas.

Os ensaios de fotoxidação de biomoléculas foram baseados no trabalho de Ball *et al*¹³, com pequenas modificações, conforme explicitado abaixo.

3.3.1.1 Triptofano (Trp):

Amostras contendo 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Trp e 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fotossensibilizador em Tampão Fosfato pH 7,2/ Tween 0,2; 0,4 e 1,0% (v/v), foram irradiadas com lâmpada de Hg. A irradiação foi feita por períodos de 6 minutos durante 54 minutos.

Utilizou-se o Espectrofluorímetro PTI[®] para essa análise. A excitação do Trp foi feita no comprimento de onda de 285 nm. A emissão em 350 nm foi verificada. Utilizaram-se fendas de excitação e de emissão de 4 nm. Para essa análise foi utilizada uma cubeta de quartzo triangular de lados iguais a 1,4x1x1 cm. As constantes de velocidade de fotoxidação do Trp foram obtidas para cada sensibilizador.

3.3.1.2 Albumina Bovina (BSA):

Amostras contendo $90 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de BSA e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fotossensibilizador em Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 1,0% (v/v), foram irradiadas com lâmpada de Hg. A irradiação foi feita por períodos de 6 minutos durante 54 minutos.

Utilizou-se o Espectrofluorímetro PTI[®] para essa análise. A excitação da BSA foi feita no comprimento de onda de 295 nm. A emissão em 330 nm foi verificada. Utilizaram-se fendas de excitação e de emissão de 3 nm. Para essa análise foi utilizada uma cubeta de quartzo triangular de lados iguais a 1,4x1x1 cm.

3.3.2 Hemólise de células vermelhas do sangue.

O sangue utilizado foi coletado 48 horas antes da análise em frasco contendo EDTA como anticoagulante e mantido sob refrigeração até a utilização.

Os ensaios de hemólise de células vermelhas do sangue foram baseados nos estudos feitos por Ball *et al*¹³ e Girotti⁸².

Como o intuito era verificar a destruição das hemácias do sangue, foi necessário fazer uma lavagem do mesmo para retirada do plasma, leucócitos e metabólitos. Inicialmente o sangue foi centrifugado por 10 minutos à 2000g para retirada do soro e dos leucócitos. Adicionou-se às hemácias 3 vezes o seu volume de uma solução de NaCl 0,85% e em seguida efetuou-se nova centrifugação (10 minutos, 3000g). Esse procedimento de lavagem com NaCl 0,85% foi realizado mais duas vezes.

Os tempos máximos de hemólise foram limitados pelo intervalo entre as medidas, uma vez que, o volume de solução de hemácias contido nos vials de análise e o volume da alíquota coletada se mantiveram constantes.

Foram realizados dois tipos de hemólise: hemólise por irradiação contínua (soluções eram irradiadas, a % de hemólise era medida, continuava-se a irradiação, a % de hemólise era medida novamente, etc.) e hemólise no escuro (soluções eram irradiadas, a % de hemólise era medida, as soluções eram mantidas no escuro, a % de hemólise era medida novamente, etc.)

3.3.2.1 Lise das hemácias por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.

Para esse ensaio de hemólise por irradiação contínua as seguintes soluções foram preparadas:

- a) Controle de fotodegradação do fotossensibilizador: Solução de PBS pH 7,4 contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fotossensibilizador e 0,045% (v/v) de Tween 20.
- b) Branco: Solução de PBS pH 7,4 contendo 0,5% (v/v) de hemácias e 0,045% (v/v) de Tween 20.
- c) Amostra: Solução de PBS pH 7,4 contendo 0,5% (v/v) de hemácias, 0,045% (v/v) de Tween 20 e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fotossensibilizador (triplicata).

Os ensaios de lises foram realizados de duas maneiras: com ou sem um período de pré-incubação das soluções *a*, *b* e *c* descritas acima:

- Sem pré-incubação: Essas soluções foram irradiadas com lâmpada de mercúrio durante um período de tempo de 2 horas. Durante esse período, alíquotas de $600 \mu\text{L}$ das soluções eram retiradas a cada 30 minutos.
- Com pré-incubação: Após um período de pré-incubação de 30 minutos (no escuro a temperatura ambiente) as soluções acima foram irradiadas com lâmpada de mercúrio durante um período de tempo de 75 minutos. Durante esse período, alíquotas de $600 \mu\text{L}$ das soluções eram retiradas a cada 15 minutos.

Depois de retiradas as alíquotas eram centrifugadas por 5 minutos à $2000g$ e o sobrenadante era coletado e analisado através da obtenção de um espectro de absorvância na faixa de comprimento de onda de 180 a 820 nm.

3.3.2.2 Influência da concentração de MgPpIX, PpIX e ZnPpIX na hemólise de células vermelhas do sangue.

Para esse ensaio de hemólise por irradiação contínua as seguintes soluções foram preparadas:

- d) Branco: Solução de PBS pH 7,4 contendo 0,5% (v/v) de hemácias e 0,045% (v/v) de Tween 20.
- e) Amostra: Solução de PBS pH 7,4 contendo 0,5% (v/v) de hemácias, 0,045% (v/v) de Tween 20 e as seguintes concentrações de fotossensibilizador (triplicata):
 - PpIX: 2, 5, 10 e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$;
 - MgPpIX: 2, 10 e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e
 - ZnPpIX: 2, 5 e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Os ensaios de lises foram realizados sem um período de pré-incubação das soluções *a* e *b* descritas acima, pois esse experimento apresentou uma melhor eficácia sobre o experimento utilizando pré-incubação. Assim, as soluções foram irradiadas com

lâmpada de mercúrio durante um período de tempo de 2 horas. Durante esse período, alíquotas de 600 µL das soluções eram retiradas a cada 15 ou 30 minutos, centrifugadas por 5 minutos à 2000g e o sobrenadante era coletado e analisado através da obtenção de um espectro de absorvância na faixa de comprimento de onda de 180 a 820 nm.

3.3.2.3 Hemólise pós-irradiação por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.

Para esse ensaio de hemólise no escuro as seguintes soluções foram preparadas:

- f) Branco: Solução de PBS pH 7,4 contendo 0,5% (v/v) de hemácias e 0,045% (v/v) de Tween 20.
- g) Amostra: Solução de PBS pH 7,4 contendo 0,5% (v/v) de hemácias, 0,045% (v/v) de Tween 20 e as seguintes concentrações de fotossensibilizador (triplicata):
 - PpIX: 5 µmol.L⁻¹ ;
 - MgPpIX: 15 µmol.L⁻¹ e
 - ZnPpIX: 15 µmol.L⁻¹.

As soluções foram irradiadas com lâmpada de mercúrio durante um período de tempo de 30 minutos. Após a irradiação as amostras eram mantidas no escuro enquanto alíquotas de 600 µL das soluções foram coletadas nos seguintes tempos:

- 0 (zero) minutos antes do início da irradiação
- 0 (zero), 15, 30, 60, 120 e 240 minutos após a irradiação

As alíquotas eram centrifugadas por 5 minutos à 2000g e o sobrenadante era coletado e analisado através da obtenção de um espectro de absorvância na faixa de comprimento de onda de 180 a 820 nm.

3.3.2.4 O cálculo da porcentagem de hemácias lisadas.

Para o cálculo da porcentagem de hemácias lisadas foi necessária a obtenção da absorvância inerente à hemólise através da seguinte equação:

$$A_{\text{Hemólise (542nm)}} = A_{\text{Amostra (542 nm)}} - A_{\text{Fotossensibilizador (542nm)}} \quad (18)$$

Onde: $A_{\text{Hemólise (542nm)}}$ = Absorvância da oxihemoglobina em 542 nm

$A_{\text{Amostra (542nm)}}$ = Absorvância da amostra menos absorvância do branco em 542 nm

$A_{\text{Fotossensibilizador (542nm)}}$ = Absorvância do fotossensibilizador em 542 nm

A concentração de hemácias lisadas (%) foi obtida, então, através da Lei de Beer:

$$A_{\text{Hemólise (542nm)}} = a.b.c \quad (19)$$

Onde: a = Coeficiente de hemólise [(cm.%)⁻¹]

b = Caminho óptico (0,5 cm)

c = Concentração em % (v/v)

O valor do coeficiente de hemólise foi obtido através da Lei de Beer utilizando-se as seguintes condições:

$A_{\text{Hemólise (542nm)}}$ = Absorbância de uma solução totalmente hemolisada de 0,5% (v/v) de hemácias em PBS.

c = 0,5 % (v/v) de hemácias

A porcentagem de hemácias lisadas foi obtida através da equação:

$$\% \text{ hemólise} = (c \times 100) / 0,5 \quad (20)$$

Onde: c = Concentração de hemácias lisadas em % (v/v)

0,5 = Concentração inicial de hemácias em % (v/v)

3.3.2.5 Controle do fotobranqueamento dos fotossensibilizadores.

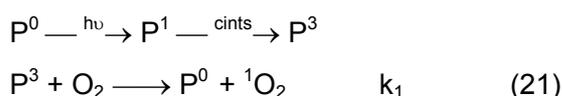
Para melhor avaliação dos dados obtidos durante o processo de hemólise, analisou-se o fotobranqueamento de uma solução de PBS pH 7,4 contendo 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fotossensibilizador e 0,045% (v/v) de Tween 20.

Essa solução foi irradiada com lâmpada de mercúrio por períodos de 15 minutos durante 120 minutos. Após, mediu-se a intensidade de fluorescência do composto. As excitações de MgPpIX, PpIX e ZnPpIX foram feitas no comprimento de onda de 422, 408 e 422 nm, respectivamente. A emissão foi verificada no comprimento de onda de 650, 636 e 645 nm, respectivamente para MgPpIX, PpIX e ZnPpIX. Utilizaram-se fendas de excitação e de emissão de 4 nm. Para essa análise foi utilizada uma cubeta de quartzo triangular de lados iguais a 1,4x1x1 cm.

A velocidade de fotobranqueamento de cada fotossensibilizador foi calculada conforme descrito no item 3.3.3.

3.3.3 Cálculo das Constantes de Velocidade.

Durante os experimentos foi observado que a fotoxidação do Trp pelos fotossensibilizadores e o fotobranqueamento das porfirinas seguem uma cinética de primeira ordem em relação ao Trp. Em geral a fotoxidação de biomoléculas ocorre via oxigênio singlete, ou seja, pelo mecanismo tipo II que pode ser representado pelas seguintes reações¹⁷:



onde: 0P = Fotossensibilizador no estado singlete fundamental

1P = Fotossensibilizador no estado singlete excitado

3P = Fotossensibilizador no estado triplete excitado

1O_2 = Oxigênio Singlete e 3O_2 = Oxigênio Triplete (Estado Fundamental)

S = Substrato

Se a última reação (Eq. 22) for a etapa mais lenta e determinante do mecanismo:

$$d[S] / dt = - k_2 [{}^1O_2] [S] \quad (23)$$

A $[{}^1O_2]$ é diretamente proporcional à $[{}^3O_2]$. Pela Lei de Henry⁸³, estimou-se que, em meio aquoso, a $[{}^3O_2]$ é igual a 2,6 mol.L⁻¹. Extrapolando esse valor para um meio micelar, poderíamos considerar que a concentração de oxigênio é muito maior que a concentração do fotossensibilizador. Sendo assim, podemos considerar, também, que a concentração de $[{}^1O_2]$ é aproximadamente constante. Portanto, pela equação anterior:

$$d[S] / dt \cong - k[S] \quad (24)$$

Cuja forma integrada é⁸⁴:

$$\ln ([S] / [S_0]) = - kt \quad (25)$$

Onde: [S] é a concentração do substrato (porfirina ou Trp) num dado momento

[S₀] é a concentração inicial (t = 0) do substrato (porfirina ou Trp)

t é o tempo

k é a constante de velocidade

A equação 22 indica que a cinética global é de pseudo-primeira ordem. Para cinéticas de 1ª ordem, ao lançarmos em um gráfico $\ln ([S] / [S_0])$ contra t teremos uma reta cujo coeficiente angular é $-k$, e corresponde à constante de velocidade.

Como a concentração do substrato (S) é proporcional à intensidade de fluorescência, I_F , podemos reescrever a equação (25) como:

$$\ln (I_F / I_{F0}) = -kt \quad (26)$$

O que significa que a fotodegradação de um substrato segue uma cinética de pseudo-primeira ordem.

3.3.4 Cálculo da média amostral e do desvio padrão.

Nas análises que fizeram uso da média amostral e do desvio padrão os cálculos foram realizados segundo as equações 27e 28⁸⁵:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i \quad (27)$$

$$s = \sqrt{\left[\frac{1}{N-1} \right] \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (28)$$

Onde: X_i = i-ésima observação

\bar{X} = média amostral

N = número total de observações

s = estimativa do desvio padrão

Em alguns casos (cálculo da constante de fotoxidação de triptofano) o desvio foi determinado segundo a propagação de erros para a relação 29, como mostrado na equação 30.⁸⁶

$$Z = A / B \quad (29)$$

$$\Delta Z = z \sqrt{(\Delta A / A)^2 + (\Delta B / B)^2} \quad (30)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRABALHO

4.1.1 Influência da concentração de Tween 20 no estado de agregação do MgPpIX.

Para determinar a quantidade limite de tensoativo onde não há agregação foi feito um estudo levando-se em consideração a concentração de surfactante no meio. Para isso analisou-se a variação da intensidade (I) de fluorescência de MgPpIX $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da porcentagem de Tween 20 em solução (Figura 10).

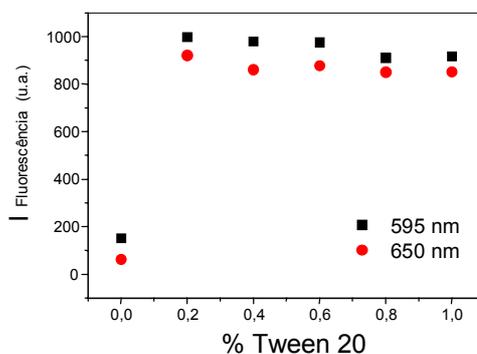


Figura 10: Efeito da concentração de Tween 20 na intensidade de fluorescência de MgPpIX $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 ($\lambda_{\text{excitação}} = 422 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 595 \text{ e } 650 \text{ nm}$).

É possível verificar pela Figura 10 que, acima de uma concentração de 0,2% (v/v) de surfactante, a razão monômero/agregado em $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX é praticamente a mesma pois a intensidade de fluorescência não varia consideravelmente. Esses dados são corroborados pelas constantes de fotoxidação do triptofano obtidas no item 4.3.2.1, no qual se verifica que a velocidade de fotoxidação do aminoácido não varia significativamente quando a concentração de surfactante no meio é maior que 0,2% (v/v). O mesmo foi verificado com as constantes de fotoxidação de Trp por ZnPpIX e PpIX, eliminando a necessidade de realização de um ensaio de agregação para esses fotossensibilizadores.

Os resultados citados acima são indícios de que, a partir de uma concentração de 0,2% (v/v) de Tween 20 já existem moléculas suficientes de surfactante em solução para que ocorra a formação de micelas e, conseqüentemente, para a incorporação das moléculas de porfiririna por essas micelas, o que acarretaria na monomerização do fotossensibilizador, explicando o porquê da fluorescência do mesmo se manter constante. Essa observação com relação à concentração do surfactante em solução está de acordo com o valor da concentração micelar crítica (cmc – concentração limite de surfactante além da qual micelas são formadas) encontrada na literatura para o Tween 20. O valor de cmc do Tween 20 (em uma faixa de temperatura variando entre 20°C e 25°C e concentração de íons sódio em solução entre 0 e 0,05 mol.L⁻¹) é 0,059 mmol.L⁻¹. Nesse projeto foi utilizada a seguinte faixa de concentração de Tween 20: 0,4 a 8,9 mmol.L⁻¹ (respectivamente 0,045 a 1,0 % de T20) nas mesmas condições de temperatura e concentração de íons sódio⁸⁷.

Baseados nos resultados obtidos nesse ensaio de agregação e no de fotoxidação de triptofano optou-se por realizar as demais análises desse projeto em soluções de Tampão Fosfato pH 7,2 contendo Tween 20 1,0% (v/v) e, no caso da hemólise de células vermelhas do sangue, PBS pH 7,4 / T20 0,045% (v/v).

4.1.1.1 Influência de surfactantes e da lâmpada de irradiação na fotoxidação de L-triptofano.

Estudos indicam que o ¹O₂ produzido em soluções aquosas através da excitação de fotossensibilizador pode penetrar no interior de micelas e oxidar os substratos dissolvidos na mesma ou pode ser gerado no interior da micela e difundir através do meio aquoso para uma micela diferente^{88,89}.

A fim de analisar a eficiência de fotoxidação do triptofano em meio micelar foi realizado um estudo para otimização do meio. Uma solução contendo 300 μmol.L⁻¹ de triptofano e 15 μmol.L⁻¹ de MgPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/ Triton X-100 1,0% (v/v) utilizada para essa análise, a irradiação foi feita com lâmpada de halogênio (Figura 11A).

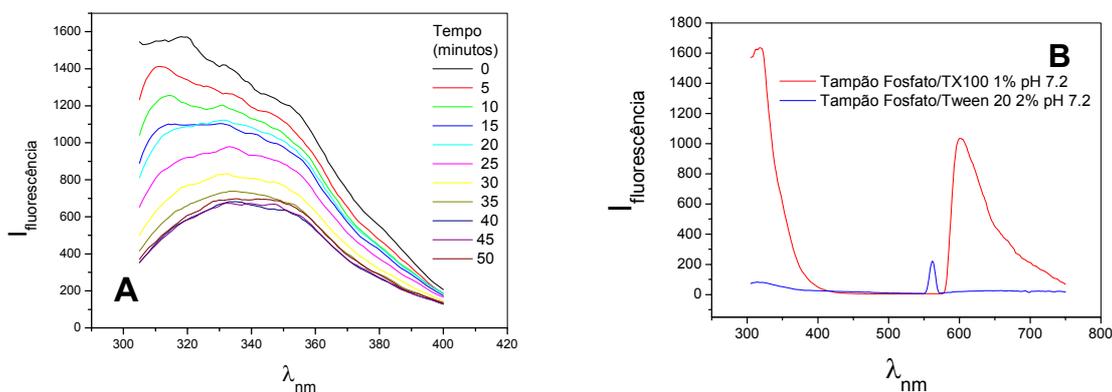


Figura 11: A) Perfil de fotoxidação de $300 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de triptofano e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 /TX-100 1,0% (v/v) ($\lambda_{\text{excitação}} = 285 \text{ nm}$) **B)** Perfil de emissão dos solventes: Tampão Fosfato pH 7,2 /TX-100 1,0% ($\lambda_{\text{excitação}} = 288 \text{ nm}$) e Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 2,0% ($\lambda_{\text{excitação}} = 272 \text{ nm}$).

Como pode ser observado no gráfico A da Figura 11, apesar de estar ocorrendo a fotoxidação, a banda de emissão do triptofano perdeu sua característica de emissão máxima na região de 350 nm. Obtendo-se um branco da emissão do meio quando este é excitado em um comprimento de onda de 288 nm, verificou-se que o meio também emitia na mesma faixa de comprimento de onda do triptofano. Testando-se diferentes tampões, diferentes pH e surfactantes (dados não apresentados) verificaram-se que essa emissão era característica do Triton X-100 (Gráfico B).

Ainda analisando a Figura 11, Gráfico B, nota-se que o Tween 20 apresenta uma emissão muito baixa na região de 350 nm, desse modo, optou-se por utilizar soluções de tampão PBS contendo Tween 20, o que afetaria muito pouco a emissão do triptofano.

Para avaliar a fotoxidação de Trp por $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX em Tampão Fosfato pH7,2/T20 1,0% (v/v), irradiado com lâmpada de halogênio, utilizou-se uma concentração inicial de triptofano de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 12):

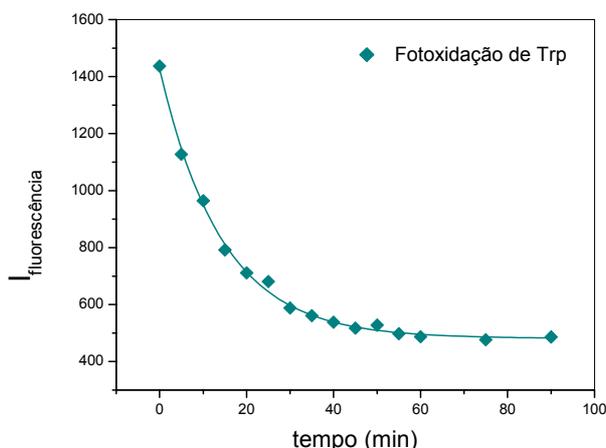


Figura 12: Fotoxidação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Trp por $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 1,0%: variação da intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação com lâmpada de halogênio ($\lambda_{\text{excitação}} = 285 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 350 \text{ nm}$).

Verifica-se pela Figura 12 que a fotoxidação do triptofano (caracterizada pela diminuição da intensidade da fluorescência) ocorre durante um determinado período de tempo até que a emissão se estabiliza. O estudos do fotobranqueamento do MgPpIX, na ausência de Trp, irradiado com lâmpada de Hg (Figura 13A) e com lâmpada de halogênio (Figura 13B) feitos em seguida mostraram que houve uma fotodegradação maior do MgPpIX causada pela alta intensidade da lâmpada de halogênio. Portanto a estabilização observada na Figura 13 é indicativo da fotodegradação do MgPpIX.

É possível verificar pela Figura 13 que a velocidade de fotodegradação do MgPpIX é muito maior quando irradiada com lâmpada halógena do que com lâmpada de Hg. Isso diminui a eficiência da fotoxidação do Trp uma vez que o fotossensibilizador está sendo consumido. O cálculo da constante de velocidade de fotodegradação do MgPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/T20 1,0% (v/v) (Tabela 2) feito através do gráfico logarítmico dos dados de fotodegradação do Trp irradiado com lâmpada de halogênio e com lâmpada de mercúrio conforme descrito no item 3.2.4 e 3.3.3.

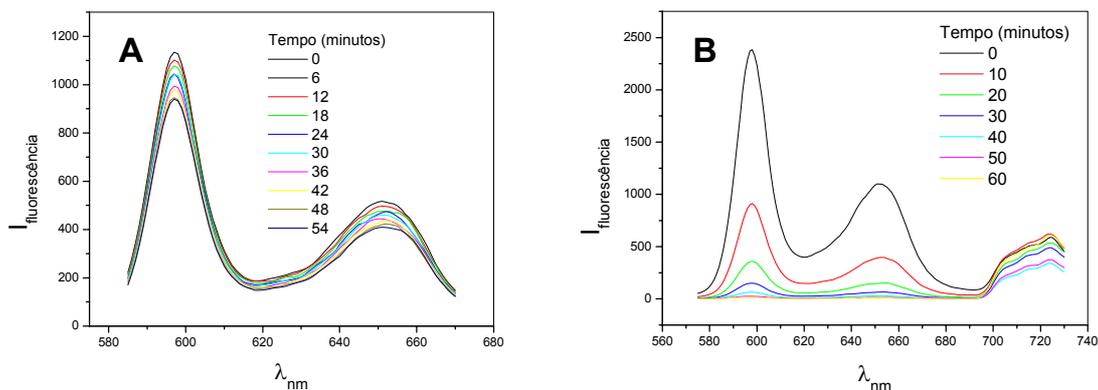


Figura 13: Fotobranqueamento de uma solução contendo $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ de MgPpIX em tampão Fosfato pH 7,2/ T20 1,0% (v/v), na ausência de Trp, durante irradiação com **A)** lâmpada de Hg e **B)** lâmpada de halogênio ($\lambda_{\text{excitação}} = 422 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 650 \text{ nm}$).

Verifica-se pela Tabela 2 que a diferença entre o valor de constante obtido para irradiações com lâmpada de halogênio são aproximadamente 18 vezes maior que o valor obtido para lâmpada de Hg, o que comprova a degradação muito mais rápida do fotossensibilizador quando irradiado com lâmpada halógena. Esse valor não foi obtido em triplicata, pois fazia parte do estudo de otimização do solvente, ele consta na Tabela 2 apenas para comparação com o valor da constante para a lâmpada de Hg.

Tabela 2: Constante de velocidade de fotodegradação de MgPpIX $25 \mu\text{mol. L}^{-1}$ em Tampão Fosfato pH 7,2/T20 1,0%. Os dados são a média \pm s (n=3).

Método de obtenção	Lâmpada Utilizada	Constante de Velocidade de Fotodegradação (s^{-1})
Fluorescência	Halogênio	$8,27 \cdot 10^{-2}$
Fluorescência	Mercúrio	$(4,46 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$

A fluorescência emitida pelo Trp diminui com o tempo devido à sua fotoxidação pelo oxigênio singlete gerado com a excitação do MgPpIX. Na Tabela 3 é possível verificar as constantes de velocidade de fotoxidação do Trp irradiado com lâmpada de halogênio e com lâmpada de mercúrio (Tabela 3):

Tabela 3: Constantes de velocidade de fotoxidação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Triptofano em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v). Os dados são a média \pm s (n=3).

Lâmpada Utilizada	Constante de Velocidade de Fotoxidação (s^{-1})
Halogênio	$3,60 \cdot 10^{-2}$
Mercúrio	$(1,29 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$

Verifica-se pela Tabela 3 que a diferença entre os valores de constantes obtidos para irradiações com lâmpada de halogênio são praticamente três vezes maiores que os valores obtidos para lâmpada de Hg. Esses valores não foram obtidos em triplicata, pois também faziam parte dos estudos de otimização das condições de trabalho. Eles constam na Tabela 3 apenas para comprovar que a fotoxidação com esse tipo de lâmpada ocorre mais rapidamente.

Essa diminuição da fluorescência do triptofano durante a irradiação do sistema triptofano/fotossensibilizador é um indicio do consumo desse do aminoácido, o que significa que as protoporfirinas estudadas possuem eficiência fotodinâmica. Através da comparação entre as constantes de velocidade de fotoxidação contidas na Tabela 3 podemos afirmar que a eficiência do sensibilizador está relacionada à quantidade de moléculas excitadas e a excitação do fotossensibilizador está relacionada à quantidade de fótons emitidos pela lâmpada usada para a irradiação. Como a potência da lâmpada de halogênio é maior que a potência da lâmpada de Hg conseqüentemente, a quantidade de fótons emitida pela lâmpada halógena será maior e, portanto, mais moléculas de sensibilizador serão excitadas resultando num maior destruição do triptofano.

A partir dos dados obtidos nessa fase do experimento optou-se por utilizar a lâmpada de mercúrio para que houvesse tempo hábil para estudo do efeito dos fotossensibilizadores, pois além de uma menor velocidade de fotodegradação do fotossensibilizador (Tabela 2) verificou-se também, para a lâmpada de mercúrio, um menor consumo do Trp (Tabela 3).

4.2 ESPECTROS DE EMISSÃO E EXCITAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES

O comprimento de onda de excitação dos fotossensibilizadores foi obtido através do espectro de absorção na região do UV-Visível e os comprimentos de onda de emissão,

através da excitação da molécula no comprimento de onda previamente determinado através do espectro de absorção.

Na Figura 14A, 15B e 15C é possível observar os perfis de absorção e de emissão de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de, respectivamente, PpIX, MgPpIX e ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/T20 1,0% (v/v). Para a obtenção do perfil de emissão, a excitação das porfirinas foi feita no comprimento de onda de 408 nm para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX .

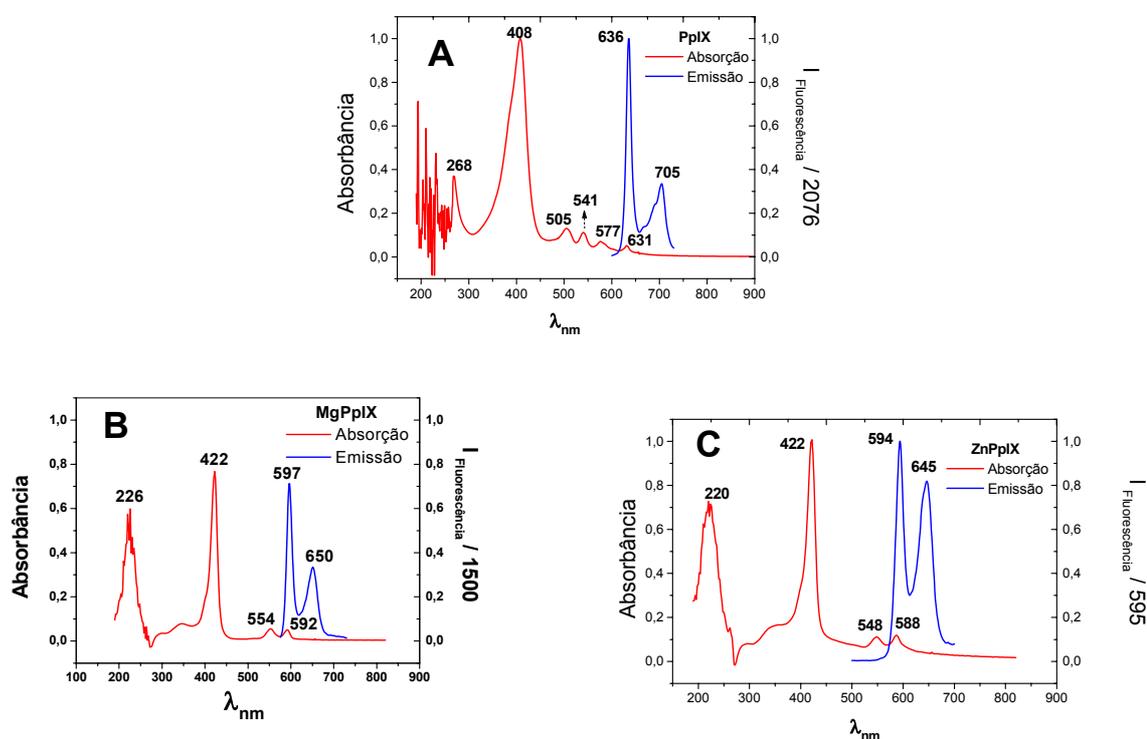


Figura 14: Espectros de absorção e de emissão de uma solução $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de (A) PpIX (B) MgPpIX e (C) ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v). Para a obtenção do perfil de emissão, $\lambda_{\text{excitação}} = 408 \text{ nm}$ para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX .

O espectro de absorção de porfirinas e de seus derivados é sua característica mais comum e importante. O espectro está correlacionado com muitas propriedades físico-químicas. Fatores que aumentam a densidade de elétrons π na periferia do núcleo porfirínico causam deslocamentos das bandas de absorção e de fluorescência para comprimentos de onda maiores. Além disso, a existência de um metal conjugado no

núcleo do anel porfirínico gera uma diferença no perfil de porfirinas neutras e metaloporfirinas na região do visível. Essas diferenças podem ser observadas na Figura 14. Os perfis de absorção da MgPpIX e da ZnPpIX são praticamente idênticos e ambos diferem do perfil de absorção da PpIX. Verifica-se que todas as protoporfirinas apresentam uma banda de maior absorção na região de 400 nm. Para as metaloprotoporfirinas estudadas esse máximo encontra-se no comprimento de onda de 422 nm e para a PpIX, em 408 nm, sendo essa banda mais larga que as das metaloporfirinas. Essa banda é conhecida como banda B ou Banda de Soret, e chega a ser de 10 a 20 vezes mais intensa que a mais forte das bandas na região do visível. A banda de Soret é encontrada em todos os tetrapirroles cujos núcleos são fortemente conjugados⁴⁰.

Além da banda de Soret, as porfirinas neutras exibem mais 4 bandas na região de 450 a 700, numeradas de I à IV e conhecidas como bandas Q. A PpIX (e as demais porfirinas do tipo etio) possui a seguinte distribuição de bandas Q: IV > III > II > I; respectivamente 505, 541, 577 e 631 nm (Figura 15A)^{40,90}.

A ZnPpIX e a MgPpIX apresentam somente duas bandas Q de absorção (sendo que uma dessas bandas está próxima a 550 nm e a outra próximo a 590 nm) devido à simplificação ocorrida na região do visível do espectro causada pela mudança na simetria do anel conjugado quando a estrutura neutra (PpIX) se aproxima da simetria quadrada através da retirada de dois hidrogênios dos nitrogênios pirroles e inclusão de um metal à molécula (Figura 15B). Essas duas bandas da região visível são geralmente chamadas de bandas α e β . A banda α das metaloporfirinas está relacionada com as bandas I e III da porfirina neutra e a banda β , às bandas II e IV. Essa conexão, no entanto, não é tão clara quando as mudanças de intensidades são consideradas. Quelatos estáveis como Ni(II) e Co(II) têm ordem de intensidade de $\alpha > \beta$, enquanto em quelatos menos estáveis como Mg(II) e Zn(II) essa razão é inversa.^{40,90}

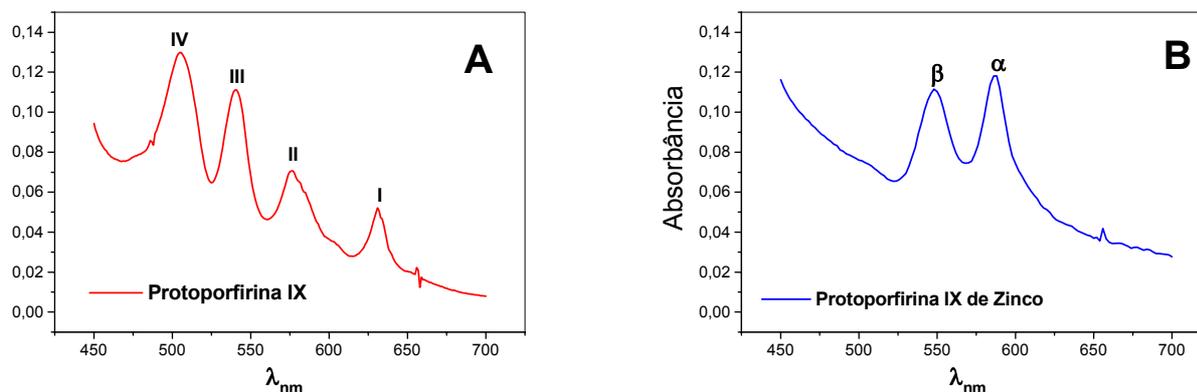


Figura 15: Espectro de absorvância na região de 450 a 700 nm de soluções contendo 15 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ de **(A)** Protoporfirina IX ou **(B)** Protoporfirina IX de Zinco e Tampão Fosfato pH 7.2 / Tween 20 1,0% (v/v).

Nota-se, também, pela Figura 14 que o perfil de emissão das porfirinas são parecidos, isto é, todas as porfirinas apresentam duas bandas de emissão, no entanto, os picos de emissão da PpIX estão deslocados para comprimentos de onda de menor energia daqueles apresentados pelos seus derivados. Verifica-se, também, pela Figura 14 que o espectro de emissão (região de 600-640 nm) sobrepõe-se à banda de absorção I na região de 590-640nm. Nessa região ocorre um fenômeno denominado auto-absorção, isto é, luz emitida pelas moléculas excitadas do fotossensibilizador ao retornar ao estado fundamental é absorvida pelas moléculas do fotossensibilizador que se encontram no estado fundamental. Esse fenômeno causa a supressão da fluorescência do composto. Para evitar que esse feito interferisse diretamente sobre a eficiência do fotossensibilizador durante as medidas foi utilizada uma cubeta triangular de lado 1,4 x 1,0 x 1,0 cm.

4.3 ESTUDO DO ESTADO DE AGREGAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

A protoporfirina IX é um composto de propriedades anfífilas, pois possui um anel hidrofílico (o núcleo porfínico) substituído com cadeias laterais propriônicas hidrofóbicas. Esse tipo de estrutura molecular pode, em casos de agregação, levar à formação de vesículas ou bicamadas moleculares. Estudos mostram que, em soluções aquosas, a PpIX se encontra na forma de monômeros em pH 0-3, dímeros em pH maiores que 8 e grandes agregados em pH 3-7. Em soluções aquosas alcalinas são formados dímeros

“face-a-face” estáveis com uma disposição “cabeça-cauda” dos grupos carboxilatos carregados. Em pH neutro, estruturas supramoleculares extendidas podem ser formadas devido às pontes de hidrogênio formadas entre as cadeias laterais parcialmente neutralizadas de ácido carboxílico⁹¹.

4.3.1 Determinação da Constante de Dimerização de MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.

Na Figura 16 está representada a relação entre intensidade (I) de fluorescência relativa e concentração total de fotossensibilizador em meio de Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 1,0% (v/v).

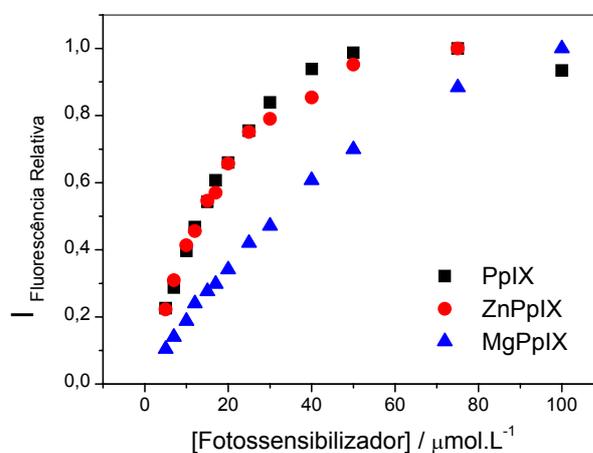


Figura 16: Relação entre intensidade de fluorescência relativa (fluorescência/ fluorescência inicial) e concentração total de PpIX, ZnPpIX e MgPpIX em PBS pH 7.2/Tween 20 1,0% (v/v).

[$\lambda_{\text{excitação}}$ = 408 nm para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{\text{emissão}}$ = 636 nm para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX].

Verifica-se pela Figura 16 que ocorre um desvio na linearidade inicialmente apresentada próximo à concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Esse desvio é um indício de que está ocorrendo uma supressão da fluorescência do sensibilizador, sendo que, um dos prováveis motivos dessa diminuição de intensidade de fluorescência é a agregação das protoporfirinas estudadas.

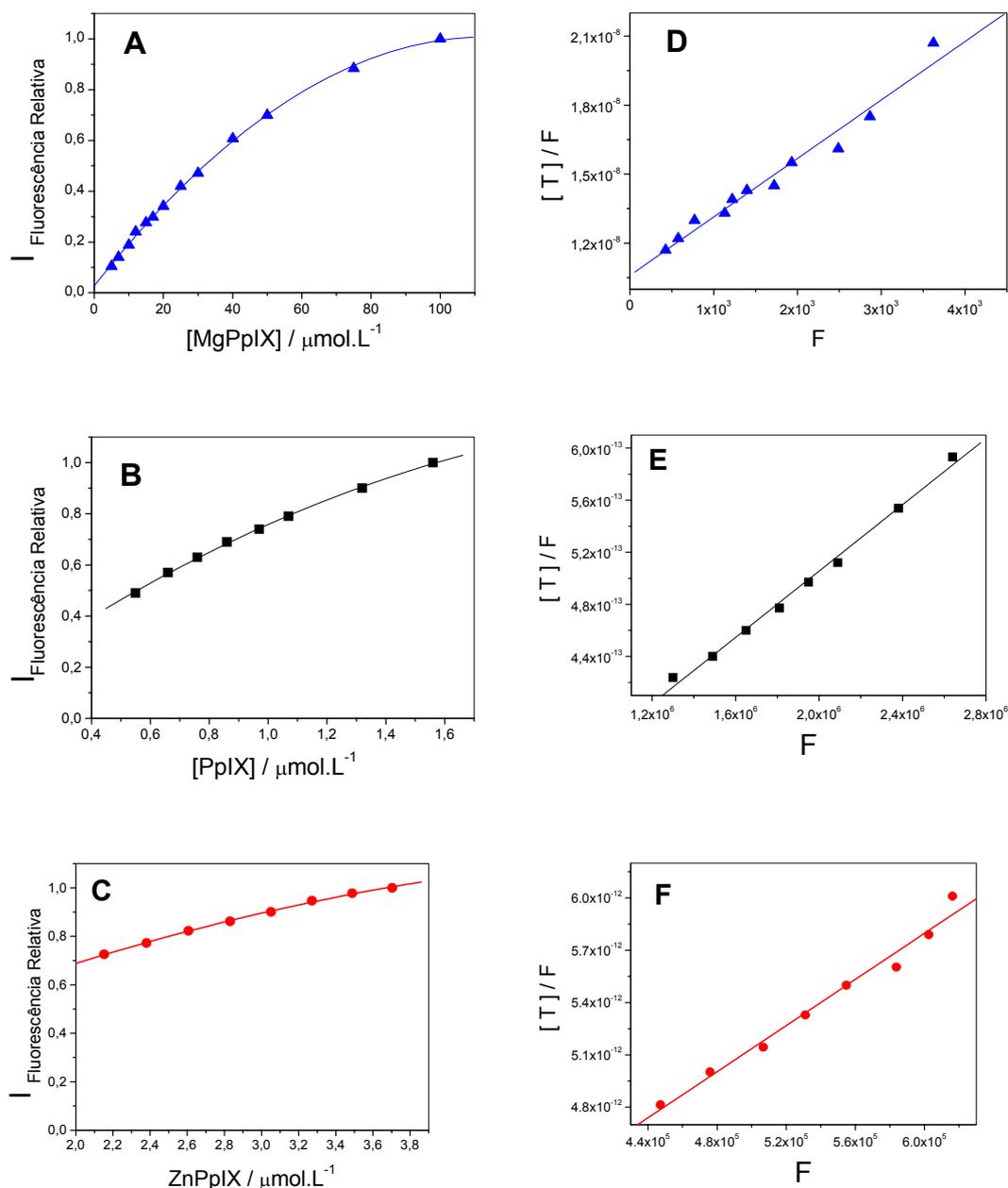


Figura 17: I) Relação entre intensidade de fluorescência e concentração total de porfirim em Tampão fosfato pH 7,2/T20 1,0% (v/v): **(A)** MgPpIX, **(B)** PpIX e **(C)** ZnPpIX. $[\lambda_{\text{excitação}} = 408 \text{ nm}$ para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{\text{emissão}} = 636 \text{ nm}$ para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX] II) Determinação da constante de equilíbrio de dimerização através do gráfico $[T]/F \times F$ de **(D)** MgPpIX (obtido a partir de (A)) **(E)** PpIX (obtido a partir de (B)) e **(F)** ZnPpIX (obtido a partir de (C)).

Ao considerarmos que, 1) na região linear dos gráficos apresentados na Figura 16 (isto é concentrações baixas: nanomolar à micromolar) a dimerização é o processo de agregação dominante, podendo ignorar-se as frações de agregados de ordem maior que dímeros e que 2) somente os monômeros fluorescem, foi possível analisar a agregação através da determinação da constante de dimerização de cada fotossensibilizador, calculadas pela inclinação e pela intercessão dos gráficos da Figura 17 (D, E, F) e relacionadas na Tabela 4³¹⁻³³.

Tabela 4 : Constante de equilíbrio de dimerização (K_d) das protoporfirinas estudadas e faixa de concentração para determinação da constante. Os valores representam a média \pm s (n=3).

Protoporfirina	K_d (mol⁻¹.L)	Faixa de concentração
<i>MgPpIX</i>	$(1,2 \pm 0,1).10^4$	5 a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
<i>PpIX</i>	$(4,07 \pm 0,04).10^6$	0,5 a 1,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$
<i>ZnPpIX</i>	$(1,00 \pm 0,02).10^6$	2 a 3,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Verifica-se, pela Tabela 4, que a ordem de grandeza das constantes de dimerização da PpIX e da ZnPpIX são 100 vezes maior que a ordem de grandeza da constante de dimerização da MgPpIX. Uma análise mais absoluta dos valores obtidos nos mostra que que a PpIX possui uma constante de dimerização cerca de 340 vezes maior que a da MgPpIX e que a ZnPpIX possui uma constante de dimerização 85 vezes maior que a da MgPpIX. Comparando a PpIX com a ZnPpIX verifica-se que a PpIX é cerca de 4 vezes mais susceptível à agregação que o seu derivado metálico: ZnPpIX. Além disso, as concentrações utilizadas para a obtenção da K_d da PpIX e da ZnPpIX são menores que as utilizadas para a K_d da MgPpIX, indicando que, em soluções de Tampão Fosfato pH 7,2/T20 1,0% (v/v) a PpIX e a ZnPpIX são mais susceptíveis à dimerização do que a MgPpIX.

É fato conhecido na literatura que a adição de detergentes emulsionantes (como o Tween 20 e o Triton X-100), polietileno glicol, emulsões lipídicas ou solventes orgânicos ajudam a evitar a agregação e até aumentam a solubilidade de alguns compostos facilitando a sua administração. Essa diminuição na tendência de agregação quando Tween 20 é adicionado à solução de tampão fosfato foi observada a partir da comparação do valor da constante de dimerização (K_d) da PpIX encontrado nesse estudo com o valor encontrado por Margalit *et al*^{31,32,33} em seus estudos para determinar a constante de equilíbrio de dimerização de porfirinas em Tampão Fosfato pH 7,2 (Tabela 5). A adição do

surfactante causou uma diminuição de 5 vezes no valor da constante de dimerização da PpIX, além de estender a faixa de concentração de PpIX utilizada para um valor máximo de concentração 1,7 vezes maior.^{31-33, 92-94}.

Tabela 5: Constantes de dimerização de porfirinas em meio neutro de Tampão Fosfato Salino pH 7,2 e temperatura de 25°C e meio neutro de Tampão Fosfato pH 7,2 contendo 1,0% (v/v) de Tween 20 (nesse caso os dados são a média \pm s; n=3).

	K_d (mol ⁻¹ .L)	Faixa de concentração
PBS pH 7,2	$(1,9 \pm 0,4)10^7$	0,01 a 1,00 μ mol.L ⁻¹
Tampão Fosfato pH 7,2 /T20 1,0% (v/v)	$(4,07 \pm 0,04)10^6$	0,5 a 1,7 μ mol.L ⁻¹

4.4 EFICIÊNCIA DOS FOTOSSENSIBILIZADORES

4.4.1 Fotoxidação de Biomoléculas por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.

4.4.1.1 Triptofano.

Em nosso trabalho também foi avaliada a influência da concentração de surfactante no meio. Como foi verificado na Figura 10, não houve uma variação significativa da intensidade de fluorescência da MgPpIX em meios que continham concentrações de Tween 20 acima de 0,2% (v/v). Agora, essa avaliação é feita em relação à velocidade do fotossensibilizador em fotoxidar o aminoácido triptofano.

Na Figura 18 é possível observar, através da inclinação da reta, a variação da constante de velocidade de fotoxidação do Trp em meios contendo diferentes concentrações de Tween 20 para cada um dos fotossensibilizadores analisados.

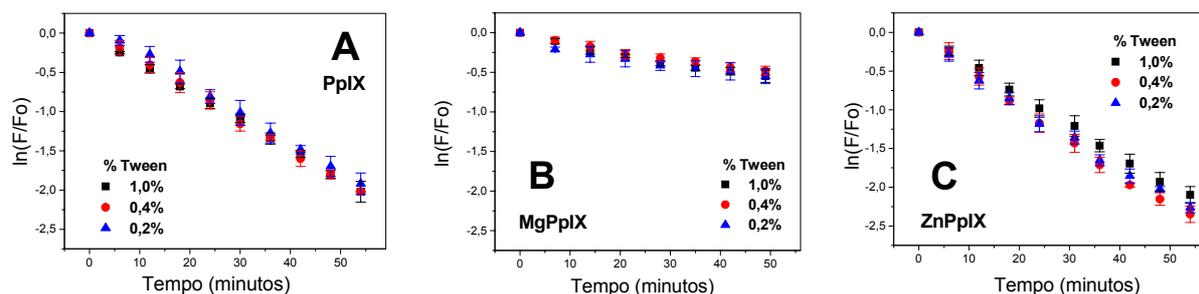


Figura 18: Análise da influência da % de Tween 20 na fotoxidação de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Trp: constante de velocidade de fotoxidação (inclinação da reta) em um meio contendo uma concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de (A) PpIX ou (B) MgPpIX ou (C) ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 0,2%; 0,4% e 1,0% (v/v). [Triptofano: $\lambda_{\text{excitação}} = 285 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 350 \text{ nm}$]. Os dados são a média \pm s (n=3).

As constantes de velocidade de fotodegradação (k_F) de $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Trp e $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de fotossensibilizador em Tampão Fosfato pH 7,2/ Tween 20 1,0; 0,4 e 0,2 % (v/v) obtidas através da Figura 18 estão relacionadas na Tabela 6.

Tabela 6: Constantes de velocidade de fotodegradação (k_F) do triptofano por Protoporfirina IX, Protoporfirina IX de Magnésio e Protoporfirina IX de Zinco em Tampão Fosfato pH 7,2 contendo diferentes concentrações de Tween 20. Os dados são a média \pm s (n=3).

% Tween	k_F (PpIX) [s^{-1}]	k_F (MgPpIX) [s^{-1}]	k_F (ZnPpIX) [s^{-1}]
0,2 % (v/v)	$(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	$(9,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$	$(4,16 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$
0,4 % (v/v)	$(3,82 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	$(9,5 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	$(4,47 \pm 0,08) \cdot 10^{-2}$
1,0 % (v/v)	$(3,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$(1,29 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$

Tanto pela Figura 18, quanto pela Tabela 6 é possível verificar que a constante de velocidade de fotoxidação de triptofano é independente da porcentagem de surfactante no meio. A análise dos dados de cada sensibilizador através do Teste F^{95} confirmou que não há uma diferença estatística significativa entre os resultados obtidos nas três concentrações de Tween 20. Desse modo, a comparação da eficiência dos fotossensibilizadores foi feita a partir da obtenção, para cada sensibilizador, de uma única constante de velocidade (Tabela 7).

Tabela 7: Análise da eficiência do fotossensibilizador através da razão entre k_F (PpIX) e k_F (metaloPpIX). Os dados são a média \pm s (n=9, para MgPpIX e PpIX e n=10 para ZnPpIX).

k_F (PpIX) / k_F (ZnPpIX)	0,90 \pm 0,08
k_F (PpIX) / k_F (MgPpIX)	3,4 \pm 0,6
k_F (ZnPpIX) / k_F (MgPpIX)	3,8 \pm 0,7

Verifica-se pela Tabela 7 que, nas condições estudadas, a eficiência de degradação do Trp segue a seguinte série PpIX \approx ZnPpIX > MgPpIX. Pelas constantes de fotoxidação obtidas verifica-se que, na faixa concentração de Tween 20 utilizada, não houve variação significativa na constante, o que significa que a partir da concentração de 0,2% (v/v) de Tween 20 já existem micelas suficientes para manter uma boa quantidade de fotossensibilizador monomerizado e, portanto, apto a ser excitado resultando na degradação do triptofano. Esse resultado já era, de certa forma, esperado, pois a concentração de Tween 20 em solução está acima da concentração micelar crítica (0,059 mmol.L⁻¹).

4.4.1.2 Albumina Bovina (BSA).

Não só o estudo da fotoxidação de aminoácidos livres como também estudos da fotoxidação de proteínas e, portanto, dos aminoácidos componentes dessas macromoléculas (principalmente o triptofano) servem como parâmetro para a análise da eficiência de um fotossensibilizador¹⁷.

Nesse projeto, a fotoxidação *in vitro* da proteína albumina pela MgPpIX e pela ZnPpIX foi comparada com a fotoxidação da BSA pela PpIX. Essa comparação foi utilizada como medida da eficiência das MetaloPpIX analisadas. Nesse caso, a fotoxidação de BSA foi observada através da variação da fluorescência do triptofano, apesar da cisteína, da metionina, da tirosina e da histidina serem plausíveis de sofrerem degradação. Para efeito de otimização, ao utilizarmos os termos fotoxidação da BSA e BSA consumida, estaremos, na verdade, nos referindo a fotoxidação e/ou consumo dos aminoácidos triptofano existentes na BSA.

Da mesma maneira que os ensaios utilizando triptofano, os experimentos com BSA foram conduzidos em condições de saturação de oxigênio e, portanto, uma cinética

de pseudo-primeira ordem para a fotoxidação do substrato. No entanto, somente a fotoxidação causada pela MgPpIX pareceu seguir uma cinética de primeira ordem enquanto a da PpIX corresponde a um modelo matemático de segunda ordem e a ZnPpIX, a um modelo de quarta ordem (Figura 19). Uma cinética de quarta ordem não tem significado físico, porque implicaria no encontro de quatro moléculas para que ocorra a reação. Portanto vários fatores devem estar interferindo na cinética de reação, tais como alterações conformacionais que acontecem na proteína devido à ligação do fotossensibilizador ou a destruição de outros aminoácidos susceptíveis a fotoxidação. Essas alterações de conformação tanto poderiam estar impedindo a exposição de aminoácidos, protegendo-os da fotoxidação, quanto poderiam estar expondo ao ataque resíduos outrora protegidos. Um estudo feito por Silvester *et al*⁹⁶ nos fornece indícios do que poderia estar ocorrendo durante o processo de fotoxidação da BSA. Nesse estudo os pesquisadores verificaram que a fotoxidação de BSA por hematoporfirina (Hp) e porfirina de tetrametilenepiridínio (TMPP) ocorre em dois diferentes sítios específicos da proteína: nos resíduos Trp-135 e/ou Trp-214 e no resíduo Cis-34 (cisteína). A fotoxidação da Cis-34 gera radicais RS*. Acredita-se que, no caso da Hp, a formação dos radicais RS* ocorra por “transferência de dano” através da proteína iniciando-se no sítio de ligação do fotossensibilizador e propagando-se através de transferência de elétrons até o resíduo Cis-34. No caso da TMPP, a formação parece ocorrer através de ataque direto de espécies reativas em solução. Além dos radicais RS*, foi observada a formação de radicais em carbonos terciários no triptofano que coincide com a diminuição da fluorescência da BSA. A formação desses radicais a partir do triptofano poderia estar ocorrendo via transferência de elétrons no caso da HP e por oxidação direta no caso da TMPP. Observou-se também que esses radicais não causam uma agregação ou fragmentação significativa da proteína, mas aumenta a susceptibilidade da mesma ao ataque por proteases. Além disso, verificou-se que os radicais formados a partir dos resíduos de aminoácidos da BSA podem provocar o fotobranqueamento dos sensibilizadores, diminuindo sua eficiência⁹⁶.

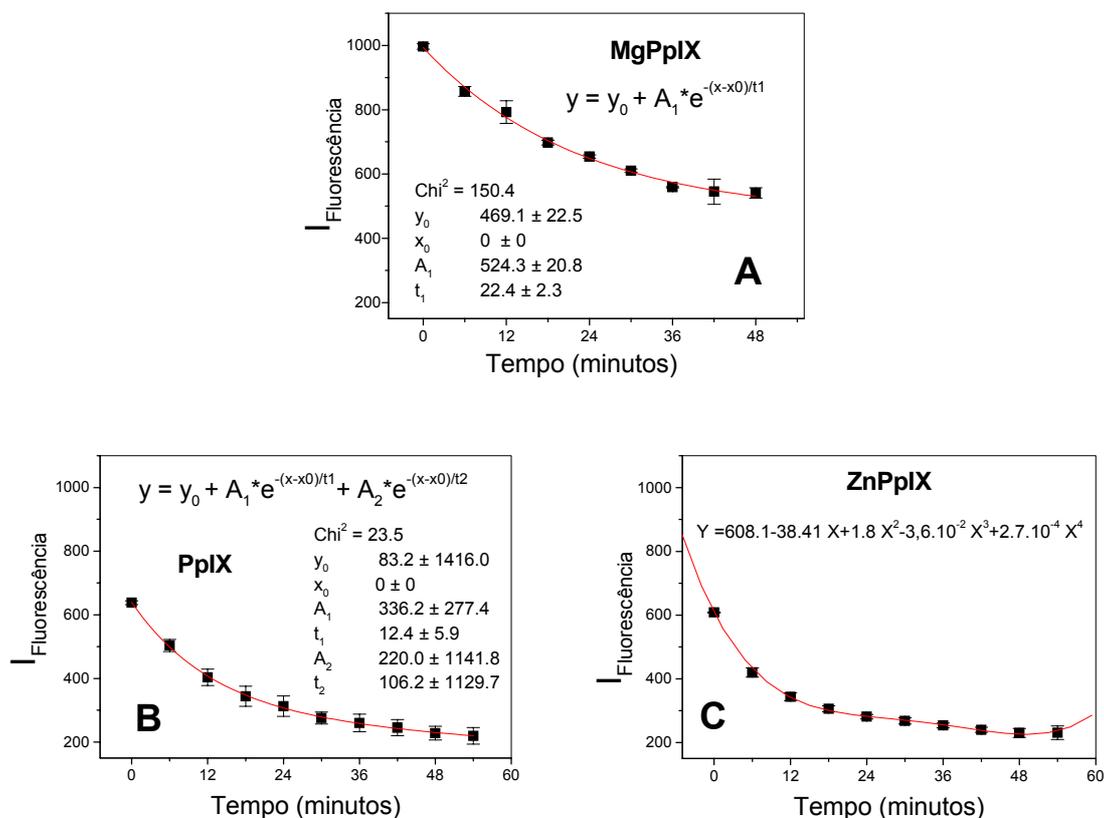


Figura 19: Fotoxidação de BSA por soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de **(A)** MgPpIX ou **(B)** PpIX ou **(C)** ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 1,0% (v/v) [BSA: $\lambda_{\text{excitação}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 330 \text{ nm}$].

Como as cinéticas de fotoxidação da BSA encontradas para as protoporfirinas estudadas não são de mesma ordem, não foi possível fazer uma comparação direta entre as constantes de fotoxidação da BSA pelos fotossensibilizadores, sendo assim, optou-se por determinar o consumo de aminoácidos triptofano da BSA em tempos específicos^{17,97}.

A Figura 20 apresenta a porcentagem de aminoácidos triptofano da BSA consumidos em soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em PB/ Tween 20 1,0% (v/v).

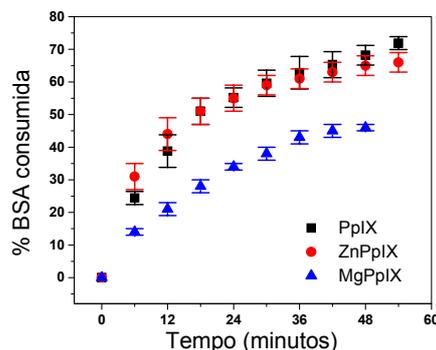


Figura 20: Consumo de aminoácidos triptofano da BSA em soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 1,0% (v/v) irradiação com lâmpada de Hg [BSA: $\lambda_{\text{excitação}} = 295 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 330 \text{ nm}$]. Os dados são a média $\pm s$ (n=3).

A Figura 20 mostra que a curva de consumo de BSA pela ZnPpIX é igual à curva da PpIX. O consumo de BSA pela MgPpIX mostrou-se menor que o da PpIX. Analisando pontualmente os consumos em 6 e 48 minutos, por exemplo, temos a seguinte situação (Tabela 8):

Tabela 8: Porcentagem de BSA consumida em soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em Tampão Fosfato pH7,2 / Tween 20 1,0% (v/v) após 6 e 48 minutos de irradiação com lâmpada de Hg. e relação % de BSA consumida pela PpIX / % de BSA consumida pela metaloprotoporfirina. Os dados são a média $\pm s$ (n=3).

	% BSA consumida		PpIX / MetalopPpIX	
	6 minutos	48 minutos	6 minutos	48 minutos
PpIX	24 \pm 2	68 \pm 3		
MgPpIX	14 \pm 1	46 \pm 1	1,7 \pm 0,2	1,48 \pm 0,07
ZnPpIX	31 \pm 4	65 \pm 3	0,8 \pm 0,1	1,05 \pm 0,05

A análise da Figura 20 e da Tabela 8 mostra que a eficiência de fotoxidação da BSA segue a mesma série do Trp, isto é, $\text{PpIX} \approx \text{ZnPpIX} > \text{MgPpIX}$, sendo, a relação %BSA consumida pela PpIX / %BSA consumida pela MetalopPpIX em 6 minutos é praticamente a mesma que em 48 minutos. Além disso, que a ZnPpIX e a PpIX fotoxidam cerca de 1,5 vezes mais BSA que a MgPpIX, independente do tempo.

Através desse experimento foi possível verificar que as MetalopPpIX estudadas são eficientes na fotoxição da BSA. A escolha da albumina bovina e não da albumina humana

para essa análise foi somente uma questão de custo e facilidade de obtenção, e não interfere drasticamente na análise dos fotossensibilizadores, visto que, o que estava sendo avaliado era a capacidade de cada composto analisado em fotoxidar uma proteína qualquer, tendo em vista que o organismo é composto de inúmeras proteínas, cada uma com funções e importância específicas.

4.4.2 Hemólise de células vermelhas do sangue.

4.4.2.1 Lise das hemácias por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.

Para avaliação da eficiência fotodinâmica também foi analisada a capacidade dos sensibilizadores em destruir células.

Até o presente momento os ensaios para avaliação da eficiência do fotossensibilizador estavam sendo realizados em um meio contendo 1,0 % (v/v) de Tween 20 em solução. No entanto, verificou-se que essa concentração promovia uma hemólise significativa das células vermelhas do sangue, sem que houvesse a necessidade de irradiá-las na presença de fotossensibilizador. Essa propriedade hemolítica de surfactantes não iônicos já é bem conhecida e avaliada, desse modo, sabe-se que, se utilizado em concentrações corretas, ao invés de provocar a hemólise da célula através da solubilização de lipídeos e proteínas, o surfactante pode funcionar como um agente protetor contra a lise das células vermelhas do sangue. Sendo assim, um teste nos mostrou que a hemólise causada por cada uma das porfirinas poderia ser analisada em soluções de 0,5% (v/v) hemácias em PBS/ Tween 20 0,045% (v/v), sem que houvesse a interferência do surfactante⁹⁸.

Os dados obtidos para comparação entre a porcentagem de hemólise por irradiação contínua de soluções que passaram ou não por um período de 30 minutos de pré-incubação está representada na Figura 21.

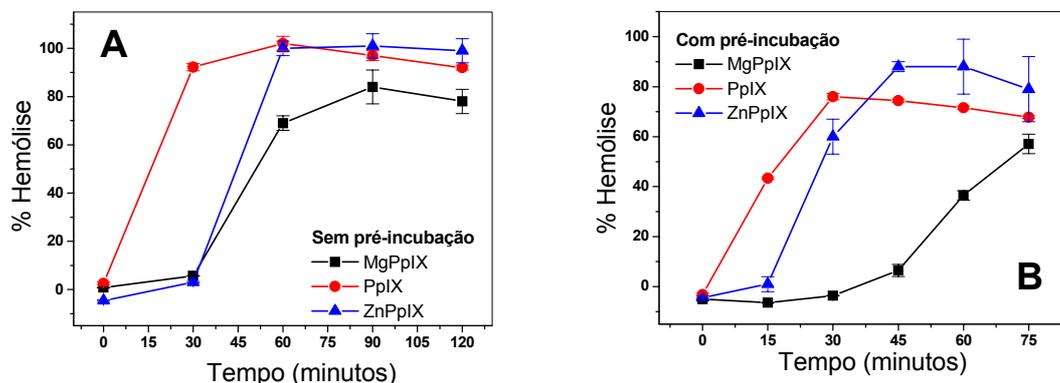


Figura 21: Eficiência da hemólise por irradiação contínua causada por $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX, MgPpIX ou ZnPpIX em soluções de 0,5% (v/v) de hemácias em PBS pH 7,4 / Tween 20 0,045% (v/v) **(A)** não submetidas à pré-incubação e **(B)** submetidas à pré-incubação. Os dados são a média \pm s (n=3).

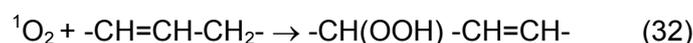
Verifica-se pela Figura 21 que, para o MgPpIX e para a PpIX, o perfil de hemólise é o mesmo independente se houve pré-incubação ou não da solução de eritrócitos. Para o ZnPpIX ocorre um adiantamento no tempo de início da lise significativa quando as hemácias são incubadas por 30 minutos com o fotossensibilizador. Nota-se, também que, independente do fotossensibilizador utilizado, a porcentagem de hemácias lisadas é maior nos ensaios realizados sem pré-incubação. Além disso, verificou-se que, em relação aos resultados encontrados nos ensaios com Trp e a BSA, a % de hemólise causada pelo MgPpIX é próxima da hemólise causada pelos outros fotossensibilizadores (Figura 21 A), no entanto, a eficiência continua sendo representada pela série: $\text{PpIX} \approx \text{ZnPpIX} > \text{MgPpIX}$. A análise da porcentagem de hemólise para soluções não submetidas à pré-incubação, no tempo de 90 minutos (tempo no qual a lise é máxima para todos os sensibilizadores) mostra que as relações de lise PpIX/MgPpIX e PpIX/ZnPpIX são próximas a 1 (Tabela 9). A diferença notada entre os fotossensibilizadores está no tempo de início de uma hemólise significativa, pois essa varia com sensibilizador, sendo mais rápido para a PpIX: após 30 minutos de irradiação a porcentagem de hemólise apresentada pela PpIX é igual à porcentagem apresentada pela ZnPpIX em 60 minutos e próxima da apresentada pela MgPpIX em 90 minutos.

Tabela 9: Porcentagem de hemólise por irradiação contínua em soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em PBS pH 7,4/ Tween 0.045% (v/v) após 90 minutos de irradiação (ensaio sem pré-incubação), e após 75 minutos (ensaio com pré-incubação) de irradiação com lâmpada de Hg e relação % de hemólise PpIX / % hemólise metaloprotoporfirina . Os dados são a média \pm s (n=3).

	% Hemólise		PpIX / Metaloprotoporfirina	
	75 minutos	90 minutos	75 minutos	90 minutos
PpIX	67,8 \pm 0,5	97 \pm 2		
MgPpIX	57 \pm 4	84 \pm 1	1,19 \pm 0,08	1,2 \pm 0,1
ZnPpIX	79 \pm 13	101 \pm 4	0,9 \pm 0,1	0,96 \pm 0,05

Analisando-se a Figura 21B verifica-se que a pré-incubação aumenta a distinção entre os fotossensibilizadores, principalmente em relação à MgPpIX. Mesmo assim, a eficiência de hemólise ainda é representada pela série: PpIX \approx ZnPpIX > MgPpIX. Além disso, o tempo de início da hemólise causada pela ZnPpIX diminuiu de 60 minutos sem a incubação para 30 minutos com a incubação. Como esse ensaio foi realizado com medidas a cada 15 minutos verificou-se que os tempos de início de hemólise para PpIX e MgPpIX são, respectivamente, 15 e 45 minutos. A análise da porcentagem de hemólise para soluções submetidas à pré-incubação, no tempo de 75 minutos mostra que as relações de lise PpIX/MgPpIX e PpIX/ZnPpIX são próximas à 1 (Tabela 9). Nota-se pela Tabela 9 que, apesar da diferença existente entre as eficiências das amostras tratadas com e sem pré-incubação, a razão PpIX/Metaloprotoporfirina é praticamente a mesma independente do tratamento inicial recebido pela hemácia.

Estudos afirmam que a protoporfirina IX causa a hemólise de células vermelhas através de um mecanismo que envolve a geração de oxigênio singleto⁹⁹:



O estado triplete da PpIX é suprimido pelo oxigênio para gerar oxigênio singleto (Eq.31), que por sua vez, reage com lipídeos insaturados (membranas) originando os hidroperóxidos correspondentes (Eq.32)⁹⁹.

Estudos mostram que a irradiação de uma suspensão de hemácias na presença de fotossensibilizadores resulta na danificação de eritrócitos através da acumulação de produtos de peroxidação das membranas, oxidação da forma reduzida da glutathione

cellular e hemólise. Girotti⁸² relacionou o efeito de lise das hemácias pela PpIX à uma possível danificação da membrana celular, o que provocaria um rápido efluxo de K^+ e influxo de Na^+ , seguido pela intumescência da célula ao seu volume hemolítico. Além disso, Dubbelman *et al*¹⁰⁰ e Girotti¹⁰² verificaram que a fotoxidação causada pela protoporfirina IX em proteínas existentes nas membranas das hemácias causavam a agregação dessas proteínas. Segundo Dubbelman, cadeias laterais de ácidos graxos insaturados, colesterol e resíduos de açúcar e ácido neuraminico não são susceptíveis a fotoxidação por protoporfirinas. Girotti sugere que a agregação da proteína deve-se à formação de ligações cruzadas entre os resíduos dos aminoácidos degradados durante o processo (histidina, cisteína, tirosina e triptofano)^{82,100-102}.

4.4.2.2 Influência da concentração de MgPpIX, PpIX e ZnPpIX na hemólise de células vermelhas do sangue.

Optou-se por realizar o estudo da eficiência de hemólise *versus* concentração de sensibilizador em ensaios sem período de pré-incubação, pois o ensaio de hemólise por irradiação contínua acima discutido mostrou que a eficiência dos fotossensibilizadores é maior quando estes não são submetidos a um período de pré-incubação.

A Figura 22 permite a comparação da eficiência das três protoporfirinas em causar a lise das hemácias.

É possível observar pela Figura 22 que, a medida que se aumenta a concentração de fotossensibilizador, aumenta-se a eficiência da resposta (hemólise) e diminui-se o tempo de início da hemólise significativa.

Uma análise de cada um dos fotossensibilizadores nos mostra que:

- Figura 22A: Protoporfirina IX

As hemácias submetidas às concentrações de 2,5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ só começam a sofrer hemólise significativa após 15 minutos de irradiação, sendo que, em 30 minutos é possível observar nitidamente que a percentagem de hemólise é dependente da concentração de fotossensibilizador. Para as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, a hemólise total (100%) é alcançada em 45 minutos, também alcançada em 45 minutos. No caso da concentração de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ nota-se que a eficiência máxima está em torno de 60%. A concentração de 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ é uma exceção, pois o início da hemólise significativa e o alcance de 100% de hemólise são praticamente imediatos.

Após 30 minutos de irradiação não é possível distinguir os efeitos das concentrações de 5, 10 e 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, pois se atinge 100% de hemólise, no entanto verifica-se que, quanto menor a concentração, mais suave é o perfil hemolítico até o alcance do patamar em 100%.

- Figura 22B: Protoporfirina IX de Magnésio

A eficiência em causar hemólise é mais nítida no caso da MgPpIX. É possível verificar claramente que a porcentagem de hemólise e o tempo de início de hemólise significativa são dependentes da concentração de fotossensibilizador. Enquanto ao utilizar-se uma concentração de 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de fotossensibilizador é possível, em 60 minutos, alcançar um patamar de aproximadamente 85% de hemólise, ao utilizar-se uma concentração de 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a hemólise significativa só inicia-se após 30 minutos de irradiação, atingindo 80% somente em 120 minutos. Nos ensaios contendo hemácias e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX verificou-se que a hemólise significativa começa após 90 minutos de irradiação, sendo que, em 120 minutos essa hemólise é cerca de 50 %.

- Figura 22C: Protoporfirina IX de Zinco

Verificou-se que o tempo de início de hemólise significativa para as concentrações de 5 e 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ é o mesmo (após 30 minutos de irradiação), enquanto que, para concentração de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ a hemólise somente se inicia após 60 minutos de irradiação. Observa-se que somente 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ possui uma eficiência de 100% de hemólise. Para as demais concentrações o máximo de eficiência é de aproximadamente 70%, sendo que, o tempo para atingir essa porcentagem de hemólise varia conforme a concentração de fotossensibilizador presente em solução (45 minutos para a concentração de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 120 minutos para a concentração de 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

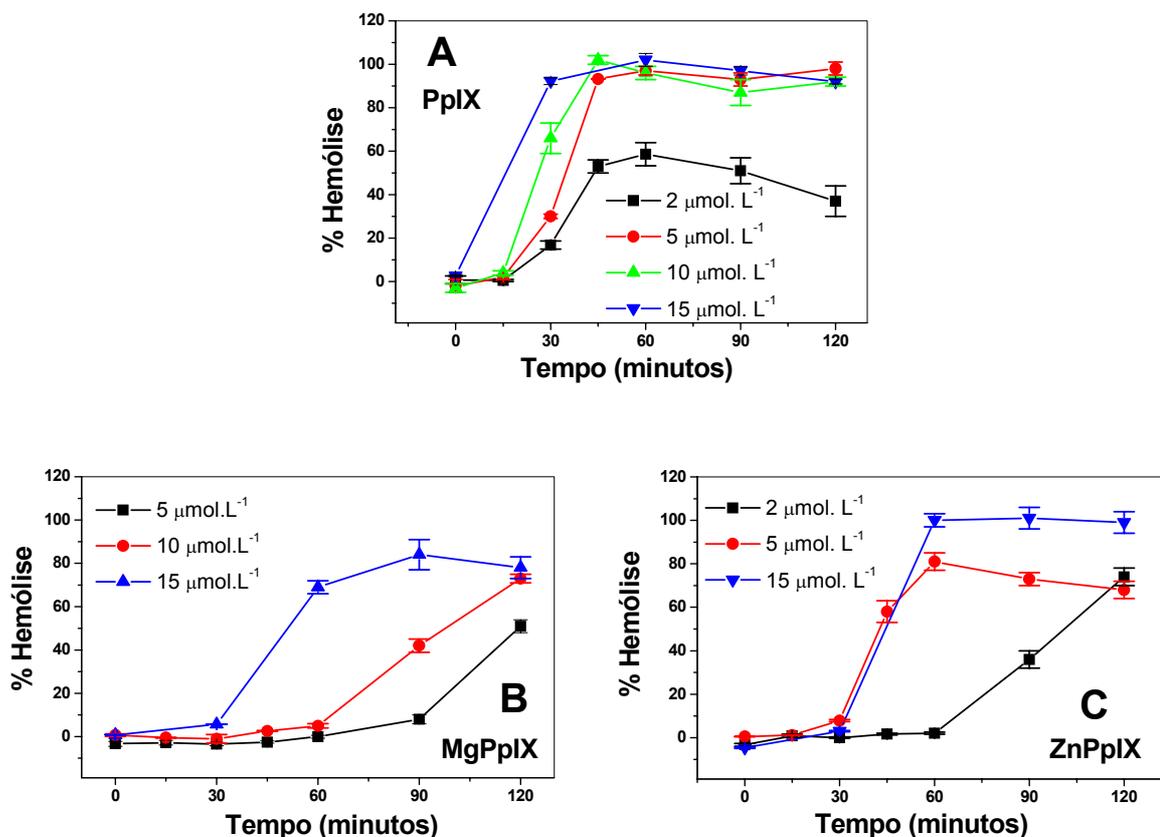


Figura 22: Eficiência da hemólise por irradiação contínua causada por (A) PpIX, (B) MgPpIX ou (C) ZnPpIX em soluções de 0,5% (v/v) de hemácias em PBS pH 7,4/ Tween 20 0,045% (v/v) não submetidas à pré-incubação. Os dados são a média \pm s (n=3).

Na Tabela 10 é feita uma análise pontual da porcentagem de hemólise em 30 minutos após o início do processo de irradiação e 90 minutos (fase final do processo). Uma análise dos dados nos mostra que, dentre os três fotossensibilizadores estudados, a PpIX apresenta a resposta mais imediata à irradiação, isto é, a porcentagem de hemólise em 30 minutos já é significativa, enquanto nos casos da MgPpIX e da ZnPpIX, essa porcentagem é muito baixa. Observa-se, também, pela Tabela 10 que, é necessária uma solução de concentração 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX e de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ZnPpIX para apresentar em 90 minutos uma eficiência de hemólise similar à apresentada em 30 minutos por uma solução de concentração 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX.

Tabela 10: Porcentagem de hemólise por irradiação contínua em soluções contendo PpIX ou MgPpIX ou ZnPpIX em PBS pH 7,4/ Tween 0.045% (v/v), após 30 e 90 minutos de com lâmpada de Hg. Os dados são a média \pm s (n=3).

<i>Fotossensibilizador</i>	<i>Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)</i>	<i>% Hemólise</i>	
		<i>30 minutos</i>	<i>90 minutos</i>
<i>PpIX</i>	2	17 \pm 2	51 \pm 6
	5	30 \pm 1	93 \pm 3
	10	66 \pm 7	87 \pm 6
	15	92 \pm 2	97 \pm 2
<i>MgPpIX</i>	5	0	8 \pm 2
	10	0	42 \pm 3
	15	5,69 \pm 0,03	84 \pm 7
<i>ZnPpIX</i>	2	0,0 \pm 0,3	36 \pm 4
	5	7,9 \pm 0,5	73 \pm 3
	15	3,0 \pm 0,3	101 \pm 5

Podemos retirar da Figura 22 outro conjunto interessante de dados sobre a variação de concentração dos fotossensibilizadores: o tempo para atingir 50% de eficiência de hemólise (Tabela 11).

Observa-se pela Tabela 11 que, que quanto maior a concentração de fotossensibilizador utilizada, mais rápido é alcançado 50% de hemólise. Observa-se também, que o tempo que uma solução de concentração 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX e de 5 ou 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ZnPpIX demora em atingir 50% de hemólise é similar ao apresentado por uma solução de concentração 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de PpIX. Esses dados comprovam a necessidade de determinação da concentração ideal de aplicação *in vivo* do fotossensibilizador, para que o máximo efeito seja alcançado com o mínimo de tempo de irradiação e a mínima toxicidade devido à concentração do fotossensibilizador.

Tabela 11: Tempo de irradiação necessário para que soluções contendo PpIX, MgPpIX ou ZnPpIX em PBS pH 7,4/ Tween 0.045% (v/v) atinjam 50% de hemólise. Os dados são a média \pm s (n=3).

Fotossensibilizador	Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Tempo (minutos)
PpIX	2	~45
	5	~35
	10	~35
	15	~15
MgPpIX	5	~120
	10	~90
	15	~45
ZnPpIX	2	~105
	5	~40
	15	~40

O estudo *in vitro* do efeito da variação da concentração de fotossensibilizador é parâmetro muitas vezes relacionado a farmacocinética de acumulação do mesmo no organismo. É comum a aplicação *in vivo* de diferentes concentrações de fotossensibilizadores e o acompanhamento do efeito gerado pelo mesmo durante o tratamento. Como exemplos podemos citar os estudos realizados por Bissonnette *et al*¹⁰³ e de Blois *et al*¹⁰⁴. Bissonnette avaliou o efeito de diferentes doses de ALA aplicadas por via oral em pacientes com psoríase, através da fluorescência na pele e hemácias e verificou que a localização do fotossensibilizador dependia da quantidade administrada e que, quanto maior essa quantidade, maior a tendência de encontrá-lo em tecidos saudáveis e maiores os danos causados pela PDT. de Blois chegou à mesma conclusão ao aplicar diferentes concentrações de ALA no tratamento de carcinomas em células basais. Além disso, de Blois verificou, através da comparação de dois métodos de aplicação de ALA (tópica e injeções intracutâneas), que a quantidade a ser aplicada e o efeito final dependia do meio de administração do fotossensibilizador^{103,104}.

4.4.2.3 Hemólise pós-irradiação por MgPpIX, PpIX e ZnPpIX.

As concentrações de fotossensibilizadores utilizadas nesse ensaio (PpIX: 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; MgPpIX: 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e ZnPpIX: 15 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) foram escolhidas pois todas

apresentam hemólise significativa após 30 minutos de irradiação, dessa forma seria possível a comparação uma vez que, todos os sensibilizadores estariam sendo irradiados por um mesmo *tempo mínimo de irradiação* para o início da hemólise. Nesse experimento as soluções de células vermelhas do sangue foram irradiadas por 30 minutos e mantidas no escuro por um período de 2 horas após o fim da irradiação, análises da % hemólise foram feitas em intervalos regulares de tempo através da retirada e tratamento de alíquotas das soluções.

A Figura 23 permite a comparação da eficiência das três protoporfirinas em causar a lise pós-irradiação das hemácias.

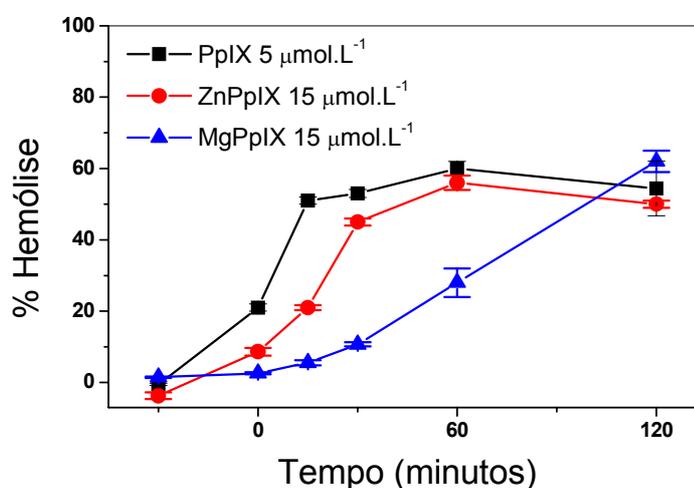


Figura 23: Eficiência da hemólise pós-irradiação causada por PpIX 5 µmol.L⁻¹, MgPpIX 15 µmol.L⁻¹ ou ZnPpIX 15 µmol.L⁻¹; soluções de 0,5% (v/v) de hemácias em PBS/Tween 20 0,045% (v/v). Os dados são a média ± s (n=2). O tempo anterior ao tempo 0 (zero) minutos corresponde à condição da amostra antes do início da irradiação e o tempo 0 (zero) minutos corresponde à condição da amostra imediatamente após a irradiação.

É possível observar pela Figura 23 que o tempo de início de hemólise significativa ainda é diferente para cada fotossensibilizador, mesmo escolhendo-se concentrações nas quais, em um processo de irradiação contínua, após 30 minutos de irradiação já se iniciava a hemólise. Através dessa análise verificou-se que o tempo mínimo para início de hemólise significativa ainda mantém o mesmo padrão encontrado para as análises com irradiação contínua durante 2 horas: PpIX < ZnPpIX < MgPpIX. Apesar do início da

hemólise ser ligeiramente mais lento, ZnPpIX e MgPpIX apresenta praticamente a mesma eficiência que a PpIX ao final do processo.

Através da Figura 23 podemos obter o tempo para atingir 50% de eficiência de hemólise pós-irradiação (Tabela 12).

Tabela 12: Tempo necessário (pós-irradiação) para que soluções contendo PpIX $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, MgPpIX $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ou ZnPpIX $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em PBS pH 7,4/ Tween 0.045% (v/v) atinjam 50% de hemólise.

Fotossensibilizador	Tempo (minutos)
<i>PpIX</i> $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$	~15
<i>ZnPpIX</i> $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$	~ 45
<i>MgPpIX</i> $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$	~ 100

Pela Tabela 12 podemos observar que, dentre os três fotossensibilizadores estudados, a PpIX é o que apresenta a resposta mais imediata após a irradiação, isto é, em 15 minutos já é atingida uma hemólise de 50% das células em solução, enquanto nos casos da MgPpIX e da ZnPpIX, é necessário um tempo, respectivamente 3,0 e 6,7 vezes maior que o da PpIX para que seja alcançada a mesma percentagem de hemólise. Vale ressaltar que as concentrações de MgPpIX e ZnPpIX são 3 vezes maiores que a concentração de PpIX.

A diferença na resposta encontrada nesse experimento (eficiência: PpIX \cong ZnPpIX \cong MgPpIX) em relação aos demais experimentos desse projeto pode estar relacionado com os mecanismos envolvidos no processo, uma vez que esse é o único ensaio realizado com dados de pós-irradiação. Nesse caso o que estaria sendo avaliado é a propagação do efeito de uma irradiação inicial, e não o efeito de inúmeras irradiações seguidas. A diferença na porcentagem final de hemólise entre os experimentos envolvendo irradiação contínua e pós-irradiação pode estar relacionados, por exemplo, danos progressivos (danos causados durante o período de irradiação que se propaga no período em que a célula é mantida no escuro) causados à membrana da hemácia nos casos de pré-irradiação e danos progressivos e cumulativos (novos pontos da célula são danificados a cada período de irradiação) nos casos de irradiação contínua. Estudos tem mostrado o dano causado pelo fotossensibilizador nas hemácias através das chamadas “light haemolysis” (hemólise por irradiação contínua) e “dark haemolysis” (hemólise pós-

irradiação). Esse dano está relacionado ao aumento significativo na fluidez da membrana (provavelmente devido à formação de defeitos nas membranas) e ao aumento da área superficial da membrana, o que afetaria a estabilidade osmótica da membrana. A hemólise não ocorreria devido ao desenvolvimento progressivo de peroxidação de lipídeos, nem à oxidação de glutatona, nem a distúrbios na permeabilidade passiva de íons. A hemólise seria, em parte, resultado da denaturação e agregação da membrana, além disso, seria potencial-dependente, isto é, uma diminuição do potencial da membrana inibiria ambos os tipos de hemólise.^{100, 105}

4.4.3 Considerações finais sobre a fotoxidação de biomoléculas e hemácias.

Os resultados obtidos, tanto para a fotoxidação do triptofano, quanto para a fotoxidação da BSA e para a hemólise para cada protoporfirina, parecem discordantes se levarmos em consideração que se trata de uma mesma estrutura base, no entanto, devemos lembrar que a eficiência de um fotossensibilizador está relacionada com o rendimento quântico do estado triplete, que por sua vez, depende do átomo central do anel tetrapirrólico. Tomando por base os rendimentos quânticos apresentados no Quadro 1 para mesoporfirinas IX (MESO), para tetrafenilporfinas (TPP) e para etioporfirinas I (ETIO) podemos fazer algumas considerações no caso das protoporfirinas estudadas³⁰.

Quadro 1: Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) e rendimento quântico do estado triplete (ϕ_T) para derivados de mesoporfirinas IX (MESO), tetrafenilporfinas (TPP) e etioporfirinas I (ETIO)³⁰.

	MESO			TPP			ETIO		
	H ₂	Mg	Zn	H ₂	Mg	Zn	H ₂	Mg	Zn
ϕ_F	0,12	0,20	0,05	0,13	0,15	0,04	0,17	0,25	0,04
ϕ_T	0,8	0,62	0,86	0,82	--	0,88	--	--	--

Sabe-se que, quanto menor o rendimento quântico da fluorescência, maior o rendimento quântico do estado triplete³⁰. Isto pode ser notado através dos dados apresentados no Quadro 1 para a MESO e para TPP. Pelo Quadro 1 também podemos notar que os valores do rendimento quântico tanto da fluorescência, quanto do estado triplete, dependem basicamente do átomo central, e não do anel. Desse modo, poderíamos, então, supor que para as protoporfirinas IX estudadas o rendimento quântico do estado triplete do átomo central também seguiria a série: H \approx Zn > Mg, o que explicaria

a série de eficiência encontrada na fotoxidação do Trp, da BSA e das hemácias irradiadas continuamente.

4.5 FOTOBANQUEAMENTO DE MgPpIX, PpIX E ZnPpIX.

4.5.1 Controle de fotobranqueamento dos fotossensibilizadores em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v).

Os perfis de fotobranqueamento das protoporfirinas estudadas podem ser avaliados através da Figura 24.

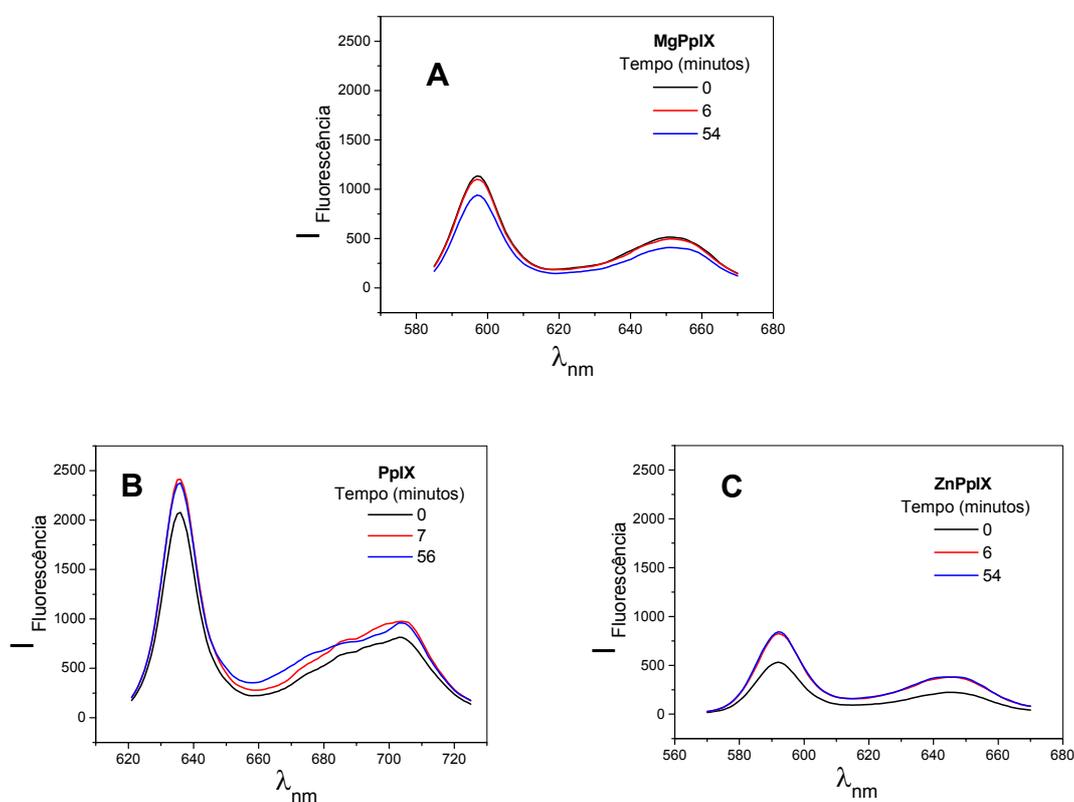


Figura 24: Perfil de fotobranqueamento de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de **(A)** MgPpIX **(B)** PpIX e **(C)** ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v) submetidas à irradiação com lâmpada de Hg. [$\lambda_{\text{excitação}} = 408 \text{ nm}$ para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{\text{emissão}} = 636 \text{ nm}$ para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX].

Na Figura 24 estão representados os espectros de fluorescência das protoporfirinas antes do início da irradiação, após o primeiro intervalo de irradiação e após o último intervalo de irradiação. Pela Figura 24A é possível verificar o fotobranqueamento da MgPpIX através da diminuição da intensidade de fluorescência após 54 minutos de irradiação. Após 6 minutos de irradiação a fotodegradação do composto não é significativa. Na Figura 24B está representado o perfil de fluorescência da PpIX, onde verifica-se que ocorre um ligeiro aumento da fluorescência após 7 minutos, a qual varia muito pouco após 56 minutos de irradiação. Nota-se também o surgimento de uma nova banda na região de 670 nm, provavelmente um fotoproduto da degradação da protoporfirina IX. Já a ZnPpIX (Figura 24C) apresenta um perfil muito semelhante ao da PpIX. Verifica-se que após 6 minutos de irradiação ocorre um aumento significativo da fluorescência do composto, que se mantém constante durante os 54 minutos de irradiação.

A Figura 25, na qual está correlacionada a variação da fluorescência dos fotossensibilizadores em comprimentos de onda específicos com o tempo de irradiação, nos possibilita fazer uma melhor avaliação do que está ocorrendo na Figura 24.

Pela Figura 25 é possível observar nitidamente o decaimento da fluorescência inerente ao fotobranqueamento da MgPpIX, sendo a constante de velocidade de fotobranqueamento, calculada através de um gráfico de $\ln(I_F/I_{F0})$ contra tempo (minutos), igual à $(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Em termos práticos essa constante equivale, após 48 minutos de irradiação, a um consumo de 24% da concentração inicial de fotossensibilizador em solução.

O fotobranqueamento da PpIX e da ZnPpIX (Figura 25) não é tão nítido como o da MgPpIX. Aparentemente ocorre um aumento da intensidade de fluorescência do fotossensibilizador, seguido de uma discreta queda dessa intensidade. Uma hipótese para esse comportamento estaria baseada no estado de agregação dos compostos. Como já foi visto no item 4.3.1, a PpIX e a ZnPpIX são mais propensas a agregação que a MgPpIX (essa afirmação é confirmada, tanto pelo valor da constante de dimerização, quanto pela faixa de concentração utilizada para cálculo dessa constante), dessa maneira, o aumento da intensidade de fluorescência da PpIX e da ZnPpIX poderia ser explicado se considerarmos que monômeros e agregados desses compostos estão em equilíbrio na solução. Ao se irradiar a solução, ocorreria a degradação dos agregados e/ou monômeros, o que por sua vez ocasionaria a monomerização dos agregados para que o equilíbrio na solução fosse mantido, afetando diretamente a intensidade de fluorescência

(monômeros são mais fluorescentes que agregados) justificando o aumento da fluorescência. A partir do momento em que não existisse mais um número significativo de agregados em solução (para a produção de monômeros), seria possível verificar o “grau” de fotobranqueamento, pois a intensidade de fluorescência diminuiria proporcionalmente à degradação do fotossensibilizador pela luz. O que é, nesse trabalho, uma hipótese para protoporfirinas, é um fato comprovado para hematoporfirina e hematoporfirina diacetato no estudo desenvolvido por Rotomskiene *et al*¹⁰⁶. Em solução aquosa de tampão fosfato pH 7,4 esses sensibilizadores encontram-se altamente agregados. Com a incidência de luz ocorreu a formação de um fotoproduto que absorve na região de 640 nm. Tal fotoproduto é originário da fotodegradação tanto de monômeros livres, quanto de monômeros provenientes da desagregação dos agregados¹⁰⁶.

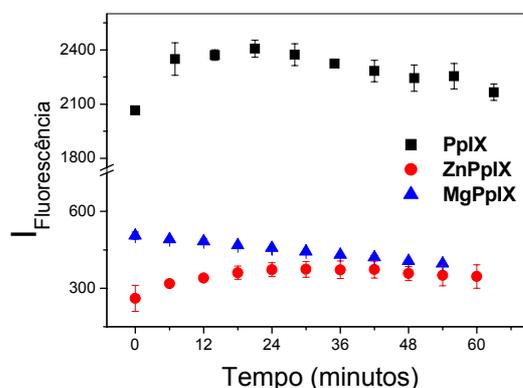


Figura 25: Análise de fotodegradação de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de MgPpIX, PpIX ou ZnPpIX em Tampão Fosfato pH 7,2/Tween 20 1,0% (v/v) submetidas à irradiação com lâmpada de Hg. Os dados são a média \pm s ($n=2$ para PpIX e MgPpIX e $n=3$ para ZnPpIX). [$\lambda_{\text{excitação}} = 408 \text{ nm}$ para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{\text{emissão}} = 636 \text{ nm}$ para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX].

4.5.2 Controle de fotobranqueamento dos fotossensibilizadores em PBS pH 7,4 /Tween 20 0,045% (v/v).

Para verificar se o patamar de hemólise observado nos ensaios com a MgPpIX não era devido ao fotobranqueamento do sensibilizador foi obtida a constante de velocidade de fotobranqueamento de uma solução de MgPpIX $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em PBS pH 7,4/T20 0,045% (v/v) irradiada por períodos de 15 minutos, durante 120 minutos. Devido aos resultados obtidos (Tabela 13), foram também foram obtidas as constantes

para os demais fotossensibilizadores. Essas constantes foram comparadas às obtidas em soluções de Tampão Fosfato pH 7,2/T20 1,0 % (v/v), apesar das diferenças na composição dos meios (meio salino e pH), pois essas diferenças não se mostraram, durante o projeto, um interferente direto na realização dos ensaios e análise dos dados.

Verifica-se pela Tabela 13 que ao se diminuir consideravelmente a concentração de surfactante (cerca de 20 vezes) ocorre um fotobranqueamento mais significativo da PpIX e da ZnPpIX e também há um aumento de aproximadamente 3 vezes na velocidade de degradação do MgPpIX. Verifica-se também que, a velocidade de fotodegradação da PpIX quando o meio contém 0,045% (v/v) de Tween 20 é cerca de 1,4 vezes maior que a degradação do MgPpIX em em meio com Tween 20 1,0% (v/v) e a da ZnPpIX em Tween 20 0,045% (v/v) é igual a da MgPpIX em em meio com Tween 20 1,0% (v/v).

Tabela 13: Constante de velocidade de fotodegradação de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de protoporfirina em Tampão Fosfato pH 7,2 ou PBS pH 7,4 contendo Tween 20. Os dados são a média \pm s (n=2 para PpIX e MgPpIX e n=3 para ZnPpIX). Entre parênteses estão relacionadas às porcentagens de fotossensibilizador consumido (em relação à concentração inicial em solução) após 48 minutos de irradiação com lâmpada de Hg.

% T20 em solução	Constante de MgPpIX	Velocidade de PpIX	Fotobranqueamento (s⁻¹) ZnPpIX
0,045 % (v/v)	$(1,31 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$ [65%]	$(6,3 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$ [35%]	$(4,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$ [27%]
1,0 % (v/v)	$(4,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$ [24%]	Não sofre fotobranqueamento significativo	Não sofre fotobranqueamento significativo

Através da Figura 26 é possível observar o perfil de fotobranqueamento dos sensibilizadores bem como os respectivos espectros de absorção após 2 horas de irradiação com lâmpada de mercúrio.

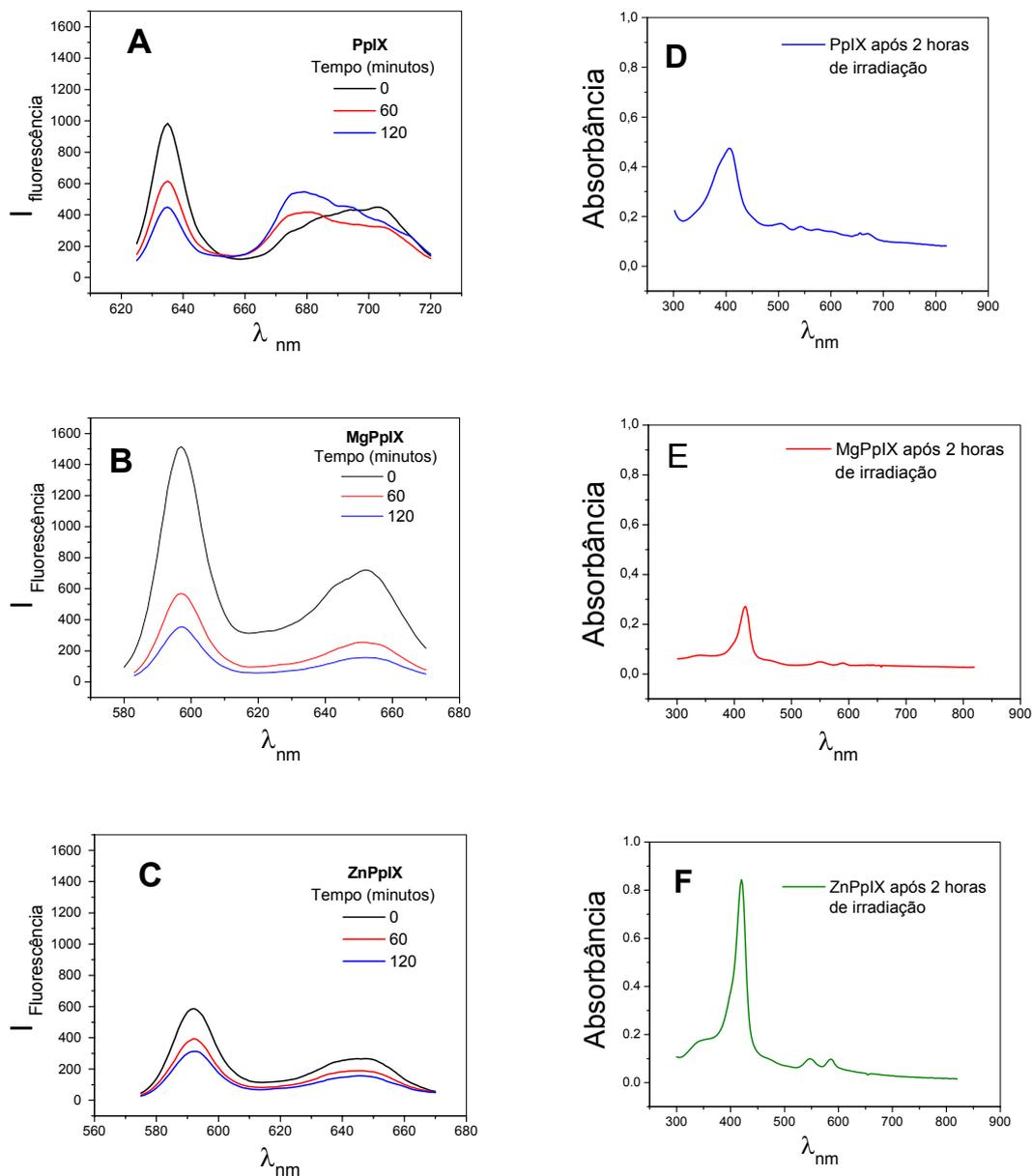


Figura 26: Perfil de fotodegradação de soluções contendo $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de **(A)** PpIX **(B)** MgPpIX e **(C)** ZnPpIX em PBS/Tween 20 0,045% submetidas à irradiação com lâmpada de Hg [$\lambda_{\text{excitação}} = 408 \text{ nm}$ para PpIX e 422 nm para ZnPpIX e MgPpIX e $\lambda_{\text{emissão}} = 636 \text{ nm}$ para PpIX, 645 nm para ZnPpIX e 650 nm para MgPpIX]. Espectros de Absorção de **(A)** PpIX **(B)** MgPpIX e **(C)** ZnPpIX em PBS/Tween 20 0,045% após 2 horas de irradiação.

Através de uma comparação entre a Figura 14 e a Figura 26 podemos verificar que todas as porfirinas sofreram uma diminuição na intensidade de absorbância quando a

concentração de Tween 20 no meio foi diminuída. Essa diminuição da concentração de surfactante acelerou a fotodegradação dos sensibilizadores (verificada através dos espectros de fluorescência dos compostos), levando-nos à conclusão que a quantidade de Tween 20 em solução estaria diretamente relacionada à susceptibilidade dos fotossensibilizadores à fotodegradação. Aparentemente, quanto maior a quantidade de surfactante em solução, menor o fotobranqueamento sofrido, sugerindo que as micelas de Tween 20 atuariam como uma camada protetora para os sensibilizadores.

Correlacionando a Figura 26A com a Figura 24B verifica-se que na presença de Tween 20 0,045 % (v/v) ocorre uma diminuição na intensidade da fluorescência da PpIX com o aumento do tempo de irradiação, sendo o comportamento inverso observado quando a análise é realizada em Tampão Fosfato pH 7,2 / Tween 20 1,0% (v/v) (Figura 24B). Além disso nota-se, na Figura 26A, a diminuição da intensidade fluorescência nos comprimentos de onda de 636 nm e 705 nm e o aparecimento de uma banda de absorção na região de 670-680 nm inexistente na Figura 14A. Esse comportamento da PpIX já foi reportado em literatura por König *et al*¹⁰⁷ que analisaram a fluorescência de PpIX *in vivo* utilizando um sensor de fibra óptica para acompanhar a formação dos fotoprodutos da irradiação da protoporfirina. Esses fotoprodutos foram descritos por Inhoffen *et al*¹⁰⁸ como dois tipos de clorinas formadas pela redução da dupla ligação dos substituintes vinil. Ericson *et al*¹⁰⁹ comprovaram que os fotoprodutos são resultados de fotoxidação, pois em amostras desoxigenadas, não são gerados fotoprodutos. Estudos realizados por Brancaleon e Moseley¹¹⁰ mostraram que o Ppp compete com a PpIX por sítios de ligação de proteínas metabolicamente importantes como a albumina e imunoglobulina podendo ter alguma influência durante a PDT¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

Os trabalhos de König *et al*¹⁰⁷ e Inhoffen *et al*¹⁰⁸ foram completados por Ma *et al*¹¹¹ através da investigação do efeito fotodinâmico do fotoproduto de degradação da PpIX em células WiDr, uma linhagem de células de adenocarcinoma humano. As células foram incubadas com ALA e irradiadas em 635 nm durante 1, 3 ou 5 minutos para a formação de diferentes quantidades do fotoproduto clorina fotoprotoporfirina (Ppp). A Ppp foi então irradiada (670 nm) e observou-se que esta também sofria fotobranqueamento, mas esse fotobranqueamento não resultava na formação de PpIX, indicando que o processo de fotobranqueamento da protoporfirina IX não é reversível. Independente do tempo, a exposição das células tratadas com ALA à luz em 635 nm seguida da exposição em 670 nm apresentou pequeno aumento na inativação das membranas celulares, indicando que

a utilização conjunta da PpIX e do seu fotoproduto Ppp não implicava num ganho significativo na eficiência do tratamento¹¹¹.

Através da comparação entre a Figura 26B e a Figura 24A e entre a Figura 26C e a Figura 24C notamos a variação da susceptibilidade da MgPpIX e da ZnPpIX ao fotobranqueamento. No caso da MgPpIX, na solução contendo Tampão Fosfato pH 7,2 /T20 1,0% (v/v) (Figura 24A) verificamos que a diminuição da intensidade de fluorescência durante a irradiação é menor do que na solução contendo PBS pH 7,4 /T20 0,045% (v/v) (Figura 26B). Para a ZnPpIX a diferença é ainda maior: Em em solução contendo Tampão Fosfato pH 7,2 /T20 1,0% (v/v)(Figura 24C) foi observado um aumento da fluorescência da ZnPpIX em 645 nm nos primeiros minutos de fluorescência que se mostrou constante com o passar do tempo enquanto em solução contendo PBS pH 7,4/T20 0,045% (v/v) (Figura 26C). Além disso, independente da concentração de surfactante no meio e diferente do que aconteceu com a PpIX, não foi observado nenhuma alteração nos perfis de emissão da ZnPpIX e da MgPpIX no decorrer da irradiação, indicando que durante a irradiação de MgPpIX e ZnPpIX não é formado nenhum fotoproduto fluorescente.

Apesar do fotobranqueamento do fotossensibilizadores não houve prejuízo na análise uma vez que a hemólise foi observada. No caso da MgPpIX, o aumento da velocidade de fotobranqueamento pode estar relacionado à porcentagem máxima de hemólise alcançada ao fim do experimento. É possível que não esteja ocorrendo uma maior lise das células vermelhas devido à destruição do fotossensibilizador.

5 CONCLUSÃO

A PDT tem sido empregada com sucesso no tratamento de vários tipos de câncer (câncer de pele, da cavidade oral, bronquial e esofageal, de bexiga, cabeça e pescoço) além de doenças não malignas, tendo mostrado bons resultados, tanto no tratamento efetivo de cânceres em estágio inicial, quanto no tratamento paliativo de cânceres em estágio avançado.

Existe uma preocupação constante em encontrar o sensibilizador que ofereça o melhor custo/benefício, isto é, maior seletividade por células tumorais, mínima toxicidade no escuro, melhor eficiência em causar a morte celular, maior pureza, menor custo de produção, etc. Muitos são os ramos envolvidos nessa procura quase utópica pelo sensibilizador ideal: Química, Biologia, Medicina, Física, Engenharia, todos trabalhamos juntos para que novos sensibilizadores sejam descobertos, sintetizados e estudados, novas fontes de irradiação (cada vez menores e mais precisas) sejam testadas e fabricadas, novos métodos e meios de aplicação de fotossensibilizadores sejam avaliados, novas utilizações para PDT no tratamento de doenças sejam analisadas.

No entanto, apesar de todo esse esforço em conjunto e de um grande número de sensibilizadores estarem sob estudos, somente poucos são, atualmente, aprovados para uso (Photofrin[®], Levulan[®] e Visudyne[®]). As pesquisas de novos medicamentos costumam ser morosas e dispendiosas, no entanto, isso se faz necessário quando vidas humanas estão sendo envolvidas no processo. A aprovação de um medicamento para uso deve passar pelos seguintes estágios: avaliação *in vitro* da eficiência do medicamento, avaliação *in vivo* (animais) e avaliação *in vivo* (voluntários humanos).

O que foi apresentado nesse projeto é somente uma parte do caminho para a aprovação de um medicamento: a avaliação *in vitro* inicial da eficiência da ZnPpIX e da MgPpIX. A partir da comparação da eficiência fotodinâmica da Protoporfirina IX e de seus derivados de Magnésio e de Zinco foi possível chegar às seguintes conclusões:

- × Durante as análises da eficiência dos fotossensibilizadores verificou-se que esta seguia, na maioria dos casos, a seguinte série: PpIX \approx ZnPpIX > MgPpIX, resultado que se mostra condizente com os valores de rendimento quântico (dados da literatura) de cada protoporfirina.

- × A razão entre a eficiência da PpIX e MgPpIX depende do substrato analisado. Verificou-se que, à medida que se aumenta a complexidade do substrato (aminoácido livre, proteína e célula) diminui-se a relação PpIX/MgPpIX. A relação PpIX/ZnPpIX mantém-se constante.
- × Os ensaios de hemólise por irradiação contínua e por pós-irradiação mostraram que em concentrações iguais de fotossensibilizador PpIX e ZnPpIX são mais eficientes que MgPpIX, no entanto a concentração de MgPpIX pode ser aumentada para que se alcance a mesma eficiência que os outros dois sensibilizadores.
- × A MgPpIX foi o único dentre os três fotossensibilizadores estudados a sofrer um fotobranqueamento significativo durante a irradiação. Sendo assim, seria possível controlar a velocidade de fotodegradação do sensibilizador de modo a manter a capacidade de fotoxidação de biomoléculas enquanto for conveniente e depois degradar totalmente o sensibilizador somente com o aumento da velocidade de fotobranqueamento. Essa característica é muito importante do ponto de vista clínico pois diminui a fotossensibilidade pós-tratamento, típica em PDT.

Apesar da MgPpIX não ter apresentado uma boa eficácia no caso do aminoácido, deve-se levar em consideração que a aplicação *in vivo* de um sensibilizador envolve inúmeros parâmetros, tais como: estruturas complexas, meios de aplicação, distribuição tópica ou sistêmica do fotossensibilizador, efeitos pós-irradiação, efeitos colaterais, etc., que devem ser cuidadosamente avaliados e podem ser modificados até a obtenção do melhor resultado. Sendo assim, não só a ZnPpIX (pelas características que apresentou durante esse estudo), mas também a MgPpIX podem ser consideradas como possíveis alvos de estudo visando a aplicação clínica em PDT.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Schuitmaker, J. J.; Baas, P.; Van Leengoed, H. L. L. M.; Van der Meulen, F. W.; Star, W. M.; Van Zandwijk, N. (1996) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **34**, 3-12.
- ² Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. (2001) *Photochemistry and Photobiology*, **74**, 656-669.
- ³ Raab, O. (1900) *Zeitschrift fur Biologie*, **39**; 524-546.
- ⁴ Prime, J.; *Les Accidents Toxiques par l'eosinate de sodium*, Jouve and Boyer, Paris, (1900).
- ⁵ Von Tappeiner, H. (1903) *Muenchener Medizinische Wochenschrift*, **47**, 2042-2044.
- ⁶ Machado, A. E. H. (2000) *Química Nova*, **23**, 237-243.
- ⁷ Lipson, R.L.; Baldes, J. (1960) *Archives of Dermatology*, **82**, 508-516.
- ⁸ Dougherty, T.J.; Grinday, G.B.; Fiel, R. Weishaupt, K. R.; Boyle, D.G. (1975) *Journal of the National Cancer Institute*, **55**, 115-121.
- ⁹ Dougherty, T.J. (1993) *Photochemistry and Photobiology*, **58**, 895-900.
- ¹⁰ Dougherty, T.J. (1974) *Journal of the National Cancer Institute*, **51**, 1333-1336.
- ¹¹ Dougherty, T.J.; Boyle, D.G.; Weishaupt, K.; Gomer, C.; Borcicky, D.; Kaufman, J.H.; Grindey, G.; In *Research in Photobiology (Edited by Castellani, A.)*, Plenum Publish Corporate, New York, (1977), 435-466.
- ¹² Dougherty, T.J.; Lawrence, G.; Kaufman, J.H.; Boyle, D.G.; Weishaupt, K; Goldfarb, A. (1979) *Journal of the National Cancer Institute*, **62**, 231-237.
- ¹³ Ball, D.J.; Wood, S.R.; Vernon, D.I.; Griffiths, J.; Dubbelman, T.M.A.R.; Brown, S.B. (1998) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **45**, 28-35.
- ¹⁴ Howe, L.; Zhang, J.Z. (1998) *Photochemistry and Photobiology*, **67**, 90-96.
- ¹⁵ Kudrevich, S.; Brasseur, N.; La Madeleine, C.; Gilbert, S.; van Lier, J.E. (1997) *Journal of Medicinal Chemistry*, **40**, 3897-3904.
- ¹⁶ Levy, J.G. (1995) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **30**, 79-82.
- ¹⁷ Bonnet, R. (1995) *Chemical Society Reviews*, **24**, 19-33.
- ¹⁸ Brasseur, N.; Ali, H.; Langlois, R.; Wagner, J.R.; Rosseau, J.; van Lier, J.E. (1985) *Photochemistry and Photobiology*, **45**, 581-586.
- ¹⁹ Tanielian, C.; Mechin, R.; Seghrouchni, R.; Schweitzer, C. (2000) *Photochemistry and Photobiology*, **71**, 12-19.
- ²⁰ Smith, G. J. (1978) *Journal of the Chemical Society Faraday Transaction II*, **74**, 1350-1354.
- ²¹ Ochsner, M. (1997) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **39**, 1-18.
- ²² Spikes, J.D.; van Lier, J.E., Bommer, B.C. (1995) *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **91**, 193-198.
- ²³ Ryter, S. W.; Tyrrel, R. M. (2000) *Free Radical Biology & Medicine*; **28**; 289-309.

- ²⁴ Ciba Foundation Symposium 146; *Photosensitizing Compounds: Their chemistry, biology and clinical use*. John Wiley & Sons; Chichester; (1989); 4-10, 17-24.
- ²⁵ Brancaleon, L.; Moseley, H. (2002) *Lasers in Medical Science*; **17**, 173-186.
- ²⁶ MacDonald, I. J., Dougherty, T. J. (2001) *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*; **5**, 105-129.
- ²⁷ Aveline, B.M.; Hassan, T.; Redmond, R.W. (1995) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*; **30**; 161-169.
- ²⁸ Kessel, D.; Byrne, C.J.; Ward, A.D. (1992) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*; **13**; 153-160.
- ²⁹ Griffiths, J.; Cruse-Sawyer, J.; Wood, S.R.; Schofield, J.; Brown, S.B.; Dixon, B. (1994) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **24**, 195-199.
- ³⁰ Darwent, J.R.; Douglas, P.; Harriman, A.; Porter, G.; Richoux, M.C. (1982) *Coordination Chemistry Reviews*, **44**, 83-126.
- ³¹ Margalit, R.; Shaklai, N.; Cohen, S. (1983) *Journal of Biochemistry*, **209**, 547-552.
- ³² Margalit, R.; Cohen, S. (1983) *Biochimica et Biophysica Acta*, **736**, 163-170.
- ³³ Margalit, R.; Rotenberg, M. (1984) *Journal of Biochemistry*, **219**, 445-450.
- ³⁴ Gantchev, T.G.; Ouellet, R.; van Lier, J.E. (1999) *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **366**, 21-30.
- ³⁵ Foley, M.S.C.; Beeby, A.; Parker, A.W.; Bishop, S.M.; Phillips, D. (1997) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **38**, 10-17.
- ³⁶ Miskovsky, P.; Hritz, J.; Sanchez-Cortes, S.; fabriciova, G.; Ulicny, J.; Chinsky (2001) *Photochemistry and Photobiology*, **74**, 172-183.
- ³⁷ Grdadolnik, J. (2002) *The Internet Journal of Vibrational Spectroscopy*, [www.ijvs.com], **6**, 6.
- ³⁸ Timmins, G.S.; Davies, M.J. (1993) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **21**, 167-173
- ³⁹ Robertson, D. G.; Bailey, D. L.; Martin, R. A. (1991) *Photochemistry and Photobiology*, **53**, 455-461.
- ⁴⁰ Falk, J. E.; *Porphyrins and Metalloporphyrins: Their general, physical and coordination chemistry, and laboratory methods*; Volume 2 , 1ª Edição, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, (1964), 3-94.
- ⁴¹ Daziano, J.P.; Steenken, S.; Chabannon, C.; Mannoni, P.; Chanon, M.; Julliard, M. (1996) *Photochemistry and Photobiology*, **64**, 712-719.
- ⁴² Sheyhedin, I.; Aizawa, K.; Araake, M.; Kumasaka, H.; Okunaka, T.; Kato, H. (1998) *Photochemistry and Photobiology*, **68**, 110-114.
- ⁴³ Bourre, L.; Thibaut, S.; Fimiani, M.; Ferrand, Y.; Simonneaux, G.; Patrice, T. (2003) *Pharmacological Research*, **47**, 253-261.
- ⁴⁴ Nishiyama, N.; Stapert, H.R.; Zhang, G.D.; Takasu, D.; Jiang, D.L.; Nagano, T.; Aida, T.; Kataoka, K. (2003) *Bioconjugate Chemistry*, **14**, 58-66.

- ⁴⁵ Krammer, B.; Überriegler, K. (1996) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **36**, 121-126.
- ⁴⁷ Fuchs, J.; Weber, S.; Kaufmann, R. (2000) *Free Radical Biology & Medicine*, **28**, 537-548.
- ⁴⁸ Kurolkovas, A.; Burckhalter, J.H.; *Química Farmacêutica*; Editora Guanabara Koogan S.A.; Rio de Janeiro; (1988); p. 70-71.
- ⁴⁹ Cappugi, P.; Campolmi, P.; Mavilia, L.; Prignano, F.; Rossi, R. (2001) *Journal of Chemotherapy*, **13**, 494-502.
- ⁵⁰ Taylor, E.L.; Brown, S.B. (2002) *Journal of Dermatological Treatment*, **13**, S3-S11.
- ⁵¹ <http://www.sante.univ-nantes.fr/med/laser/sensitizers.html>
- ⁵² Ibbotson, S.H. (2002) *British Journal of Dermatology*, **146**, 178-188.
- ⁵³ Morton, C.A.; Brown, S.B.; Collins, S.; Ibbotson, S.; Jenkinson, H.; Kurwa, H.; LangMack, K.; McKenna, K.; Moseley, H.; Pearse, A.D.; Stringer, M.; Taylor, D.K.; Wong, G.; Rhodes, L.E. (2002) *British Journal of Dermatology*, **146**, 552-567.
- ⁵⁴ Madsen, S.J.; Sun, C.H.; Tromberg, B.J.; Yeh, A.T.; Sanchez, R.; Hirschberg, H. (2002) *Photochemistry and Photobiology*, **76**, 411-416.
- ⁵⁵ Madsen, S.J.; Sun, C.H.; Tromberg, B.J.; Hirschberg, H. (2003) *Journal of Neuro-Oncology*, **62**, 243-250.
- ⁵⁶ Schaffer, M.; Schaffer, P.M.; Jori, G.; Corti, L.; Sotti, G.; Hofstetter, A.; Duhmke, E. (2002) *Tumori*, **88**, 407-410.
- ⁵⁷ Sporri, S.; Chopra, V.; Egger, N.; Hawkins, H.K.; Motamedi, M.; Dreher, E.; Schneider, H. (2001) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **64**, 8-20.
- ⁵⁸ Bisson, J.F.; Christophe, M.; Padilla-Ybarra, J.J.; Notter, D.; Vigneron, C.; Guillemin, F. (2002) *Anti-cancer Drugs*, **13**, 851-857.
- ⁵⁹ Wolfsen, H.C. (2000) *Endoscopy*, **32**, 715-719.
- ⁶⁰ Hinnen, P.; de Rooij, F.W.M.; Hop, W.C.J.; Edixhoven, A.; van Dekken, H.; Wilson, J.H.P.; Siersema, P.D. (2002) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **68**, 8-14.
- ⁶¹ Hinnen, P.; Siersema, P.D.; Edixhoven, A.; Wilson, J.H.P.; de Rooij, F.W.M. (2002) *Cellular and Molecular Biology*, **48**, 903-909.
- ⁶² Barnett, A.A.; Haller, J.C.; Cairnduff, F.; Lane, G.; Brown, S.B.; Roberts, D.J.H. (2003) *International Journal of Cancer*, **103**, 829-832.
- ⁶³ Kirdaite, G.; Lange, N.; Busso, N.; van der Bergh, H.; Kueera, P.; So, A. (2002) *Arthritis and Rheumatism*, **46**, 2002.
- ⁶⁴ Szeimies, R.M.; Landthaler, M.; Karrer, S. (2002) *Journal of Dermatological Treatment*, **13**, S13-S18.
- ⁶⁵ Ruiz-Rodriguez, R.; Sanz-Sanchez, T.; Cordoba, S. (2002) *Dermatologic Surgery*, **28**, 742-744.

- ⁶⁶ Kelty, C.J.; Brown, N.J.; Reed, M.W.R.; Ackroyd, R. (2002) *Photochemical & Photobiological Sciences*; **1**; 158-168.
- ⁶⁷ Friesen, S.A.; Hjortland, G.º; Madsen, S.J.; Hirschberg, H.; Engebraten, º; Nesland, J.M.; Peng, Q (2002) *International Journal of Oncology*; **21**; 577-582.
- ⁶⁸ Theodossiou, T.; MacRobert, A. (2002) *Photochemistry and Photobiology*, **76**, 530-537.
- ⁶⁹ Brunner, H.; Hausmann, F.; Krieg, R.C.; Endlicher, E.; Scholmerich, J.; Knuechel, R.; Messmann, H. (2001) *Photochemistry and Photobiology*, **74**, 721-725.
- ⁷⁰ Juzeniene, A.; Juzenas, P.; Kaalhus, O.; Iani, V.; Moan, J. (2002) *Photochemistry and Photobiology*, **76**, 452-456.
- ⁷¹ Moan, J.; Ma, L.W.; Juzeniene, A.; Iani, V.; Juzenas, P.; Apricena, F.; Peng, Q. (2003) *International Journal of Cancer*, **103**, 132-135.
- ⁷² Perotti, C.; Casas, A.; Fukuda, H.; Sacca, P.; Batle, A (2003) *British Journal of Cancer*, **88**, 432-437.
- ⁷³ Sylvain, I.; Zerrouki, R.; Granet, R.; Huang, Y.M.; Iagorce, J.F.; Guilloton, M.; Blais, J.C.; Krausz, P. (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **10**, 57-69.
- ⁷⁴ Labbé, R. F.; Vreman, H.J.; Stevenson, D. K. (1999) *Clinical Chemistry*, **45**, 2060-2072.
- ⁷⁵ Zhao, Y. J.; Yang, G. Y.; Domino, E. F. (1996) *Stroke*, **27**, 2299-3003.
- ⁷⁶ Karger, G. A.; Reid, J. D.; Hunter, C. N. (2001) *Biochemistry*, **40**, 9291-9299.
- ⁷⁷ Papenbrock, J.; Mock, H. P.; Tanaka, R.; Kruse, E.; Grimm, B. (2000) *Plant Physiology*, **122**, 1161-1169.
- ⁷⁸ Petersen, B. L.; Kannangara, C. G.; Henningsen, K. W. (1999) *Archives of Microbiology*, **171**, 146-150.
- ⁷⁹ Petersen, B. L.; Moller, M. G.; Stummann, B.M.; Henningsen, K. W. (1998) *Hereditas*, **129**, 131-142.
- ⁸⁰ Popperl, G.; Oster, U.; Rudiger, W. (1998) *Journal of Plant Physiology*, **153**, 40-45.
- ⁸¹ Sconfienza, C.; Van de Vorst, A.; Jori, G. (1980) *Photochemistry and Photobiology*, **31**, 351-357.
- ⁸² Girotti, A. W. (1976) *Biochemical and Biophysical Research Communications*; **72**; 1367-1374.
- ⁸³ Atkins, P.W.; *Physical Chemistry*; 5th edition; Oxford University Press; New York; (1995); 218, 545.
- ⁸⁴ Atkins, P.W.; *Físico-Química*; Volume III; 6ª edição; Editora LTC; Rio de Janeiro; (1999); 36-37.
- ⁸⁵ Barros Neto, B. Scarminio, I.S.; Bruns, R. E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*, 2ª edição, Editora da Unicamp, Campinas; (1995); 32-34.
- ⁸⁶ Squires, G.L.; *Practical Physics*, 1ª edição, Macmillan Publishing Company, New York; (1968); 398-401.
- ⁸⁷ Neugebauer, J.; *A guide to the properties and uses of detergents in Biology and Biochemistry*, 5th Edition; Calbiochem-Novabiochem Corporation; San Diego; (1994).

- ⁸⁸ Gorman, A. A.; Lovering, G.; Rodgers, M. A. J. (1976) *Photochemistry and Photobiology*, **23**, 399-403.
- ⁸⁹ Miyoshi, N.; Tomita, G. (1979) *Photochemistry and Photobiology* **29**, 527-530.
- ⁹⁰ Sheldon, R. A., *Metalloporphyrins in Catalytic Oxidations*; 1ª Edição, Marcel Dekker, Inc., New York, (1994), 196-200.
- ⁹¹ Scolaro, L. M.; Castriciano, M.; Romeo, A.; Patanè, S.; Cefalì, E.; Allegrini, M. (2002) *Journal of Physical Chemistry B*; **106**; 2453-2459.
- ⁹² Kessel, D.; Byrne, C.J.; Ward, A.D. (1992) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*; **13**; 153-160.
- ⁹³ Mayhew, E.; Vaughan, L.A.; Panus, A. (1993) *Photochemistry and Photobiology*, **58**; 845-851.
- ⁹⁴ Woodburn, K.; Chang, C.K.; Sangan, L. (1994) *Photochemistry and Photobiology*; **60**; 154-159.
- ⁹⁵ Neto, B. B.; Scarmino, I. S.; Bruns, R. E.; *Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*; 1ª edição; Editora da UNICAMP; Campinas; (2001); p.56 e 397.
- ⁹⁶ Silvester, J. A.; Timmins, G. S.; Davies, M. J. (1998) *Free Radical Biology & Medicine*; **24**; 754-766.
- ⁹⁷ Straight, R. C.; Spikes, J. D.; Photosensitized oxidation of biomolecules; in Frimer A. A. (Ed.); *Singlet Oxygen: Polymers and Biomolecules*; Volume IV; 1ª edição; CRC Press; Boca Raton; (1985);91-143.
- ⁹⁸ Galembeck, E.; Alonso, A.; Meirelles, N. M. (1998) *Chemico-Biological Interactions*, **113**, 91-103.
- ⁹⁹ Chignell, C. F.; Sik, R. H. (1995) *Photochemistry and Photobiology*, **62**, 205-207.
- ¹⁰⁰ Zavodnik, I.B.; Zavodnik, L.B.; Bryszewska, M.J. (2002) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*; **67**, 1-10.
- ¹⁰¹ Dubbelman, T. M. A. R.; de Goeij, A. F. P. M.; van Steveninck, J. (1978) *Photochemistry and Photobiology*; **28**; 197-204.
- ¹⁰² Girotti, A. (1979) *Biochemistry*; **18**; 4403-4411.
- ¹⁰³ Bissonnette, R.; Zeng, H.; McLean, D. I.; Korbelik, M.; Lui, H. (2001) *Photochemistry and Photobiology*, **74**, 339-345.
- ¹⁰⁴ de Blois, A.W.; Thissen, M.R.T.M.; de Bruijn, H. S.; Grouls, R. J. E.; Dutrieux, R. P.; Robinson, D. J.; Neumann, H. A. M. (2001) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*; **61**, 21-29.
- ¹⁰⁵ Zavodnik, I.B.; Zavodnik, L.B.; Krajewska, H.; Romanowicz-Makowska, M.; Bryszewska, M. (1998) *Current Topics in Biophysics*, **B**, 230-237.
- ¹⁰⁶ Rotomskiene, J.; Kapociute, R.; Rotomskis, R.; Jonusauskas, G.; Szito, T.; Nizhnik, A. (1988) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2**, 373-379.
- ¹⁰⁷ König, K.; Schneckenburger, H.; Rück, A.; Steiner, R. (1993) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*; **18**, 287-290.

- ¹⁰⁸ Inhoffen, H. H.; Brockmann, H.; Bliesener, K. M. (1969) *Liebigs Annalen der Chemie*, **730**, 173-185.
- ¹⁰⁹ Ericson, M.B.; Graperginesser, S.; Gudmundson, F.; Wennberg, A.M.; Larko, O.; Moan, J.; Rosen A. (2003) *Lasers in Medical Science*; **18**, 52-62.
- ¹¹⁰ Brancalion, L.; Moseley, H. (2002) *Biophysical Chemistry*; **96**, 77-87.
- ¹¹¹ Ma, L.W.; Bagdonas, s.; Moan, J. (2001) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*; **60**; 108-113.