BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

20643

ITO DE QUÍMICA
DADE DE SÃO PAULO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**INTERAÇÕES DE LIPOSSOMOS COM A
TETRAFENILPORFIRINA (TPP) E UM DERIVADO
BENZOPORFIRÍNICO MONOÁCIDO (BPD):
POSSÍVEIS APLICAÇÕES EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

SÔNIA REGINA DA SILVA MENDES

Dissertação de Mestrado

Orientadora:
Profa. Dra. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA

São Paulo - 2003

**“Interações de lipossomos com a
tetrafenilporfirina (TPP) e um derivado
benzoporfirínico monoácido (BPD):
possíveis aplicações em terapia
fotodinâmica”**

SÔNIA REGINA DA SILVA MENDES

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Química - Área: Química Inorgânica.

Aprovada por:

Profa. Dra. ANA MARIA DA COSTA FERREIRA
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. MAURÍCIO DA SILVA BAPTISTA
IQ – USP

Profa. Dra. MARIA CRISTINA DE ALMEIDA RIBEIRO
Faculdade de Americana

SÃO PAULO
10 DE OUTUBRO 2003.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

T
546.3
m538v

**Ao “Querido DJALMA”, meu Eterno Companheiro!!!
Por todo Amor, Força, Fé, Coragem, Atenção, Dedicação, Entusiasmo,
Compreensão, Incentivo, Apoio, Alegria e Valorosa Ajuda em mais esta
Jornada.**

“NAMU DAISHI HENSHÔ KONGÔ”.

**Agradeço a DEUS, a todos os BUDAS, TATHĀGATAS, BODHISATTVAS,
VAJRAS e ANTEPASSADOS, pela Proteção, Orientação e Bênçãos
Alcançadas.**

**Há uma coisa
mais forte do que todos
os exércitos do mundo,
e isso é uma Idéia
cujo tempo chegou.**

Victor Hugo

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, pela orientação competente e primorosa.

A Profa. Dra. Ana Maria Carmona-Ribeiro, pela valorosa co-orientação, e disponibilidade do Laboratório de Biocolóides, no qual foi realizado a primeira parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Koiti Araki, pela oportunidade, e pela excelente co-orientação, e disponibilidade do Laboratório de Química e Nanotecnologia Supramolecular, no qual foi realizada a segunda parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Henrique Eisi Toma, pela oportunidade, por sua valorosa contribuição à ciência, e por fazer despertar nas pessoas o melhor de seu intelecto.

Aos Profs. Drs. Mauricio S. Baptista e Luiz H. Catalani pelo acesso ao Sistema de Fotólise por Pulso a Laser.

Ao Prof. Dr. Maurício S. Baptista, pelas valiosas sugestões, explicações, pela presteza e boa vontade.

Ao Prof. Dr. Manoel Troyano pelo uso da centrífuga do seu laboratório.

Aos Professores que ministraram os cursos de pós-graduação, pelos ensinamentos e evolução profissional.

Aos companheiros de estudo, Antonio Brant, Divinomar Severino, Fabio M. Engelmann, Genebaldo S. Nunes e Marcos M. Toyama, pela ótima colaboração no desenvolvimento dos trabalhos, pelo agradável convívio, pela presteza e ajuda sempre que solicitada.

Ao colega Rodrigo Luiz Oliveira Rodrigues Cuala, pelo DMSO anidro.

Aos colegas de estudo Ana Flávia Nogueira, Anamaria D. P. Alexiou, André Luiz B. Formiga, Débora B. Vieira, Edla M. A. Pereira, Felipe Correia, Herbert Winnischofer, Ildemar Mayer, Irene S. Kikuchi, Izilda A. Bagatin, Jéferson A. Naue, Luiz Carlos Salay, Luiz Fernando Pacheco, Marcio Y. Matsumoto, Marcos Damasceno, Maria Amélia de Almeida, Myriam Therezinha N. Campanha, Sergio H. Toma, Sergio P. Moura, Sofia Nikolaou, Vésper Y. Otake, Vitor Hugo S. de Melo, Wagner R. de Souza, pelo agradável convívio proporcionado, boa vontade e ajuda sempre que solicitada.

À Alzilene S. P. Rocha, Ivone Teresa de Oliveira Santos e Maria Aparecida P. Lopes, pela amizade, apoio e agradável convivência.

Às minhas queridas tias Maria J. V. dos Santos e Tereza V. da Silva e aos meus queridos tios José Jorge R. Atanes e Marli Atanes, pelo amor, fé, incentivo e valorosa ajuda.

Aos amigos e companheiros do Koyasan Shingonshu Kongoji, Tomio Aoki†, Daizo Komada, Shoji Hayashi, e Itsuko Hayashi, pela amizade, fé, incentivo, e valorosa ajuda.

Às minhas queridas amigas Claudia A. Kodaira, Maria Cecília A. L. Barto, Maria Luiza Mion Giannico, Rosa Maria de Camargo e Sônia Maria de Souza, pela força, fé, motivação, ajuda e boa vontade sempre presentes.

Aos meus alunos e alunas, pela colaboração, incentivo e apoio.

A todos os funcionários da secretaria de pós-graduação, e também a todos os funcionários do Instituto de Química pelos esclarecimentos, presteza e boa vontade.

Ao Instituto de Química da USP pelo apoio e acolhida.

E, também a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

1- Introdução	1
1.1 - Lipossomos	1
1.2 – Terapia Fotodinâmica (TFD)	7
1.2.1 - Oxigênio Singleto	9
1.2.2 - Histórico	12
1.2.3 – Tratamento Clínico de Tumores	13
1.2.4 – Veículos Fototerapêuticos	14
1.2.5 - Medicamentos para TFD	16
1.2.5.1 - Medicamentos Aprovados	17
1.2.5.2 - Medicamentos sob Avaliação	18
2 - Objetivos	19
3 – Materiais e Métodos	20
3.1 – Materiais	20
3.1.1 –Reagentes	20
3.1.2 –Equipamentos	20
3.2 - Métodos	21
3.2.1 - Preparação das vesículas de DODAB	21
3.2.1.2 -Por aquecimento – método do SNIPPE	21
3.2.1.3 – Por Sonicação	21
3.2.2 – Preparação de Lipossomos Aniônicos de Asolecitina (ASO)	21
3.2.3 – Preparação da Benzoporfirina Monoácida (BPD)	21
3.2.4 - Preparação da meso-Tetrafenilporfirina (TPP)	22
3.2.5 – Preparação do Rubreno (RB)	22
3.2.6 - Análise das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – Método TBARS	22
3.2.7 - Determinação Espectrofotométrica de Grupos Carbonil	23
3.2.8 – Determinação de Rendimento Quântico de Oxigênio Singleto	24
3.2.9 – Formação de Oxigênio Singleto em Lipossomo através de um Supressor de Oxigênio Singleto	25
4 – Resultados e Discussão	26
4.1 – Solubilização e Estabilização da BPD e TPP	26
4.1.1. Experimentos Espectrofotométricos	26
4.1.2. Experimentos de Emissão de Fluorescência	37
4.2.1 - Determinação de Espécies Reativas ao TBA	40
4.2.2 - Determinação de Grupos Carbonil Formados nos Lipossomos	43
4.3 Estudo de Formação de $^1\text{O}_2$ em Lipossomos	47
4.3.1 Verificação da Geração de Oxigênio Singleto por Fotólise de Pulso a Laser (Fotólise Relâmpago)	47
4.3.2 Verificação da Geração de Oxigênio Singleto Utilizando um supressor de Oxigênio Singleto	51
5. Conclusões e Comentários Finais	56
6. Referências Bibliográficas	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Principais bandas e respectivos coeficientes de absortividade molar da BPD em DMSO e nas micelas de DODAB e ASO	31
Tabela 2 - Principais bandas e respectivos coeficientes de absortividade molar da TPP em DMSO e nas micelas de DODAB e ASO	36
Tabela 3 - Danos Oxidativos a lipossomos ASO contendo concentrações crescentes de TPP, após tratamento térmico e fotoquímico.	41
Tabela 4 - Danos Oxidativos a lipossomos ASO contendo concentrações crescentes de BPD, após tratamento térmico e fotoquímico.	42
TABELA 5 - Formação de Grupos Carbonil através de Danos Oxidativos a lipossomos ASO.	44
TABELA 6 - Formação de Carbonil através de Danos Oxidativos na Asolecitina.	45
Tabela 7: Valores de ϕ_{Δ} para TPP em Solventes e no Lipossomo.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- BPD (Benzoporfirina Monoácida)	xiii
Figura 2- TPP (meso-tetrafenilporfirina)	xiii
Figura 3- DODAB (brometo de dioctadecildimetilamônio)	xiv
Figura 4- Asolecitina	xiv
Figura 5- Esquema Ilustrativo de uma Membrana Plasmática	2
Figura 6- Micrografia Eletrônica de um Lipossomo Unilamelar	4
Figura 7- Secção de uma Micrografia Eletrônica de um Lipossomo Multilamelar	5
Figura 8- Desenho de Vesícula (lipossomo unilamelar)	6
Figura 9: Distribuição de Energia de Orbitais Moleculares (π^*) para os Estados Eletrônicos do Oxigênio.	9
Figura 10- Diagrama de Jablonski	10
Figura 11- Tratamento Clínico de Tumores	13
(a) Tecido; (b) Tumor; (c) Laser	
Figura 12 – Espectros de Absorção de Benzoporfirina Monoácida (BPD), em dimetilsulfóxido (DMSO).	27
Figura 13 – Espectro de Absorção de Benzoporfirina Monoácida, em dispersão aquosa de vesículas catiônicas sintéticas pequenas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).	28
Figura 14 –Espectro de Absorção de Benzoporfirina Monoácida, em dispersão aquosa de vesículas catiônicas sintéticas grandes de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).	29
Figura 15 –Espectro de Absorção de Benzoporfirina Monoácida, em dispersão aquosa de lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO).	30
Figura 16 –Espectro de Absorção de meso-Tetrafenilporfirina (TPP) dissolvida em N,N-dimetilformamida (DMF).	32
Figura 17 – Espectro de Absorção da meso-Tetrafenilporfirina (TPP), em dispersão aquosa de vesículas catiônicas sintéticas pequenas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).	33
Figura 18 – Espectro de Absorção da meso-Tetrafenilporfirina (TPP), em dispersão aquosa de vesículas catiônicas sintéticas grandes de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).	34
Figura 19 - Espectro de Absorção da meso-Tetrafenilporfirina (TPP), em dispersão aquosa de lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO).	35
Figura 20 – Espectro de Emissão de Fluorescência de meso-Tetrafenilporfirina (TPP) dissolvida em N,N-dimetilformamida (DMF).	37
Figura 21 – Espectro de Emissão de Fluorescência de meso-Tetrafenilporfirina(TPP) incorporada em dispersão aquosa de vesículas sintéticas catiônicas sonificadas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).	37
Figura 22 – Espectro de Emissão de Fluorescência de (meso) Tetrafenilporfirina (TPP) incorporada em dispersão aquosa de vesículas sintéticas catiônicas grandes de brometo de dioctadecildimetilamônio).	38
Figura 23 – Espectro de Emissão de Fluorescência de (meso) Tetrafenilporfirina (TPP) incorporada em dispersão aquosa de lipossomos aniônicos de	38

asolecitina (ASO).	
Figura 23 – Espectro de Emissão de Fluorescência de (meso) Tetrafenilporfirina incorporada em dispersão aquosa de lipossomos aniônicos de ASO	38
Figura 24 – Danos Oxidativos a lipossomos de Asolecitina em Presença de TPP	41
Figura 25 – Danos Oxidativos a lipossomos ASO em Presença de BPD	42
Figura 26- Formação de Grupos Carbonil através de Danos Oxidativos à Asolecitina	44
Figura 27 – Formação de Grupos Carbonil através de Danos Oxidativos na Asolecitina	45
Figura 28: Gráfico dos valores de intensidade do sinal de fosforescência de oxigênio singleto gerado para TPP em BENZ, ($A_{532} = 0,2$) no modo ângulo reto.	49
Figura 29: Gráfico dos valores de intensidade do sinal de fosforescência de oxigênio singleto gerado para TPP em DMF, ($A_{532} = 0,2$) no modo ângulo reto.	49
Figura 30: Gráfico dos valores de intensidade do sinal de fosforescência de oxigênio singleto gerado para TPP em ASO, ($A_{532} = 0,2$) no modo ângulo reto.	50
Figura 31 : Estrutura do Rubreno (RB)	51
Figura 32 : Espectros eletrônicos da solução TPP (8 μ M) em DMF, contendo 0,7 μ M de RB. Dentro, a variação da absorbância em 303 nm em função do tempo de irradiação.	52
Figura 33 : Espectros eletrônicos da TPP (8 μ M) em solução aquosa contendo 1 mM de ASO e 0,7 μ M de RB. Dentro, a variação da absorbância em 303 nm em função do tempo de irradiação.	53
Figura 34 – Gráfico demonstrando o inverso da derivada versus inverso da absorbância em meio lipossomal.	54

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ASO	Asolecitina
BPD	Benzoporfirina Monoácida
DMF	N,N - Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DODAB	Brometo de Dioctadecildimetilamônio
RB	Rubreno
TPP	(meso) Tetrafenilporfirina
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Molecular no Estado Excitado Singleto
ϕ_Δ	Rendimento Quântico de Formação de Oxigênio Singleto

RESUMO

No presente trabalho foram realizados estudos para verificar a estabilização de derivados porfirínicos, através de sua incorporação em lipossomos fosfolipídicos ou sintéticos, para possível aplicação em terapia fotodinâmica. A terapia fotodinâmica ocorre através da interação de luz de comprimento de onda adequado com um fotosensibilizador (porfirina) e oxigênio, o que pode gerar espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células.

Foi avaliada a incorporação da benzoporfirina (BPD) e da *meso*-tetrafenilporfirina (TPP), em lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO) e em vesículas catiônicas sintéticas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB). Os efeitos de concentração da droga e dos lipídios, na estabilização das porfirinas também foram observados. A solubilização e a estabilidade da BPD e da TPP nas bicamadas lipossomais foram comparadas com sua solubilização e estabilidade nos seus respectivos solventes, o dimetilsulfóxido (DMSO) e a dimetilformamida (DMF), respectivamente.

Os estudos demonstraram uma boa solubilização da BPD, e ótima solubilização da TPP, incorporadas em soluções aquosas de vesículas catiônicas sintéticas de DODAB e nos lipossomos aniônicos de ASO, em toda a faixa de concentrações estudadas.

Foram ainda verificados possíveis danos aos próprios lipossomos de ASO, através da formação de derivados carbonílicos (método TBARS e método da formação de hidrazonas), em vários tempos de irradiação. Resultados após tratamento fotoquímico foram comparados a resultados análogos, após tratamento térmico. Também foi verificado se os compostos estudados são capazes de gerar oxigênio singlete, que podem danificar membranas, visando possível aplicação oftalmológica dessas porfirinas.

Os resultados obtidos mostraram que predominantemente a ação da TPP e da BPD deve ocorrer pelo mecanismo de formação de oxigênio singlete (mecanismo II). O mecanismo tipo I parece não ser ativo, já que os danos oxidativos observados através de radicais livres foram muito semelhantes tanto com tratamento fotoquímico, como térmico.

ABSTRACT

In this work, it was carried out studies in order to evaluate the estabilization of porphyrinics species by encapsulating them in liposomes or synthetics for application in photodynamic therapy (PDT). In PDT a monochromatic light at a suitable wavelenght interacts with photosensitizer (porphyrin) and oxygen yelding reactivities species which induce cells killing. It was evaluated benzoporphyrin (BPD) and tetraphenilporphyrin (TPP) incorporation in the liposomes anionics of asolecithin (ASO) and vesicles cationics synthetics of dioctadecyldimethylammonium (DODAB).

It was also noticed the drug and lipids concentration effects in the porphyrins estabilization. BPD and TPP their solubilization and estabilization in the in the liposomal bilayers were compared with the results obtained in their best solvents dimethylsulfoxide (DMSO) and dimethylformamide (DMF).

TPP was better soluble than BPD when they were encapsulated in DODAB and ASO in all concentration range that was studied.

It was characterized possible damages in the ASO by formation carbonyl groups (method TBARS and method to form hydrazones), when the samples irradiated in differents time-intervals.

The results reached after photochemical treatment were compared to similar results found after thermal treatment.

It was also evaluated if the studied compounds are able to generate singlet oxygen that can cause damages to the membranes pursuing the possible application in ophthalmology.

The results suggest that the TPP and BPD act mainly by singlet oxygen producting (mechanism type II). The type I mechanism seems not to be active, because the oxidative damages caused for free radicals were very similar by photochemical treatment or thermical treatment.

Estruturas químicas citadas no trabalho

Figura 1- BPD (Benzoporfirina Monoácida)

Figura 2- TPP (*meso*-tetrafenilporfirina)

Anfifílicos iônicos:

Figura 3- DODAB (brometo de dioctadecildimetilamônio)

Figura 4- ASOLECITINA

R_1, R_2 = Fatty Acid Residues

Na verdade é uma mistura:

Fosfolípide	Porcentagem (%)	Ácidos graxos	Porcentagem (%)
Cefalina	36,9	Ácido palmítico	17,6
Lecitina	36,5	Ácido esteárico	6,5
Cardiolipina	8,8	Ácido Oleico	12,2
Outros	17,8	Ácido Linoleico	55,5

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Lipossomos

A.D. Bangham e colaboradores, em 1965, demonstraram pela primeira vez que a difusão de cátions e ânions monovalentes em cristais líquidos de lecitina é notavelmente semelhante à difusão destes íons através de membranas biológicas [1]. A habilidade dos lipossomos (como estes cristais líquidos foram chamados posteriormente), de incorporar solutos para os quais são seletivamente permeáveis, fez do sistema um ótimo modelo para membranas celulares, iniciando uma proliferação de estudos sobre biofísica de membrana celular, estrutura e função. Esta incorporação de solutos também formou a base para o conceito de lipossomo carreador de drogas, proposto e demonstrado na década de 1970 [2].

Desde esta descrição inicial por Bangham, vários tipos de lipossomos foram caracterizados [3].

Lipossomos são simplesmente vesículas nas quais um volume aquoso é inteiramente englobado por uma membrana composta de moléculas lipídicas (normalmente fosfolipídios naturais biodegradáveis e não tóxicos como fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol), que são formadas espontaneamente quando estes lipídios são dispersos em meio aquoso. O tamanho de lipossomos ou vesículas pode variar de dezenas de nanômetros a dezenas de microns de diâmetro [4, 5].

A importância dos lipossomos como sistemas de modelo de membrana é derivada do fato que os lipossomos podem ser preparados com constituintes naturais, de modo que a membrana do lipossomo forme uma estrutura de bicamada que é, a princípio, idêntica à porção lipídica das membranas celulares [6].

Alternativamente, lipossomos podem ser constituídos de componentes inteiramente artificiais, escolhidos para a melhoria de suas propriedades químicas [5]. A ocorrência de fosfolipídios como componentes essenciais de membranas é atribuída à habilidade destes formarem espontaneamente bicamadas, quando dispersos em água. Esta propriedade de auto-organização como bicamada, em solução aquosa, é consequência da estrutura anfíplica dos fosfolipídios [7]. Na Figura 5 é mostrado um esquema ilustrativo de uma membrana plasmática, destacando a bicamada fosfolipídica.

Figura 5— Esquema ilustrativo de uma membrana plasmática. A bicamada fosfolipídica, a estrutura básica de todas as membranas celulares, consiste de duas camadas de moléculas de fosfolipídios, onde as cadeias de ácidos graxos formam o interior hidrofóbico da bicamada, e as cabeças polares, a parte exterior hidrofílica. (Figura extraída do livro Damell, et al., 1995, p. 596).

Os fosfolipídios são lipídios que contêm fosfato em sua molécula, além de ácidos graxos e um álcool. São derivados do glicerol (fosfoglicerolipídios) ou da esfingosina (fosfoesfingolipídios) que também contêm fosfato na sua estrutura.

Fatores químicos e físicos como: componentes estruturais, transição de fase, inclinação das cadeias, conformação, empacotamento dos lipídios, permeabilidade da membrana, tamanho e número de vesículas, influenciam o comportamento e utilização dos lipossomos.

As membranas dos lipossomos são semipermeáveis e a difusão de moléculas e íons através das membranas varia consideravelmente. Para moléculas com alta solubilidade em meio orgânico e aquoso, uma membrana fosfolipídica constitui uma barreira muito tênue; por outro lado, solutos polares tais como glicose e compostos de pesos moleculares mais altos, passam através da membrana muito vagarosamente. Moléculas menores com carga neutra (como água e uréia) podem difundir-se rapidamente, enquanto íons carregados diferem muito em seu comportamento. Prótons e íons hidroxil atravessam a membrana rapidamente. Íons sódio e potássio atravessam vagarosamente, não somente em relação aos prótons, mas também em relação a ânions, como cloreto e nitrito.

A permeabilidade para cálcio e outros íons multivalentes é menor do que para íons monovalentes como sódio, tanto maior quanto o seu número de carga e diâmetro da camada de hidratação [8].

Além dos constituintes químicos das membranas, que determinam propriedades tais como fluidez, densidade de carga e permeabilidade, os lipossomos podem ser caracterizados pelo seu tamanho e forma [9].

Os lipossomos podem se apresentar como uma simples membrana de bicamada, ou como múltiplas membranas lamelares concêntricas.

Vesículas unilamelares: são lipossomos com uma simples bicamada, envolvendo uma fase aquosa.

Vesículas unilamelares pequenas: são lipossomos com menor tamanho possível para as vesículas fosfolípídicas (tamanho mínimo: 20-25 nm). O limite mínimo varia de acordo com a força iônica do meio aquoso e a composição lipídica da membrana. Como (de acordo com sua definição) estes lipossomos estão fechados no menor limite de tamanho, eles terão uma população relativamente homogênea em termos de tamanho [10].

Na Figura 6 é mostrada a micrografia eletrônica de um lipossomo unilamelar.

Vesículas unilamelares grandes: lipossomos unilamelares com diâmetro de 100 nm ou mais, são geralmente assim referidos, ou como vesículas unilamelares de tamanho intermediário [5]. Nos casos em que as vesículas unilamelares tenham diâmetro muito grande (como 10 μ n), podem ser chamadas de vesículas unilamelares gigantes [10].

Figura 6– Micrografia eletrônica de um lipossomo unilamelar. A parede, como o diagrama indica, consiste de uma bicamada. (Foto de Stoekenius, W., extraída do livro Voet, J.G., Biochemistry, p. 286, 1995).

As vesículas multilamelares possuem um grande compartimento lipídico que engloba as múltiplas camadas lipídicas e compartimentos aquosos (que constituem em espaços entre camadas).

Vesículas multilamelares: geralmente consistem de uma população de vesículas em uma ampla faixa de tamanho (100 – 1000 nm), com cada vesícula consistindo de cinco ou mais lamelas concêntricas. Vesículas compostas de poucas lamelas concêntricas são às vezes chamadas de lipossomos oligolamelares [5].

Vesículas multilamelares com um grande compartimento lipídico oferecem a vantagem de incorporação de drogas hidrofóbicas, enquanto vesículas unilamelares grandes, produzidas pelo método de evaporação reversa, são escolhidas para a incorporação de drogas hidrofílicas [4]. Na Figura 7 é mostrado um esquema de um lipossomo multilamelar.

Existem diversos meios de se produzir vesículas e as propriedades físicas e funcionais das mesmas variam com o método de preparação [10].

Figura 7– Secção de uma micrografia eletrônica de um lipossomo multilamelar, corado negativamente, mostrando as bicamadas lipídicas alternando com partículas aquosas. Três destas bicamadas estão aumentando esquematicamente para ilustrar a sua organização biomolecular, na qual as cabeças polares dos fosfolípidios são hidrofílicas e as cadeias acil formam as regiões hidrofóbicas. Os círculos amarelos representam drogas incorporadas nos canais aquosos. Estruturas ovais verdes representam colesterol, e as azuis, drogas solúveis na membrana, incorporadas nas moléculas de fosfolípidios (Figura extraída de Gregoriadis, 1995).

Os procedimentos para preparação de lipossomos podem ser generalizados e divididos em três estágios: primeiro, a preparação da fase aquosa e lipídica; segundo, o processamento primário envolvendo a hidratação do lipídio (hidratação de lipídios: formação de lipossomos); e terceiro, o processamento secundário, essencial em alguns casos e opcional em outros (trocas de tamanho após a formação de lipossomos). A etapa de processamento secundário pode ser usada separadamente ou, em alguns casos, combinada [10].

A preparação da fase aquosa é a etapa onde o tampão aquoso, droga, quelato, osmolaridade, força iônica, pH, e concentração do material a ser encapsulado têm de ser ajustados, em relação ao meio no qual os lipossomos serão suspensos após sua formação. Para a maioria dos métodos de solubilização, em detergente, este é adicionado à fase aquosa.

Na preparação da mistura molecular de lipídios, o material lipídico é dissolvido em um solvente orgânico adequado ou mistura, que pode ser miscível ou não com a fase aquosa, dependendo do método que será usado. Em muitos métodos, uma mistura lipídica seca é produzida pela remoção de solvente [10].

Figura 8– Desenho de vesícula (lipossomo unilamelar). (Figura extraída do livro Voet, e Voet, Biochemistry, 1995 p. 307).

Diversos métodos de preparação de lipossomos são encontrados na literatura [11], entre os quais:

Métodos de dispersão mecânica: com agitação manual, sem agitação, congelamento e secagem, hidratação de lipídios por meios físicos, microemulsificação, sonicação, extrusão por membranas, desidratação – reidratação [12], sonicação com congelamento e descongelamento, por indução de pH, aparelho de alta pressão hidráulica ou “French press” [13], fusão induzida por cálcio.

Dispersão em solventes: injeção de etanol [14], injeção de éter [15], água em fase orgânica (formação de gotinhas de água em óleo, dupla emulsão, lipossomos multivesiculares, evaporação de fase reversa, vesículas plurilamelares estáveis [16]).

Solubilização em detergentes: (sais biliares, diálise de alquil glicosídeos, partículas de vírus solubilizados em Triton X-100).

Em sistemas artificiais dispersos em solução aquosa os métodos de sonicação em banho [17]; sonicação com um tip [18]; vaporização com clorofórmio [19] foram descritos. O primeiro resulta em vesículas multilamelares; o segundo em vesículas unilamelares e/ou fragmentos de bicamada; o terceiro em vesículas unilamelares grandes.

As propriedades antibacterianas de sais de amônio quaternário de cadeia longa foram reveladas por Domagk em 1935. Os anfifílicos sintéticos, brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) ou cloreto (DODAC) são compostos de amônio quaternário que formam bicamadas fechadas e estáveis (vesículas), em solução aquosa [19, 20, 21, 22]. Estas vesículas podem ser vistas como “polications” altamente carregados.

Lipossomos catiônicos sintéticos compostos de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) podem ter múltiplos usos [23].

Biomoléculas carregadas negativamente como proteínas e nucleotídeos podem ser solubilizadas ou incorporadas nas bicamadas catiônicas e carregadas pelos lipossomos de DODAB.

A importância da retenção de drogas em lipossomos, permitindo que sejam entregues nos sítios desejados sem que haja vazamento da droga antes de atingir o local de infecção, tem sido objeto de muitos estudos [24].

1.2 - TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

Um tumor (neoplasma ou blastoma) caracteriza-se por um crescimento anormal de tecido vivo, podendo ser benigno ou maligno (o câncer). Os três tratamentos clássicos empregados contra o câncer são: a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia (remoção do tecido lesado e seus arredores), que apresentam inúmeras desvantagens, como por exemplo, a desfiguração do paciente, com prejuízos à sua auto-estima, e inúmeros efeitos colaterais (quimioterapia e radioterapia). Nestes processos há uma perspectiva de cura, muito embora não seja completamente eficaz. Dessa maneira, estão sendo desenvolvidos tratamentos alternativos, dentre os quais se destaca a Terapia Fotodinâmica (TFD).

Essa terapia ocorre através da interação de luz de comprimento de onda adequado com um fotosensibilizador (porfirina) e oxigênio, o que resulta em espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células [25]. Trata-se de uma reação que decorre da excitação eletrônica da porfirina (incorporada em lipossomos fosfolipídicos ou sintéticos para maior estabilização) pela luz, seguida de reação, a partir de seu estado excitado. Esta reação pode apresentar dois mecanismos:

Mecanismo tipo I: Transferência de elétron entre o fotosensitizador no estado tripleto excitado e componentes do sistema (lipossomos), gerando radicais e íons radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, formando produtos oxidados.

Esquema I: representando reações do tipo I (Transferência de Elétron), TPP é o sensitizador (*meso*-tetrafenilporfirina); e L é a molécula (lipossomo de asolecitina ASO) que será oxidada.

Mecanismo tipo II: Transferência de energia do fotosensitizador no estado tripleto, diretamente para o oxigênio molecular, gerando oxigênio singleto.

Esquema II: representando reações do tipo II (Transferência de Energia)

1.2.1 - Oxigênio Singlete

O oxigênio molecular possui vários estados eletrônicos. Os três principais são:

- O estado tripleto, de mais baixa energia, que é representado espectroscopicamente por $^3\Sigma_g^-$;
- Os estados singletos com as suas respectivas energias: $^1\Sigma_g^+$ (37kcal/mol) e $^1\Delta_g$ (23kcal/mol);

A molécula de oxigênio no seu estado fundamental encontra-se no estado tripleto $^3\Sigma_g^-$, conforme mostra o diagrama de energia de orbitais moleculares representado na Figura 9.

A diferença de energia entre o estado fundamental tripleto $^3\Sigma_g^-$ e o estado excitado singlete $^1\Delta_g$ para molécula de oxigênio é de aproximadamente 23kcal/mol. O estado $^1\Delta_g$ tem maior tempo de vida do que o $^1\Sigma_g^+$, e sua importância em termos de reatividade e análise também é maior.

Figura 9: Distribuição de energia de orbitais moleculares (π^*) para os estados eletrônicos do oxigênio.

Estado	Orbital Molecular π^*	Energia (kcal/mol)
$^1\Sigma_g^+$	$[\uparrow] \pi_x^* \quad [\downarrow] \pi_y^*$	37,5
$^1\Delta_{g_x}$	$[\uparrow \downarrow] \pi_x^* \quad [] \pi_y^*$	22,5
$^1\Delta_{g_y}$	$[] \pi_x^* \quad [\uparrow \downarrow] \pi_y^*$	22,5
$^3\Sigma_g^-$	$[\uparrow] \pi_x^* \quad [\downarrow] \pi_y^*$	0

De acordo com os estudos básicos da fotoquímica, somente podem ocorrer transformações fotoquímicas com a absorção de luz. A energia associada à radiação luminosa na região ultravioleta (200 a 400 nm) e do visível (400 a 700 nm) é suficiente para promover transições eletrônicas em moléculas capazes de absorver luz (cromóforos) nessa região do espectro. Ao absorver luz uma molécula sofre uma transição eletrônica, tornando-se eletronicamente excitada.

Uma molécula no estado excitado é menos estável energeticamente que quando no estado fundamental. A energia de um estado eletronicamente excitado pode ser perdida de vários modos.

Processos radiativos e não radiativos para moléculas orgânicas podem ser representados no Diagrama de Jablonski, mostrado na Figura 10.

Figura 10- Diagrama de Jablonski apresentando os processos radiativos (Fluorescência e Fosforescência) e não radiativos (relaxamento vibracional, conversão interna e cruzamento intersistema) [26].

O processo de decaimento radiativo é o processo no qual a molécula descarrega sua energia de excitação sob a forma de fótons (Fluorescência e Fosforescência). Entretanto, o destino mais comum é o decaimento não radiativo, no qual o excesso de energia é transferido para moléculas vizinhas, onde se incluem os processos de relaxamento vibracional, cruzamento intersistema e conversão interna. Essa degradação térmica converte a energia de excitação em movimento térmico do ambiente, isto é, em calor. Uma molécula também pode tomar parte de uma reação química e pode ainda sofrer processos de supressão bi- ou tri-moleculares, com transferência de energia de uma molécula excitada para outras moléculas [27].

S_0 representa o estado fundamental, de menor energia; **a** representa a absorção de luz pela molécula ou cromóforo. S_1 é o estado excitado singlete de menor energia, que pode ser convertido para o estado tripleto por conversão intersistemas, **CIS**; e pode ainda transferir energia para outra molécula que porventura esteja presente no meio.

Outro caminho possível para o desaparecimento de S_1 é a perda da energia absorvida por emissão de luz. Esse processo é denominado fluorescência. O tempo de vida de S_1 é da ordem de nanosegundos e, desta forma, apenas reações químicas ou processos físicos muito rápidos podem ocorrer com esse estado excitado.

O estado tripleto T_1 , resultado de uma inversão do spin eletrônico do elétron que sofreu a transição eletrônica decorrente da interação da radiação luminosa, tem um tempo de vida mais longo, na faixa de microsegundos. A molécula no estado tripleto pode agir como um di-radical, abstraindo hidrogênio, ou ainda como um agente redutor ou oxidante, transferindo eletrons.

Os estados excitados S_1 e T_1 podem sofrer decaimento não radiativo, que consiste na perda de energia na forma de calor para o meio. Este processo é chamado de conversão interna **CI**. Processos de conversão interna ocorrem entre estados de mesma multiplicidade de spin ($S \rightarrow S$ e $T \rightarrow T$) e de conversão intersistemas entre estados de multiplicidade diferentes ($S \rightarrow T$).

A desativação do estado tripleto para o estado fundamental por emissão de luz, é denominada fosforescência. Pelo cruzamento intersistema uma molécula pode se tornar um estado tripleto e, a partir desse estado, perder sua energia vibracional até atingir o nível vibracional mais baixo do primeiro estado tripleto. A transição $T_1 \rightarrow S_0$ é proibida por spins, mas ela ocorre de uma maneira lenta e pode continuar por um período longo, após o estado excitado original ter sido formado. Este processo de fosforescência pode ocorrer em uma escala de 10^{-3} a 10^{-1} s. Este decaimento radiativo, em geral, é observado em temperaturas muito baixas, onde os níveis vibracionais dos estados excitado e fundamental não se sobrepõem, impedindo o processo preferido em temperaturas mais altas, que é a conversão intersistema.

1.2.2 - HISTÓRICO

Os egípcios, há cerca de 4000 anos, iniciaram essa terapia, através da ingestão de plantas (contendo os psoralenos, furo-[3,2-g]-coumarina ou ácido 6-hidroxi-5-benzofuranocrílico- δ -lactona) e luz solar no tratamento de doenças como o vitiligo [28,29].

Em 1900, Raab observou a morte do organismo unicelular *Paramecia*, sob a ação do corante acridina e luz solar [30]. Finsen, em 1901 descreveu que a radiação solar poderia ser empregada na cura de *Lupus Vulgaris* [31]. As primeiras aplicações do efeito fotodinâmico no tratamento de câncer de pele foram realizadas, em 1903, por Tappenier e Jesionek, empregando eosina como fotosensibilizador [32]. Meyer-Betz, em 1913, se auto-injetou 200 mg de uma suposta hematoporfirina e, ao ficar exposto à luz, teve fotossensibilidade na pele durante vários meses [29].

Policard em 1924 [33] descreveu que porfirinas podiam ser encontradas em tumores malignos, sendo completamente atóxicas, mas na presença de luz visível e oxigênio elas se tornam altamente tóxicas ao tecido celular. Schwartz no início da década de 50 estudou a primeira geração de drogas à base de derivados hematoporfíricos, demonstrando que nas experiências de Meyer-Betz, o princípio ativo não era a hematoporfirina (eliminada facilmente pelo organismo), e sim uma mistura de diversas substâncias oligoméricas resultantes do método original da síntese da mesma [29]. Schwartz continuou a estudar a mistura de oligômeros e denominou o novo composto de HpD.

No final dos anos 60, Lpson reportou um caso de tratamento bem sucedido de câncer de mama, usando derivados de hematoporfirina (HpD) e irradiação seletiva de tumor com luz visível [34].

Weishaupt e colaboradores [35], em 1976, postularam o que o oxigênio singleto, gerado por sensitização, a partir da transferência de energia do agente fototerapêutico no estado tripleto excitado para o oxigênio molecular no estado fundamental, era o agente citotóxico responsável pela degradação de células tumorais. No final da década de 70, a partir dos estudos de Dougherty e colaboradores [36,37], a TFD passou a ser reconhecida como uma opção para o tratamento de câncer, tendo sido utilizada com grande êxito no tratamento de tumores e outras enfermidades.

1.2.3 - TRATAMENTO CLÍNICO DE TUMORES

A Terapia Fotodinâmica (TFD) visa a destruição localizada do tecido vivo anormal mediante sua necrose ou inviabilização, assim como também a desativação de vírus, destruição de bactérias e fungos. A TFD também está sendo aplicada e pesquisada no tratamento de doenças como degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, restenosis, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose, AIDS, etc, as quais se caracterizam pelo crescimento anormal de um tecido vivo.

A TFD é recomendada para tumores de tamanho pequeno e médio, sendo também aplicada em tratamento pré-operatório para gerar a diminuição do tamanho dos tumores.

O tratamento se inicia através da administração intravenosa ao paciente de um composto fotossensível (porfirina - veículo fototerapêutico); após um período de espera, quando se obtém o máximo de concentração do veículo fototerapêutico no tecido lesado, procede-se à exposição do tumor à radiação visível, de comprimento de onda adequado, para a excitação do veículo fototerapêutico. A radiação, comumente fornecida por um laser, é conduzida ao local do tratamento utilizando-se um feixe de fibras ópticas (cateter de fibra óptica). A luz irradiada ativa o composto fotossensível, produzindo formas de oxigênio tóxicas, as quais afetam ou necrosam o tumor, provocando sua destruição e a conseqüente cura do paciente.

Figura 11- (a) Tecido; (b) Tumor; (c) Laser

O procedimento padrão para o tratamento clínico de tumores envolve a administração intravenosa do veículo fototerapêutico, pré-estabelecido que cerca de 2 a 5 mg de porfirinas por kg de massa corporal, ou 0,1 a 0,5 mg/kg de massa corporal, para os veículos fototerapêuticos mais recentes. Os efeitos tóxicos em seres humanos podem ocorrer na faixa de 300 a 500 mg/kg de massa corporal. [38].

A TFD é curativa para tumores com cerca de 2 cm de diâmetro. O fluxo de radiação incidente deve estar entre 100 e 200 mJ. cm⁻², para evitar o superaquecimento dos tecidos (redução da seletividade). No caso das porfirinas o início do tratamento ocorre entre 24 a 72 h após a administração do veículo fototerapêutico [25,38,39]. As fontes de radiação utilizadas são lasers que possibilitem o máximo de absorção do sensibilizador, com a ausência de efeitos térmicos significativos.

A TFD tem aplicações clínicas mais utilizadas nos tratamentos de câncer de bexiga, esôfago, pulmão, pele (primário e metastático do seio), intestino, trato digestivo superior, detecção e delineamento de lesões por fluorescência do tecido (câncer superficial de bexiga). Em outras aplicações da TFD destacam-se: abertura de vias aéreas obstruídas, redução do tamanho de tumores cerebrais e aplicação imediatamente após a remoção cirúrgica da lesão neoplásica.

1.2.4 - VEÍCULOS FOTOTERAPÊUTICOS

O veículo fototerapêutico introduzido no paciente tende a se concentrar em células que se reproduzem mais rapidamente (tecido lesado) [40]. Ainda não está bem esclarecido o mecanismo para essa seletividade. Através de estudos observou-se que essa seletividade resulta da associação do veículo fototerapêutico a lipoproteínas do plasma, as quais o transportam preferencialmente para células anormais.

No desenvolvimento de novas drogas, deve ser estudada principalmente a sua habilidade em formar oxigênio singlete.

Vários estudos demonstram que alguns parâmetros devem ser levados em consideração no desenvolvimento de novos veículos fototerapêuticos. Dentre estes, destacam-se:

- a) As propriedades fotofísicas favoráveis (eficiência na geração de oxigênio singleto);
- b) A toxidez baixa no escuro (baixa citotoxicidade em ausência de luz);
- c) A capacidade de penetração na membrana celular;
- d) A seletividade na penetração do tecido doente, em detrimento do tecido saudável;
- e) A fotossensibilidade não prolongada;
- f) A rápida eliminação pelo organismo após o tratamento;

Na região visível, quanto maior é o comprimento de onda da luz incidente, necessária à foto-excitação do composto, maior é o seu grau de penetração no tecido, aumentando a eficiência no combate ao tecido lesado. Quando o veículo fototerapêutico se encontra acumulado no tecido lesado, é efetuada a irradiação dosada e seletiva, induzindo a molécula a um estado singleto excitado ($^1S^*$). A partir deste estado a molécula poderá sofrer processos simples de desativação por colisão ou fluorescência (mecanismos que não são favoráveis a TFD), ou reagir com substratos biológicos, ou sofrer o processo não radiativo de conversão entre sistemas levando a um estado tripleto (3T), com posterior reação com moléculas do sistema biológico. O processo de reação direta da molécula no estado $^1S^*$ com substratos biológicos é denominado de TFD do tipo I, sendo que o processo via estado tripleto é denominado de TFD tipo II. O composto no estado tripleto pode perder energia adicional por fosforescência, colisão ou processo não radiativo pela troca de spin com outra molécula igualmente no estado tripleto. Como o processo por fosforescência é proibido, o tempo de vida do estado tripleto é relativamente grande, o suficiente para permitir a supressão de energia por colisão com o oxigênio (3O_2). A presença de oxigênio molecular é fundamental para o processo de TFD [41], além de que este oxigênio tripleto ao suprimir energia do sensibilizador (3T) deverá gerar oxigênio singleto (1O_2).

O oxigênio singleto é altamente reativo, possui tempo de vida em solução aquosa de aproximadamente 4 μ seg, sendo que em sistemas biológicos esse tempo fica abaixo de 0,04 μ seg (cerca de 100 vezes menor).

O oxigênio singleto pode realizar reações com substratos biológicos, como oxidação e ciclo-adição, principalmente em sítios ricos em elétrons presentes nas células alvo, como por exemplo: colesterol, triptofano, guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídios insaturados [29, 42], levando à interrupção de processos biológicos. Portanto, um dos primeiros testes efetuados no desenvolvimento de novos veículos fototerapêuticos é pesquisar a sua capacidade de formar oxigênio singleto.

A terapia fotodinâmica tem sido uma modalidade clínica bastante promissora para o tratamento do câncer, com a possibilidade de remissão ou até mesmo como um paliativo em vários casos dessa doença. No Japão desde 1980, a TFD tem sido aplicada tanto no início do tratamento de câncer pulmonar, como nos casos mais evoluídos (com auxílio cirúrgico). Utilizada no tratamento da descontaminação de sangue e no tratamento de várias moléstias.

Estudos demonstram que uma segunda geração de agentes fototerapêuticos, que possuem elevada absorptividade molar na região espectral correspondente à cor vermelha, estão substituindo os derivados da hematoporfirina, promovendo um elevado retorno fototerapêutico, possibilitando tratamento ao paciente com doses menores que as usuais.

1.2.5 - Medicamentos para TFD

Dentre os veículos fototerapêuticos intensamente estudados podemos destacar: porfirinas expandidas, clorinas (um dos anéis pirólicos oxidados), ftalocianinas, naftalocianinas, purpurinas e outros.

1.2.5.1 - Medicamentos Aprovados:

Photofrin (porfimer sodium): trata-se de uma mistura complexa de oligômeros de hematoporfirina [41].

O composto apresenta muitas propriedades benéficas e algumas desvantagens farmacocinéticas: demora a ser eliminado do corpo (tempo de meia vida de cerca de 250 h), a fotossensibilidade (sol forte) pode atingir mais de seis semanas; a incorporação no tecido lesado ocorre aproximadamente em dois dias após a administração da droga (hospitalização do paciente com dois dias de antecedência para evitar a exposição à luz); fotoexcitação com comprimento de onda da luz em 630 nm, limitando a penetração de luz no tecido para poucos milímetros (limita a aplicação em tumores grandes). É importante esclarecer, entretanto, que essas desvantagens são ínfimas se observarmos os métodos clássicos empregados no tratamento de câncer.

A dose recomendada é de 2 mg/kg do paciente, através de infusão intravenosa (3 – 5 min). O laser de fibra óptica cilíndrica é aplicado após 40 a 50 h. O medicamento foi aprovado pela FDA para o tratamento de câncer no esôfago e pulmão (endobrônquios). Para o esôfago, a dose de luz é de 300J/cm de tumor, com tempo de exposição de 12min e 30 seg, e no pulmão é de 200J/cm e 8min e 20 seg. A necessidade de uma segunda aplicação de laser, para eliminação de resíduos do tumor pode ser avaliada após 96 a 120 h da infusão intravenosa.

Levulan Kerastick (hidrocloreto do ácido aminolevulínico – ALA HCl) [44]

Composto obtido a partir do ácido δ -aminolevulínico – ALA (ácido 5-amino-4-oxopentanóico). Após aplicação na pele, o ALA (pró-droga, material de partida para todas as porfirinas in vivo) é ciclizado por biossíntese, gerando a protoporfirina IX (PP IX) fotoativa. A fotoexcitação é realizada 14 à 18h após a formação da PP IX na pele através de lâmpada azul, 400-500nm, a 10,9 J/cm² (por 17min). Após dose oral e intravenosa, o tempo de meia vida foi de (0,70 $\pm$ 0,18) h e (0,83 $\pm$ 0,05) h, respectivamente. É recomendado evitar, por no mínimo 40 h, a exposição prolongada à luz forte. Este medicamento foi aprovado para o tratamento de lesões pré-câncer de pele, na face e escalpo (keratosis actínica), câncer de bexiga, acne e outras.

Visudyne (BPDMA) [45]

O princípio ativo deste medicamento é obtido a partir de uma clorina (um dos anéis pirólicos da porfirina oxidado). BPDMA em metanol [41,46] apresenta coeficiente de absorvidade molar $\epsilon_{690} = 3,4 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Na composição de 2 mg/mL (protegido da luz, usado dentro de 4 h), apresenta tempo de meia vida de 6 h, fotossensibilidade da pele muito menor que o Photofrin. Aprovado para o tratamento da degeneração macular, com o tempo de 5 a 10 min entre a infusão e a iluminação (direta no olho) através de laser não térmico (dose de luz indicada de 50 J/cm^2 de lesão neovascular com uma intensidade de 600 mW/cm^2 com tempo aproximado de 83 seg) [45,47,48]. O tempo recomendado para iluminação é de 30 a 150 min após a administração da BPDMA para o tratamento de tumores [49].

1.2.5.2 - Medicamentos sob Avaliação

Meta – tetra-hidroxifenilclorina (m-THPC) [47,50]

Medicamento conhecido como Foscan (nome comercial) e Temoporfin (nome genérico). É uma droga análoga à *meso*-tetrafenilporfirina. Pesquisas indicam que a atividade fotodinâmica é mais acentuada com o *m*-THPC do que com o Photofrin. O *m*-THPC apresenta maior tempo de vida em estado tripleto, maior absorvidade molar ($\epsilon_{652} = 2,24 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), maior hidrofobicidade, maior seletividade, fotoexcitação em 652 nm. Fotossensibilidade na pele ligeiramente menor do que a causada pelo Photofrin. Esta droga está sendo avaliada pela FDA para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço, inclusive em casos onde a cirurgia e a radioterapia não podem ser indicadas [51,52].

Mono-Laspatil clorina e6 (Nep6 ou MACE)

O medicamento é uma clorina com elevada solubilidade em água, com absorvidade molar $\epsilon_{65} = 4,0 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Apresenta baixa fotossensibilidade na pele e rápida eliminação do corpo [29,52].

2 - OBJETIVOS

Nossos estudos visaram avaliar alguns derivados porfirínicos, benzoporfirina monoácida (BPD) e *meso*-tetrafenilporfirina (TPP), como possíveis agentes ativos em terapia fotodinâmica (TFD). Para tanto, as porfirinas foram incorporadas em lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO) que é uma mistura de fosfolipídios naturais da soja, e vesículas catiônicas sintéticas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), avaliando-se a incorporação da droga através de registros de seus espectros ópticos, com determinação de seus parâmetros, nas diferentes preparações lipossomais.

Pretendeu-se estudar a influência de diferentes fatores nessa incorporação e ainda verificar a potencialidade das drogas incorporadas nos lipossomos como agentes ativos em TFD através da formação de espécies reativas de oxigênio. Em todos os estudos feitos, comparou-se a atividade da benzoporfirina monoácida (BPD) com a da *meso*-tetrafenilporfirina (TPP).

Este trabalho é resultante de uma colaboração interdisciplinar entre os grupos dos Profs. Koiti Araki, Ana Maria Carmona Ribeiro e Ana Maria da Costa Ferreira.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

3.1.1 –Reagentes

Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB), Sigma, 99,9% de pureza e usado sem purificação adicional.

Asolecitina (ASO) – L- α -phosphatidylcholine (L- α - lecithin), Type II – S, extraída de soja, Sigma.

Água ultrapura, grau MilliQ

Solução de nitrato de mercúrio 10mM titulada

Solução indicadora de difenilcarbazona em etanol

Benzoporfirina Monoácida – solução estoque de 1mg/mL

(meso) - Tetrafenilporfirina – solução estoque de 0,5 mg/mL

Dimetilsulfóxido p.a., Aldrich.

Dimetilformamida p.a., Aldrich

Benzeno p.a., Merck

Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA 0,375% W/V), Sigma

Hidroxitolueno Butilado (BHT 0,05% W/V), Sigma

Ácido Clorídrico (HCl 0,25M), Merck

Triton X-100 (Triton 1%), Sigma

Dinitrofenil-hidrazina (DNPH 1mM, em HCl 1M), Sigma

Hidróxido de Sódio (NaOH 1M), Merck

Rubreno 99%, Acros Orgânicos

3.1.2 –Equipamentos

Espectrofotômetro Hitachi, modelo U-2000, duplo feixe

Espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo 8453A

Espectrofotômetro Hewlett-Packard, modelo D 9829A

Espectrofluorímetro Photon Technology Inc., modelo LS100

Sonicador Lab-Line Ultra Tip Labsonic Systems

Centrífuga refrigerada Himac, modelo SCR20B, da Hitachi, com velocidade de rotação entre 0 a 20000 rpm, à temperatura entre -10 a 40 °C

Banho-maria, da Precision Scientific, modelo 182

Banho-maria, da Quimis

Aagitador magnético, da Mistral

Monocromador f/3.4, da Applied Photophysics

Balança Analítica Ohaus, modelo Analytical Standard

Fotomultiplicadora Hamamatsu modelo R5509

3.2 - Métodos

3.2.1 - Preparação das vesículas de DODAB

3.2.1.2 -Por aquecimento – método do SNIPPE

DODAB foi pesado analiticamente e transferido para um frasco, adicionando-se quantidade suficiente de água para obtenção da concentração desejada, sendo colocado em banho-maria a 55-57°C, por 30 minutos. A dispersão foi homogeneizada por agitação, para a obtenção de uma dispersão final turva, de vesículas grandes de diâmetro médio de 400 nm [59].

Foi feita em seguida a dosagem da dispersão por titulação com nitrato de mercúrio, usando difenilcarbazona como indicador [60].

3.2.1.3 – Por sonicação

DODAB foi pesado analiticamente, transferido para um béquer, e foi adicionado o suficiente de água para obtenção da concentração desejada.

As vesículas pequenas de DODAB foram preparadas por sonicação, em temperaturas entre 60-80°C, usando-se a sonda de um “Cell Disrupter Virsonic-Model 150”, operado a 90W nominais, durante 10 minutos. Após a sonicação a dispersão foi centrifugada durante 60 minutos a 15°C, a 10.000 rpm, para precipitar o titânio e eventuais vesículas multilamelares formadas [61]. O sobrenadante corresponde à preparação referida como vesículas sonicadas de DODAB, com diâmetro médio de 86nm [62].

3.2.2 – Preparação de Lipossomos Aniônicos de Asolecitina (ASO) [63]

Asolecitina foi pesada analiticamente, e transferida para um frasco e diluída em água para atingir a concentração desejada. Em seguida foi efetuada a agitação vigorosa da solução de Asolecitina para a obtenção de uma solução homogênea.

3.2.3 – Preparação da Solução Benzoporfirina Monoácida (BPD)

A metodologia da síntese da BPD é de domínio dos grupos dos Profs. Henrique Eisi Toma e Koiti Araki. A BPD foi pesada analiticamente, adicionando-se quantidade suficiente do solvente DMSO para obtenção da concentração desejada e completa dissolução. Na maioria das vezes a solução-estoque utilizada foi de 1mg/mL.

3.2.4 - Preparação da Solução da *meso*-Tetrafenilporfirina (TPP)

A metodologia da síntese da TPP é de domínio do grupo dos Profs. Henrique Eisi Toma e Koiti Araki. A TPP foi pesada analiticamente, e a dissolução foi realizada adicionando-se quantidade suficiente do solvente DMF para obtenção da concentração desejada. A solução-estoque utilizada foi de 0,5 mg/mL.

3.2.5 – Preparação do Rubreno (RB)

O RB foi pesado analiticamente, e dissolvido na quantidade adequada do solvente DMF para obtenção da concentração desejada.

3.2.6 - Análise das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – Método TBARS

O método TBARS é um dos mais antigos e freqüentemente empregados para a determinação de produtos da peroxidação lipídica [64]. O método consiste na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com aldeídos bifuncionais, principalmente malonaldeído (MDA), derivado de moléculas oxidadas, com geração de um produto colorido, provavelmente através da reação abaixo [65]:

O cromóforo resultante apresenta um espectro de absorção característico com uma banda em 532nm. A simplicidade e eficácia do método o tornam amplamente utilizado como medida da oxidação lipídica [64]. Entretanto a reação não é específica para a peroxidação lipídica, uma vez que o aduto TBA-MDA pode ser resultante de danos oxidativos a uma ampla faixa de biomoléculas, incluindo carboidratos, proteínas, aminoácidos e DNA [66].

O método consiste de duas etapas distintas. Na primeira etapa, onde ocorre a reação, foram preparadas soluções aquosas de lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO – 1mM) e a partir destas foram incorporadas concentrações crescentes de *meso*-tetrafenilporfirina e benzoporfirina monoácida, a partir de uma solução estoque (TPP – 0,5 mg/mL) e (BPD – 1mg/mL). Também foram feitos experimentos de controle, com as amostras de lipossomos (ASO) sem a TPP e sem a BPD.

Os experimentos foram realizados para verificar tanto o efeito térmico como o fotoquímico. No tratamento térmico, as amostras foram incubadas a 37 °C em um banho termostatizado, por 40 minutos. No tratamento fotoquímico, as amostras foram submetidas à irradiação de luz (lâmpada de Xenônio, a 412nm/ para TPP e a 416nm/ para BPD, por 30 minutos). Nestes ensaios, também foram feitos os controles com as amostras de lipossomos (ASO) sem a TPP e sem a BPD, nas mesmas condições de concentração, para a análise térmica e fotoquímica.

A segunda etapa consiste na análise do processo, onde se adiciona num volume total de 1,00 mL (0,5 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico 1% (W/V)) + 0,5 mL das amostras submetidas a tratamento térmico ou fotoquímico. Em seguida, aquece-se a 100 °C por 15 minutos, em banho termostatizado. Após resfriamento à temperatura ambiente, mede-se a absorbância a 532nm, correspondente ao cromóforo formado.

3.2.7 - Determinação Espectrofotométrica de Grupos Carbonil

Danos oxidativos em lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO), foram também analisados pela formação de grupos carbonil, monitorados através da obtenção das correspondentes dinitrofenilhidrazonas, pela reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH). Os derivados hidrazonas são estáveis, apresentando forte coloração amarela ($\lambda_{\text{max}} = 360/390\text{nm}$; $\epsilon = 2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), podendo ser estimados espectrofotometricamente [67].

No procedimento utilizado foram preparadas soluções aquosas de lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO – 1mM) e a partir destas foram incorporadas concentrações crescentes de *meso*-tetrafenilporfirina ou benzoporfirina monoácida, a partir de soluções-estoque de TPP (0,5mg/mL) ou BPD (1mg/mL). Os experimentos foram realizados por tratamento térmico e fotoquímico. No tratamento térmico as amostras foram incubadas a 50 °C em um banho termostatizado, por 30 minutos. No tratamento fotoquímico as amostras foram submetidas à irradiação de luz (lâmpada de Xenônio a 412nm/para TPP e a 416nm/para BPD, por 30 minutos). Neste ensaio, também foram feitos os controles com as amostras de lipossomos (ASO) sem a TPP e sem a BPD, nas mesmas condições de concentração, tanto na análise térmica como fotoquímica.

Após tratamento térmico ou fotoquímico, adicionou-se a todas as amostras 1,00 mL de DNPH (1mM, em HCl 1M) e incubou-se por mais 30 min, a 50 °C. Depois do resfriamento das amostras, adicionou-se 1,5 mL de hidróxido de sódio 1,0 M. Em seguida, após 5 minutos, mediu-se a absorbância da solução em 450nm, correspondente as fenilhidrazonas.

amostras, adicionou-se 1,5 mL de hidróxido de sódio 1,0 M. Em seguida, após 5 minutos, mediu-se a absorbância da solução em 450nm, correspondente as fenilhidrazonas.

3.2.8 - Determinação de Rendimento Quântico de Oxigênio Singleto

Uma forma mais rápida e direta de medir rendimento quântico ϕ_{Δ} é através da intensidade do sinal gerado pela fosforescência de oxigênio singleto ($^1\Delta_g$) [68]. Este sinal pode ser medido por um equipamento de emissão de luz no infravermelho (PMT), com comprimento de onda de excitação em 532nm, para analisar o sinal resolvido no tempo (TRIL - Intensidade de Luminescência Resolvida no Tempo).

Um laser pulsado deve ser usado como fonte de luz, para este tipo de análise. A análise do sinal de fosforescência de oxigênio singleto foi feita em 1270nm. Um sistema semelhante foi usado para determinação de valores de ϕ_{Δ} para porfirinas, que passou a ser considerado como padrão para essas medidas [58].

Os ensaios foram realizados com solução de TPP/BENZENO, a qual foi utilizada como padrão, e em soluções de amostras (TPP/DMF, TPP/ASO) cujo ϕ_{Δ} é desconhecido, e que estejam absorvendo a mesma quantidade de luz. O valor de ϕ_{Δ} pode ser calculado diretamente pela relação entre as intensidades dos sinais resultantes da fosforescência de oxigênio singleto detectados pelo detector de diodo de germânio nas soluções analisadas:

$$\phi_{\Delta p} / \phi_{\Delta a} = I_p / I_a$$

onde:

I = intensidade do sinal inicial

a = amostra

p = padrão

Este método está descrito na literatura (Rodgers, A, J1987. Singlet Oxygen Quantum Yields ACS Symposium Series, Chapter 5, 339: 76-97).

3.2.9 – Formação de $^1\text{O}_2$ em Lipossomos através de um Supressor de $^1\text{O}_2$ (Método de Detecção Indireto com RB)

A incorporação do RB ao lipossomo aniônico de asolecitina (ASO), foi realizada pela adição de 5 μL de uma solução de 7 μM de RB em DMF sobre 1 mL de uma solução aquosa de TPP 8 μM incorporada em numa solução aquosa de ASO 1mM. A mistura foi homogeneizada até o espectro eletrônico se estabilizar, e ser monitorado pela diminuição das bandas do espectro de absorção em 303 nm. O experimento foi realizado na ausência de luz ambiente, pois o RB é rapidamente oxidado, mesmo em pequena quantidade de $^1\text{O}_2$ formado.

Estrutura do Rubreno

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Solubilização e Estabilização da BPD e TPP

A benzoporfirina monoácida é um composto muito instável, devendo ser mantida o menor tempo possível em solução, e sua exposição à luz e ao oxigênio deve ser evitada.

Foram preparadas soluções aquosas de vesículas catiônicas sintéticas de brometo de dioctadecildimetilamônio, [DODAB] = 2mM (vesículas grandes) e [DODAB] = 1mM (vesículas pequenas) e de lipossomos aniônicos de Asolecitina, [ASO] = 1mM, e a partir destas, foram incorporadas concentrações crescentes de benzoporfirina monoácida e *meso*-tetrafenilporfirina a partir de soluções-estoque ([BPD] = 1mg/mL) e [TPP] = 0,5mg/mL), sendo as concentrações variadas nos intervalos: [BPD] = $1,35 \times 10^{-5}$ a $6,5 \times 10^{-5}$ Mol.L⁻¹ e *meso*-tetrafenilporfirina [TPP] = $2,7 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ Mol.L⁻¹.

4.1.1. Experimentos Espectrofotométricos

Os experimentos realizados visaram verificar os espectros eletrônicos da benzoporfirina monoácida e *meso*-tetrafenilporfirina em solvente apropriado e em vesículas, e determinar os respectivos parâmetros espectroscópicos, em função das concentrações crescentes das drogas.

Para tanto, foram avaliados os efeitos de concentração da droga e dos lipídios, além da influência do tempo, sobre os espectros de absorção de luz das drogas. Dessa forma, a solubilização e a estabilidade da BPD e da TPP nas bicamadas lipossomais foram comparadas com sua solubilização e estabilidade nos seus respectivos solventes, o dimetilsulfóxido (DMSO) para a BPD e a dimetilformamida (DMF) para a TPP.

A metodologia para preparação das vesículas (DODAB), dos lipossomos (ASO) e das porfirinas (BPD e TPP) foi descrita anteriormente, nos itens 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, e 3.2.4.

Os resultados dos espectros eletrônicos da BPD e da TPP, dissolvidas nos respectivos solventes ou incorporadas em ASO ou DODAB foram representados graficamente pelas Figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19.

A)

[BPD] = $1,35 \times 10^{-5}$ a $6,5 \times 10^{-5}$ Mol.L⁻¹

B)

Figura 12 – (A) Espectros de absorção de benzoporfirina monoácida, a várias concentrações, em dimetilsulfóxido (DMSO). B) Variação da absorbância com a concentração da droga a vários comprimentos de onda.

A)

B)

Figura 13 – (A) Espectro de absorção de benzoporfirina monoácida, a várias concentrações, em dispersão aquosa de vesículas catiônicas sintéticas pequenas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).
(B) Variação da Absorbância com a concentração da droga a vários comprimentos de onda.

A)

B)

[BPD]= $6,5 \times 10^{-5} \text{ Mol.}^{-1}$

Figura 14 – (A) Espectro de absorção de benzoporfirina monoácida, a várias concentrações, em dispersão aquosa de vesículas catiônicas sintéticas grandes de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).

(B) Variação da absorbância com a concentração da droga a vários comprimentos de onda.

A)

B)

[BPD]=1,35x10⁻⁵a 6,5x10⁻⁵ Mol.L⁻¹

Figura 15 – (A) Espectro de absorção de benzoporfirina monoácida, a várias concentrações, em dispersão aquosa de lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO).
(B) Variação da absorbância com a concentração da droga a vários comprimentos de onda.

A partir das Figuras 12, 13, 14 e 15, foram calculados os coeficientes de absorvidade molar para a BDP em DMSO, DODAB (vesículas pequenas), DODAB (vesículas grandes) e ASO, correspondentes às suas principais bandas de absorção, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1- Principais bandas e respectivos coeficientes de absorvidade molar da BPD em DMSO e nas vesículas de DODAB e nos lipossomos de ASO.

Meio	$\lambda_{\max}$, nm	ϵ , $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
DMSO	404 (Banda Soret)	24,4
	503	4,0
	536	2,7
	573	1,8
	624	0,9
	661	1,0
DODAB -1mM (vesícula pequena)	404.5 (Banda Soret)	18,0
	503	3,3
	536	2,2
	573	1,5
	624	0,9
	661	0,9
DODAB – 0,5mM (vesícula grande)	404.5 (Banda Soret)	13,8
	503	3,3
	536	2,5
	573	1,6
	624	0,8
	661	1,0
ASO – 1mM	404.5 (Banda Soret)	16,0
	503	3,0
	536	2,0
	573	1,3
	624	0,69
	661	0,9

Estes resultados demonstram que a absorbância medida é linear com a concentração, portanto indica boa solubilização da BPD nas vesículas catiônicas sintéticas de DODAB e nos lipossomos aniônicos de ASO nesta faixa [69,70].

Variando-se o tamanho das vesículas de DODAB verificou-se que as bandas observadas e os respectivos valores dos coeficientes de absorvidade molar da BDP foram maiores para vesículas pequenas. Assim, verificou-se que os coeficientes de absorvidade molar indicaram resultados melhores para o DMSO (solvente), seguido do DODAB (vesículas pequenas) e para os lipossomos de ASO.

Repetindo-se este procedimento para a TPP, dissolvida em DMF, DODAB (vesículas pequenas), DODAB (vesículas grandes) e ASO, obtiveram-se os seguintes resultados, mostrados nas Figuras 16, 17, 18 e 19.

A)

B)

$$[TPP] = 2,7 \times 10^{-6} \text{ a } 1,6 \times 10^{-4} \text{ Mol.L}^{-1}$$

Figura 16 – (A) Espectro de absorção de *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) dissolvida em N,N-dimetilformamida (DMF).

(B) Variação da absorbância com a concentração da droga a vários comprimentos de onda.

Method file : <untitled>
 Information : Default Method
 Data File : A:\TPPDOD86.SD Created : 5/9/00 17:27:08

Overlaid Spectra:

$$[TPP] = 2,7 \times 10^{-6} \text{ a } 1,6 \times 10^{-4} \text{ Mol.L}^{-1}$$

Figura 17 – (A) Espectro de absorção da *meso*-tetrafenilporfirina (TPP), a várias concentrações, em dispersão aquosa de vesículas catiônicas sintéticas pequenas de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).
 (B) Variação da Absorbância com a concentração da droga a vários comprimentos de onda.

Method file : <untitled>
 Information : Default Method
 Data File : A:\TPPDODGR.SD Created : 4/27/00 17:24:38

Overlaid Spectra:

[TPP] = $2,7 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ Mol.L⁻¹

Figura 18 – (A) Espectro de absorção da *meso*-tetrafenilporfirina (TPP), a várias concentrações, em dispersão aquosa de vesículas catiônicas sintéticas grandes de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB).
 (B) Variação da absorbância com a concentração da droga a vários comprimentos de onda.

Method file : <untitled>
 Information : Default Method
 Data File : A:\ESPECTRO.SD Created : 4/25/00 17:04:46

[TPP] = $2,7 \times 10^{-6}$ a $1,6 \times 10^{-4}$ Mol.L⁻¹

Figura 19 - (A) Espectro de absorção da *meso*-tetrafenilporfirina (TPP), a várias concentrações, em dispersão aquosa de lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO).

(B) Variação da absorbância com a concentração da droga a vários comprimentos de onda.

A partir das Figuras 16, 17, 18 e 19, foram calculados os coeficientes de absorvidade molar para a TPP em DMF, DODAB (vesículas pequenas), DODAB (vesículas grandes) e ASO, correspondentes às suas principais bandas de absorção, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Principais bandas e respectivos coeficientes de absorvidade molar da TPP em DMSO e nas vesículas de DODAB e nos lipossomos de ASO.

Meio	λ_{max} , nm	$\epsilon, 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
DMF	416 (Banda Soret) 517 (Banda Q) 552 592 650	18,6 17,7 8,2 5,5 5,6
DODAB -1mM (vesícula pequena)	416 (Banda Soret) 517 (Banda Q) 552 592 650	16,7 15,8 7,4 4,9 3,7
DODAB – 0,5mM (vesícula grande)	416 (Banda Soret) 517 (Banda Q) 552 592 650	16,0 15,0 7,2 5,3 4,3
ASO – 1mM	416 (Banda Soret) 517 (Banda Q) 552 592 650	15,3 14,0 3,8 2,9 2,4

Estes resultados demonstram que a absorbância medida é linear com a concentração, portanto indica ótima solubilização da TPP incorporada em soluções aquosas de vesículas sintéticas catiônicas de DODAB e nos lipossomos aniônicos de ASO na faixa de concentrações estudadas.

Também neste caso os valores determinados dos comprimentos de onda correspondentes a máximos de absorção e os respectivos coeficientes de absorvidade molar para a TPP em solução de DMF, DODAB (vesículas pequenas), DODAB (vesículas grandes) e ASO, indicaram melhores resultados para o DMF, seguido do DODAB (vesículas pequenas), e para os lipossomos de ASO.

4.1.2. Experimentos de Emissão de Fluorescência

Nestes experimentos utilizou-se a emissão de fluorescência, submetida à excitação em 540nm, para observar possíveis efeitos de agregação da TPP e sua incorporação em vesículas catiônicas sintéticas de DODAB e em lipossomos aniônicos de ASO.

Os resultados dos espectros de emissão de fluorescência da TPP dissolvida em solvente apropriado ou incorporada em ASO ou DODAB foram representados graficamente pelas Figuras 20, 21, 22 e 23.

Figura 20 – Espectro de emissão de fluorescência de *meso*-tetrafenilporfirina ([TPP]= 0,5mg/mL) dissolvida em N,N-dimetilformamida (DMF) a várias concentrações.

Figura 21 – Espectro de emissão de fluorescência de *meso*-tetrafenilporfirina ([TPP]= 0,5mg/mL) incorporada em dispersão aquosa de vesículas sintéticas catiônicas sonicadas de brometo de dioctadecildimetilamônio ([DODAB]= 1mM).

Figura 22 – Espectro de emissão de fluorescência de (meso) Tetrafenilporfirina ([TPP]= 0,5mg/mL) incorporada em dispersão aquosa de vesículas sintéticas catiônicas grandes de brometo de dioctadecildimetilamônio ([DODAB]= 0,5mM).

Figura 23 – Espectro de emissão de fluorescência de (meso) Tetrafenilporfirina ([TPP]= 0,5mg/mL) incorporada em dispersão aquosa de lipossomos aniônicos de asolecitina ([ASO]= 1mM).

Os espectros de emissão de fluorescência de TPP incorporada em soluções aquosas de vesículas catiônicas sintéticas de DODAB e em lipossomos aniônicos de ASO, com excitação em 540 nm, mostraram-se similares aos espectros obtidos em seu respectivo solvente, o DMF, comprovando a solubilização da droga (TPP) nas bicamadas lipossomais.

Observamos que com o aumento da concentração de TPP nas soluções lipossomais, aumenta também a intensidade de fluorescência emitida, numa relação linear, seguida de um efeito de saturação com concentrações maiores.

4.2- Danos Oxidativos aos Lipossomos Aniônicos de ASO em Presença de TPP e BPD

Foram verificados possíveis danos aos próprios lipossomos de asolecitina (ASO), através da formação de derivados carbonílicos e espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete, radicais hidroxil ou superóxido), detectadas por métodos químicos clássicos, como os métodos TBARS [64,65] e determinação espectrofotométrica de grupos carbonil, através de detecção das respectivas dinitrofenilhidrazonas [67].

4.2.1 - Determinação de Espécies Reativas ao TBA

O estudo da oxidação dos lipossomos aniônicos de asolecitina catalisadas por derivados porfirínicos TPP e BPD foi realizado através do método TBARS [64,65], descrito anteriormente no item 3.2.3 Análise das Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – Método TBARS.

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foram identificadas pela medida de sua absorbância a 532nm e quantificadas utilizando-se sua absorvidade molar de $1,36 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [67].

Estes estudos de danos oxidativos foram realizados a partir da incorporação de concentrações crescentes de *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) e benzoporfirina monoácida (BPD) em lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO). Os estudos de danos oxidativos aos lipossomos aniônicos de ASO (1mM) foram realizados a partir da incorporação de concentrações crescentes de TPP e BPD, a partir de uma solução estoque (TPP – 0,5mg/mL) e (BPD – 1mg/mL).

Os experimentos foram realizados por tratamento térmico (a 37°C, por 40min) e fotoquímico (com lâmpada de Xenônio, a 412nm para a TPP e 416nm para a BPD, durante 30 minutos). Também foram feitos os controles com as amostras de lipossomos (ASO) sem a TPP e sem a BPD.

Os valores das concentrações dessas espécies encontram-se nas **Tabelas 3 e 4**, os quais foram representados graficamente pelas **Figuras 24 e 25**. Os valores correspondem à média de duas determinações.

Tabela 3 - Danos Oxidativos a lipossomos ASO contendo concentrações crescentes de TPP, após tratamento térmico e fotoquímico.

Conteúdo (μmol/L)	TBARS (μmol/L)	TBARS (μmol/L)	TBARS (μmol/L)	TBARS (μmol/L)
[TPP] em ASO	ASO Tratamento Fotoquímico	TPP Tratamento Fotoquímico	ASO Tratamento Térmico	TPP Tratamento Térmico
0,0	0,37 ± 0,08		0,276 ± 0,1	
0,8		0,41 ± 0,09		0,32 ± 0,09
8,0		0,60 ± 0,09		0,52 ± 0,09
16,0		1,09 ± 0,01		0,96 ± 0,08
31,0		2,2 ± 0,2		2,1 ± 0,1
61,0		3,3 ± 0,1		3,1 ± 0,1
68,0		4,2 ± 0,2		4,0 ± 0,2

Soluções-estoque: [ASO] = 1mM; [TPP] = 0,5 mg/mL
 Tratamento Fotoquímico (lâmpada de Xe/412nm, por 30min)
 Tratamento Térmico (a 37 °C, por 40min)

FIGURA 24 – Danos Oxidativos a lipossomos de Asolecitina em Presença de TPP

Tabela 4 - Danos Oxidativos a lipossomos ASO contendo concentrações crescentes de BPD, após tratamento térmico e fotoquímico.

Conteúdo ($\mu\text{mol/L}$)	TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	TBARS ($\mu\text{mol/L}$)
[BPD] em ASO	ASO Fotoquímico	BPD Fotoquímico	ASO Térmico	BPD Térmico
0,0	$0,37 \pm 0,08$		$0,27 \pm 0,09$	
13,5		$0,43 \pm 0,06$		$0,31 \pm 0,05$
26,8		$0,56 \pm 0,08$		$0,56 \pm 0,04$
39,7		$0,76 \pm 0,09$		$0,75 \pm 0,08$
52,5		$1,21 \pm 0,08$		$1,10 \pm 0,06$
65,0		$1,44 \pm 0,08$		$1,36 \pm 0,09$

Soluções-estoque: [ASO]= 1mM; [BPD]= 1mg/mL

Tratamento Fotoquímico (lâmpada de Xe, 416nm/ por 30min)

Tratamento Térmico (a 37 °C, por 40min)

FIGURA 25 – Danos Oxidativos a lipossomos ASO em Presença de BPD

Analisando os dados referentes aos ensaios realizados pelo método TBARS verificou-se que o grau de dano observado no lipossomo aniônico de asolecitina (ASO) é elevado em presença dos derivados porfirínicos TPP e BPD quando comparado aos controles, isto é na ausência da porfirina. Porém os danos observados sob ação da luz (efeito fotoquímico) foram da mesma ordem de grandeza daqueles verificados na ausência de luz, isto é apenas por efeito térmico.

4.2.2 - Determinação de Grupos Carbonil Formados nos Lipossomos

Lipossomos constituídos de lipídeos sintéticos e/ou lipídeos extraídos de fontes biológicas (lecitina de soja), têm sido bastante estudados como modelos de membranas biológicas. A fosfatidilcolina ou lecitina [71] é um dos lipídeos mais comumente encontrados em membranas biológicas. A lecitina extraída de soja é de fácil obtenção e por isso tem sido bastante utilizada.

Os danos oxidativos aos lipossomos aniônicos de asolecitina (ASO), também foram estimados pela formação de grupos carbonil, monitorados através da obtenção das correspondentes dinitrofenilhidrazonas, pela reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH), conforme procedimento descrito no item 3.2.4, Determinação Espectrofotométrica de Grupos Carbonil. Os derivados hidrazonas são estáveis, apresentando forte coloração amarela, e foram monitorados espectrofotometricamente em 450nm [72]. O valor de absorvidade molar de $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [72], [73] foi utilizado para quantificar a possível formação de grupos carbonil. Os experimentos foram realizados por tratamento térmico (a 50°C, por 30min) e fotoquímico (com lâmpada de Xenônio, a 412nm para a TPP e 416nm para a BPD, durante 30 minutos). Também foram feitos os controles com as amostras de lipossomos (ASO) sem a TPP e sem a BPD.

Na **Tabela 5** são apresentados valores da concentração de grupos carbonil formados em lipossomos de asolecitina através da incorporação da TPP e na **Tabela 6** constam os dados análogos para a asolecitina com a incorporação da BPD.

TABELA 5 - Formação de Grupos Carbonil através de Danos Oxidativos a lipossomos ASO

Conteúdo ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonil ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonil ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonil ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonil ($\mu\text{mol/L}$)
[TPP] em ASO	ASO Tratamento Fotoquímico	TPP Tratamento Fotoquímico	ASO Tratamento Térmico	TPP Tratamento Térmico
0,0	$46,9 \pm 1,0$		$48,9 \pm 1,0$	
8,0		$48,1 \pm 1,0$		$49,6 \pm 1,0$
16,0		$51,9 \pm 1,7$		$52,9 \pm 2,0$
31,0		$53,6 \pm 1,0$		$54,8 \pm 1,2$
61,0		$54,7 \pm 1,0$		$60,0 \pm 1,0$
68,0		$55,7 \pm 1,0$		$60,8 \pm 1,6$

Soluções-estoque: [ASO]= 1mM; [TPP]= 0,5 mg/mL

Tratamento Fotoquímico (lâmpada de Xe/412nm, por 30min)

Tratamento Térmico (a 50 °C, por 30min)

Os dados da **Tabela 5** foram representados graficamente pela **Figura 26**.

FIGURA 26- Formação de Grupos Carbonil através de Danos Oxidativos à Asolecitina

TABELA 6 - Formação de Carbonil através de Danos Oxidativos na Asolecitina.

Conteúdo ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonil ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonil ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonil ($\mu\text{mol/L}$)	Carbonil ($\mu\text{mol/L}$)
[BPD] em ASO	ASO Tratamento Fotoquímico	BPD Tratamento Fotoquímico	ASO Tratamento Térmico	BPD Tratamento Térmico
0,0	39,9 $\pm$ 1,0		48,9 $\pm$ 1,7	
13,5		44,9 $\pm$ 1,0		43,5 $\pm$ 1,0
26,8		41,0 $\pm$ 1,0		40,7 $\pm$ 0,8
39,7		38,4 $\pm$ 1,0		36,3 $\pm$ 1,0
52,5		35,7 $\pm$ 1,0		34,9 $\pm$ 1,0
65,0		35,4 $\pm$ 1,0		33,8 $\pm$ 1,0

Soluções-estoque: [ASO]= 1mM; [BPD]= 1mg/mL

Tratamento Fotoquímico (lâmpada de Xe/416nm, por 30min)

Tratamento Térmico (a 50 °C, por 30min)

Os dados da **Tabela 6** foram representados graficamente pela **Figura 27**.

FIGURA 27 – Formação de Grupos Carbonil através de Danos Oxidativos na Asolecitina

Através da determinação espectrofotométrica de grupos carbonil verificou-se evidência de maior formação de compostos carbonílicos nos lipossomos aniônicos de asolecitina, após incorporação de TPP e BPD, embora discreta (~10% maior), em comparação aos controles.

No caso da TPP observa-se que o processo térmico levou a uma maior oxidação do que no processo fotoquímico. A diferença observada aumenta com a concentração crescente da TPP. No caso da BPD, não se observou diferença significativa entre os dois processos, nem dependência com a concentração da BPD.

Portanto, estes resultados indicaram que a reatividade via formação de radicais livres foi muito pequena. Portanto, provavelmente o mecanismo tipo I quase não ocorre nestes sistemas estudados.

Outra possibilidade de mecanismo para este processo seria através da formação de oxigênio singleto, a qual foi então verificada por: a) por fotólise de pulso a laser (Fotólise Relâmpago) e b) medidas da supressão usando rubreno.

4.3 - Estudo de Formação de $^1\text{O}_2$ em Lipossomos

A utilização de lipossomos ou vesículas no estudo da eficiência de formação de $^1\text{O}_2$, nos sistemas porfirínicos estudados, é uma tentativa de mimetizar dois ambientes bastante distintos, encontrados pelos agentes fototerapêuticos numa membrana celular. Um, no interior, totalmente hidrofóbico, ideal para acomodar e concentrar espécies apolares, incluindo o O_2 dissolvido. O outro, do lado externo, no meio aquoso, hidrofílico e capaz de dissolver apenas espécies polares. Além disso, sendo as superfícies destes lipossomos ou vesículas carregadas negativamente, estes sistemas tornam-se bastante interessantes já que estudamos espécies porfirínicas com cargas positivas e hidrofobicidades variáveis.

Os arranjos e as condições experimentais ainda não foram inteiramente otimizados. Os resultados apresentados a seguir referem-se às primeiras tentativas em estabilizar as porfirinas (TPP) incorporadas em lipossomos de asolecitina (ASO).

4.3.1 - Verificação da Geração de Oxigênio Singleto por Fotólise de Pulso a Laser (Fotólise Relâmpago)

Fotólise de Pulso é uma técnica que consiste na irradiação da amostra com um laser de pulso de curta duração. A metodologia aplicada foi a denominada de Ângulo Reto. A análise do sinal de fosforescência de oxigênio singleto foi observada onde a luz de excitação entra por uma face da cubeta; e a fosforescência é observada a partir da face situada a 90° . O sistema é montado de modo que o sinal observado seja aquele proveniente do centro da cubeta. A análise do sinal de fosforescência de oxigênio singleto, eventualmente formado no sistema estudado, foi feita em 1270nm.

A eficiência da geração de oxigênio singleto vem sendo estudada em sistemas modelos como a TPP, que é fotoquimicamente estável, solúvel em vários solventes, como benzeno, e que apresenta um valor de rendimento quântico (ϕ_Δ) de aproximadamente 0,6.

Nestes estudos fotoquímicos a TPP foi avaliada no solvente DMF, em que é bastante solúvel, e também incorporada em ASO. As intensidades dos sinais de fosforescência observados foram comparados com valores de ϕ_Δ da TPP em benzeno, conhecidos da literatura [57-58].

Primeiramente foi feito um espectro de absorção em 532nm da TPP dissolvida nos solventes, benzeno e DMF, e também incorporada em ASO.

Soluções de TPP/benzeno, TPP/DMF, TPP/ASO foram preparadas com absorção aproximada a 0,20, em 532nm. Cada solução foi colocada em uma cubeta de quartzo e colocada no compartimento de amostra a fim de ser submetida ao pulso do laser.

Todos os arquivos de intensidade de sinal gerado foram corrigidos contra o sinal gerado pelo sistema de detecção sem o sinal da amostra, com o diafragma do detector fechado. Assim, o sinal gerado é apenas a linha base do aparelho. O cálculo da correção é feito pelo programa que controla o sistema de fotólise de pulso.

Os experimentos foram realizados em diferentes potências do laser sendo, que para cada potência foram dados um número de pulsos entre 5 e 25, dependendo da intensidade do sinal gerado pela amostra e da relação sinal/ruído. Durante a análise dos dados o valor encontrado para intensidade do sinal foi dividido pelo número de pulsos. Os cálculos dos valores de I_a e I_p , foi montado uma planilha em Lotus-123, importando os dados dos arquivos em ASCII gerados pelo sistema de fotólise.

Cálculo do rendimento quântico [74]:

$$\phi_{\Delta} = a_2/a_1 \times f \times \phi_{\Delta}$$

$$f = \eta a_2^2 / \eta a_1^2$$

$$\phi_{\Delta a} = \text{inclinação da reta da amostra} / \text{inclinação da reta do padrão} \times f \times \phi_{\Delta a1}$$

ϕ_{Δ} = rendimento quântico de formação de oxigênio singleto

a_2 = amostra

a_1 = benzeno (padrão)

f = fator

η = índice de refração (amostra/padrão)

Os valores de intensidades obtidos foram apresentados nos gráficos em função da potência do laser, como mostram as Figuras 28-30.

Figura 28: Gráfico dos valores de intensidade do sinal de fosforescência de oxigênio singleto gerado para TPP em Benzeno, ($A_{532} = 0,2$) no modo ângulo reto.

Figura 29: Gráfico dos valores de intensidade do sinal de fosforescência de oxigênio singleto gerado para TPP em DMF, ($A_{532} = 0,2$) no modo ângulo reto.

Figura 30: Gráfico dos valores de intensidade do sinal de fosforescência de oxigênio singleto gerado para TPP em ASO, ($A_{532} = 0,2$) no modo ângulo reto.

A seguir são apresentados os valores de rendimento quântico para TPP nos solventes e nos lipossomos na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de ϕ_{Δ} para TPP em Solventes e no Lipossomo

Solvente/Lipossomo	ϕ_{Δ}	Método
Benzeno	0,6	FP = Fotólise de Pulso
Dimetilformamida (DMF)	0,3	FP
Asolecitina (ASO)	0,0005	FP

A TPP gerou mais oxigênio singleto em benzeno do que em DMF. Incorporada nos lipossomos de ASO não se observou nenhuma evidência do sinal de geração de oxigênio singleto. Isto pode ser devido ao espalhamento de luz e a possíveis efeitos de agregação da porfirina, devido à presença dos lipossomos. Também, as próprias vesículas de ASO podem estar consumindo o oxigênio singleto gerado.

Infelizmente, por motivos técnicos, durante boa parte do desenvolvimento de nossos estudos este sistema de fotólise esteve inoperante, não sendo possível realizar muitos dos experimentos programados. Sendo assim houve a necessidade de realizar os experimentos por um método de detecção indireto, ou seja, utilizando um supressor de oxigênio singleto [75], ou seja, utilizando com um supressor de oxigênio singleto [75], por exemplo, o rubreno (RB, figura 31).

4.3.2 - Verificação da Geração de Oxigênio Singleto Utilizando um Supressor de Oxigênio Singleto

Quando em presença de $^1\text{O}_2$ o rubreno (RB) é rapidamente oxidado a um peróxido, que pode ser monitorado pela diminuição da banda em 303 nm no seu espectro de absorção, (Figuras 32 e 33).

FIGURA 31 : Estrutura do Rubreno (RB)

A incorporação do RB ao lipossomo aniônico de asolecitina (ASO) foi realizada pela adição de 5 μL de uma solução de RB em DMF (7 μM) a 1 mL de uma solução aquosa de TPP (8 μM) incorporada em uma solução aquosa de ASO (1mM). A mistura foi homogeneizada e o espectro eletrônico registrado, até se estabilizar, isto é, até não se observar mais variações espectrais com o tempo. Todos os experimentos foram feitos na ausência de luz ambiente, pois o RB é rapidamente oxidado, mesmo em presença de pequena quantidade de $^1\text{O}_2$ formado.

Neste método, a eficiência de formação de $^1\text{O}_2$ é diretamente proporcional à velocidade de decoloramento do RB, como pode ser observado nas equações a seguir [76].

$$-\frac{d[RB]}{dt} = -\frac{dA}{dt} \frac{I}{\epsilon_{RB}l} = I_a \phi_{\Delta} \frac{k_r[RB]}{k_r[RB] + k_d}$$

$$-\left[\frac{dA}{dt}\right]^{-1} = \frac{I}{I_a \phi_{\Delta} \epsilon_{RB} l} + \frac{k_d}{k_r I_a \phi_{\Delta}} \frac{I}{A}$$

Nestas expressões, I_a é a intensidade da fonte de luz, k_r e k_d são as constantes de velocidade de desativação bimolecular (com o RB) e unimolecular, respectivamente, referentes ao 1O_2 .

Dessa forma, fazendo-se a derivada do gráfico ABS (em 303 nm) *versus* tempo (Figura 33, superior) e verificando-se a dependência do inverso da derivada com o inverso da ABS obtêm-se uma reta, cujo coeficiente linear é inversamente proporcional ao ϕ_{Δ} . Este então pode ser calculado e comparado com o de um padrão (por exemplo, TPP em DMF) utilizado nas mesmas condições experimentais.

FIGURA 32 : Espectros eletrônicos da solução TPP (8 μM) em DMF, contendo 0,7 μM de RB. Dentro, a variação da absorbância em 303 nm em função do tempo de irradiação.

FIGURA 33 : Espectros eletrônicos da TPP (8 μM) em solução aquosa contendo 1 mM de ASO e 0,7 μM de RB. Dentro, a variação da absorbância em 303 nm em função do tempo de irradiação.

Esse procedimento é bastante eficiente para soluções homogêneas, porém para meios lipossomais a função final observada não foi uma reta, mas sim uma curva semelhante a uma exponencial crescente, como mostra a Figura 34.

Figura 34 – Gráfico demonstrando o inverso da derivada versus inverso da absorbância em meio lipossomal (Figura 33).

Dois processos parecem estar ocorrendo simultaneamente neste caso. O primeiro é mais rápido, e deve corresponder à supressão do oxigênio singleto pelo RB contido no mesmo lipossomo que a porfirina. Porém, nessa concentração de ASO utilizada, devem existir também lipossomos (meio) que contenham somente RB e outros somente com porfirinas. Assim, nesta última situação, para que ocorra a peroxidação do RB, é necessário que o $^1\text{O}_2$ formado migre para outro lipossomo (meio). Como o tempo de vida desta espécie no meio extralipossomal é muito pequeno, isto inviabilizaria uma possível migração através da fase aquosa. Mas, se ocorrer uma colisão ou uma suficiente aproximação entre lipossomos contendo porfirinas e RB, poderia haver uma transferência de $^1\text{O}_2$ efetiva, resultando em oxidação do RB.

Esta segunda situação é um inconveniente neste tipo de estudo. Todavia, ela pode ser contornada assumindo-se somente os primeiros pontos de ΔABS (303 nm) do experimento, onde sua contribuição é menor e a curva apresenta uma certa linearidade. Futuramente, este inconveniente talvez possa ser minimizado com a utilização de soluções de ASO mais diluídas, ou com outra metodologia de preparação dos lipossomos, bem como o estudo com outros tipos de vesículas.

Além disso, os próprios lipossomos da ASO podem reagir com o oxigênio singlete formado, numa etapa competitiva com a reação do rubreno, embora se espere que a reação do rubreno seja muito mais rápida.

Considerando então apenas os primeiros pontos na Figura 34, para a curva relativa à TPP incorporada em ASO, e comparando-os à curva referente à TPP dissolvida em DMF, percebe-se que o coeficiente linear é praticamente o mesmo. Portanto, o rendimento quântico é bastante similar. A reatividade da TPP frente ao rubreno (geração de $^1\text{O}_2$) parece ser a mesma em ambos os meios (lipossomo e DMF).

5 - CONCLUSÕES e COMENTÁRIOS FINAIS

Em nossos estudos com a benzoporfirina monoácida (BPD) e a *meso*-tetrafenilporfirina (TPP) procuramos verificar se estas drogas reuniam algumas das propriedades imprescindíveis para seu uso como possíveis agentes fototerapêuticos.

Estas porfirinas mostraram ser estabilizadas, com alta solubilidade, em preparações lipossomais, tanto com ASO como com DODAB. Os resultados obtidos demonstraram que a absorbância medida é linear com a concentração, indicando, portanto, ótima solubilização de ambas as porfirinas, incorporadas em soluções aquosas de vesículas sintéticas catiônicas de DODAB e nos lipossomos aniônicos de ASO, na faixa de concentrações estudadas. Com DODAB, os resultados mostraram também pequena dependência de suas propriedades com o tamanho das vesículas. Variando-se o tamanho das vesículas de DODAB verificou-se que as bandas observadas e os respectivos valores dos coeficientes de absortividade molar da BPD foram maiores para vesículas pequenas.

Os valores determinados dos comprimentos de onda correspondentes a máximos de absorção e os respectivos coeficientes de absortividade molar para a TPP em solução de DMF, DODAB (vesículas pequenas), DODAB (vesículas grandes) e ASO, indicaram melhores resultados para o DMF, seguido do DODAB (vesículas pequenas), e para os lipossomos de ASO.

Resultados de emissão de fluorescência da TPP incorporada em soluções aquosas de vesículas catiônicas sintéticas de DODAB e em lipossomos aniônicos de ASO, com excitação em 540 nm, mostraram-se similares aos obtidos com DMF, comprovando a solubilização da droga (TPP) nas bicamadas lipossomais. Observou-se que com o aumento da concentração de TPP nas soluções lipossomais, aumenta também a intensidade de fluorescência emitida, numa relação linear, seguida de um efeito de saturação com concentrações maiores.

Resultados comparativos dos danos causados às vesículas de ASO, usadas como alvo, indicaram que tanto após tratamento fotoquímico como térmico a formação de espécies TBARS ou compostos carbonílicos (resultantes do ataque de radicais livres às bicamadas fosfolipídicas) foi discreta e praticamente a mesma, para as duas porfirinas (BPD e TPP). Portanto, estes resultados não foram indicativos da predominância de um mecanismo de reação através da geração de espécies radicalares (mecanismo tipo I), em ambos os casos.

Tentativas de medidas do oxigênio singleto, formado por tratamento fotoquímico da TPP em solução de DMF ou incorporada em ASO, não foram ainda conclusivas. Parece haver geração de $^1\text{O}_2$, mas estudos mais extensos devem ainda ser realizados. Experimentos usando rubreno como supressor mostraram que a reação é complexa, requerendo um maior controle da distribuição das drogas e do supressor entre as vesículas (dentro ou adsorvidas na superfície).

Novos experimentos deverão ser realizados, tanto por fotólise a laser, como por método indireto, com melhoria das condições de medida (diferentes diluições das fases lipossomais, uso de outros lipídios, variação da concentração da droga, variações da força iônica, com meios iônicos mais próximos do fisiológico, etc) para uma elucidação mais completa dos sistemas estudados.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bangham, A. D., Standish, M. M., Miller, N. (1965). Cation Permeability of Phospholipid Model Membranes: Effect of Narcotics. *Nature*, **208**, (5017), 1295-1297.
2. Bonventre, P. F, Gregoriadis, G, (1978). Killing of Intrafagocytic Staphylococcus Aureus by Dihydrostreptomycin Entrapped within Liposomes. *Antimicrob. Agents Chemother*, **13**, (6), 1049-1051.
3. Bangham, A. D, (1983). *Liposome Letters*, 421.
4. Lopez-Berestein, G, Bodey, G. P, Frankel, L. S, Metah, K. (1987). Treatment of Hepatosplenic Fungal Infections with Liposomal-Amphotericin B. *J. Clin. Oncol*, **5**, 310-317.
5. New, R. R. C, (1994) a) Introduction 1-32, Preparation of Liposomes, 33-104, In: New, R. R. C., ed. *Liposomes: A Practical Approach*, c) New, R. R. C, Black, C. D. V, Parker, R. J, Puri, A, Scherphof, G. L, Liposomes in Biological Systems, In: New, R. R. C., ed. *Liposomes: a practical approach*, 221-252.
6. Huang, C. H., Bangham, A., (1969), Studies on Phosphatidylcoline Vesicles. Formation and Physical Characteristics, *Biochemistry*, **8**, (1).
7. Cevc, G., e Marsh, D, (1987), Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models, *Wiley-Interscience Publication*, 442.
8. Bangham, A. D, De Gier, J, Greville, G. D, (1967). Osmotic Properties and Water Permeability of Phospholipid Liquid Crystals, *Chem. Phys. Lipids*, **1**, 225-246. 1967; New, R. R. C., 1994.
9. Jannegt, R, De Marie, S. Bakker-Woudenberg, I. A. J. M, Crommelin, D. J. A, (1992) Liposomal and Lipids Formulations of Amphotericin B. *Clin. Pharmacokinet* **23**(4), 279-291.
10. Woodle, M. C, Papahadjopoulos, D, (1997), Liposome Preparation and Size Characterization, *Biomembranes*, 431-455. 1997.
11. Wacker, M, Schubert, R, (1998), From Mixed Micelles to Liposomes: Critical Steps During Detergent Removal by Membrane Dialysis, *Int. J. Pharm*, **162**. 171-175.

12. Beaulac. C, Sachetelli. S, Lagace. J, (1998), In-Vitro Bactericidal Efficacy os sub-Mic Concentrations of Liposome-Encapsulated Antibiotic Against Gram-negative and Gram-positive Bacteria, *J. Antimicrob. Chemother*, **41**, 35-41.
13. Barenholz. Y, Amselem. S, Lichtenberg. D, (1979), A New Method for Preparation of Phospholipid Vesicles (Liposomes)- French press, *Febs Lett*, **99**(1), 210-214.
14. Batzri.S, Korn. E. D, (1973), Single Bilayer Liposomes Prepared without Sonication, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 1015-1019.
15. Deamer. D, Bangham. A. D, (1976), Large Volume Liposomes by na Ether Vaporization Method, *Biochim. Biophys. Acta*, **443**, 629-634.
16. Vitas. A. I, Díaz. R, Gamazo. C, (1996), Effect of Composition and Method of Preparation of Liposomes on their Stability and Interacyion with Murine Monocytes Infected with Brucella Abortus, *Antimicrob. Agents Chemother*, **40**(1), 146-151.
17. Kunitake. T, Okahata. Y, Tamaki. K, Kumamaru. F, Takayanagi. M, (1977), Formatin of the Membrane from a series of Quaternary Ammonium Salts, *Chem. Lett.* (4), 387-390.(1977).
18. Mortara. R. A, Quina. F. H, Chaimovich. H, (1978), Formation of Closed Vesicles from a Simple Phosphate Diester. Preparation and some Properties of Vesicles of Dihexadecylphosphate, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **81**(4), 1080-1086.
19. Carmona-Ribeiro. A. M, e Chaimovich. H, (1983), Preparation and Characterization of Large Dioctadecyldimethylammmmonium Chloride Liposomes and Comparison with Small Sonicated Vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, **733**, 172-179.
20. Carmona-Ribeiro. A. M, Yoshida. L. S, Chaimovich. H, (1985), Salt Effects on the Stability of Dioctadecyldimethylammmmonium Chloride and Sodium and Dihexadecylphosphate Vesicles, *J. Phys. Chem*, **89**, 2928-2933.
21. Carmona-Ribeiro. A. M, Midmore. B. R, (1992), Synthetic Bilayer Absorption onto Polystyrene Microspheres, *Langmuir*, **8**(3), 801-806.
22. Carmona-Ribeiro. A. M, (1993), Interactions between Charged Spheric Vesicles, *J. Phys. Chem*, **97**, 11843-11846.
23. Carmona-Ribeiro. A. M, (2000), Interactions between cationic and Drugs or Biomolecules, *An. Acad. Bras. Cienc.* **72**(1), 40-43.

24. a) Webb. M. S, Wheeler. J. J, Bally. M. B, Mayer. L. D, (1995), The Cationic Lipid Stearylamine Reduces the Permeability of the Cationic Drugs Verapamil and Prochlorperazine to Lipid Bilayers: Implications for Drug Delevery. *Biochim. Biophys. Acta*, **1238**, 147-155; b) Pourkavoos. N, (1992), Antimicrobial Activity of Cephaloridine in the Presence of Crude and Purified Preparations of Bacterial β -lactamases befor and after Liposome Encapsulation, *Int. J. Pharm*, **82**, 53-60.
25. a) Frimer. A. A, (1989) (Ed.); Singlet Oxigen, b) Wilkinson. F, Phillip Helman. W, Ross. A. B, (1995). *J. Phys. Chem*, **24**, 663. c) Ogilby. P. R, Foote. C. S, (1983) *J. Am. Chem. Soc*, **105**, 3423.
26. Parker. C. A, (1968). Photoluminescence of Solutions, *Elsevier Publishing*.
27. Atkins. P. W, (1994). *Physical Chemistry*, 5th ed.
28. Budavari. S, (1989). *The Merck Index*, Merck & Co. Inc.: EUA.
29. Stenberg. E.D, Dolphin. D, Bruckner. C, (1998). *Tetrahedron*, **54**, 4151.
30. Raab. O, (1900) *Z. Biol*, **39**, 524.
31. Bonnett. R, (1999). *Rev. Contemp. Pharmacother*, **10**, 1.
32. Von Tappeiner. H, (1903). *Muench. Med. Wochenschr*, **47**, 2024.
33. Policard. A, (1924). *C. R. Soc. Biol*, **91**, 1423.
34. Lipson. R.L, (1966). Em *Proceedings of the 9th International Cancer Congress*; Tokio, Japan.
35. Weishaupt. K. R, Gomer. C. J, Dougherty. T. J, (1976). *Cancer Res*, **36**, 2326.
36. Dougherty. T. J, Kaufman. J. E, Goldfarb. A, Weishaupt. K. R, Boyle. D, Mittleman. A, (1978). *Cancer Res*, **38**, 2628.
37. Dougherty. T.J, Mang. T.S, (1987). *Photochem. Photobiol*, **46**, 67.
38. Jori. G, (1997). *EPA Newsletter*, **60**, 12.
39. Perria. C, (1995). In Photodiagnostic and Phototherapeutic Techniques in Medicine; G. Jori e C. Perria, Eds., Documento Editoriale, Milano.
40. Hamblin. M. R, Newman. E. L, (1994). *J. Photochem. Photobiol*, **B23**, 3.
41. Aveline. B.M, Hasan. T, Redmond. R.W, (1995). *J. Photochem. Photobiol*, **B30**, 161.
42. <http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt>, acessada em Maio 2001.

43. <http://www.photofrin.com>, acessada em Junho 2001.
44. <http://www.dusapharma.com>, acessada em Julho 2001.
45. <http://www.visudyne.com>, acessada em Julho 2001.
46. Aveline. B.M, Hasan. T, Redmond. R.W, (1994). *J. Photochem. Photobiol*, **59**, 328.
47. <http://www.fda.gov/ceder>, acessada em Maio 2001.
48. <http://www.epm.br/ofta/fotodinamica>, acessada em Maio 2001.
49. Richter. A. M, Waterfield. E. A.K, Smits. C, Levy. J.G, (1993). *Photochem. Photobiol*, **57**, 1000.
50. <http://www.scotia-holdings.com>, acessada em Junho 2001.
51. Machado. A. E. H, (2000). *Quim. Nova*, **23**, 237.
52. Simplicio. F. I, Maionchi. F, Hioka. N, (2002) TFD: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. *Quim. Nova*, **25** (5), 801-807.
53. a) B. Allison, A.E. Waterfield. A. M. Richter and J. G. Levy (1991) The effects of plasma lipoproteins on in vitro tumor cell killing and in vivo tumor photosensitization with benzoporphyrin derivate. *Photochem. Photobiol.* **54**, 709-715; b) M. Kreimer- Birnbaum (1989) Modified porphyrins, chlorines, phthalocyanines, and purpurins: second-generation photosensitizers for photodynamic therapy. *Semin. Hematol.*, **26**, 157-173.
54. Toyama. M. M, Araki. K, and Toma. H. E. (1998). Absorption and Luminescence Spectra of Tetra (3-Pyridyl) Porphyrazine: A Convergent Spectroscopic Method for the Elucidation of Association Reactions in Solution. *Spectroscopy Letters*, **31**(5), 1065-1074.
55. Kremer. J. H, Esker. M. W, Pathmamanoharan. C, Wirsema. P. H, (1977). Vesicles of Variable Diameter Prepared by a Modified Injection Method. *Biochemistry*, **16**, 3932-3935.
56. Foote. C. S, Shook. F. C, Abakerl. R. B, (1984). Characterization of Singlet Oxygen, *Meth. Enzymol.* **105**, 36-47.
57. Taniellian. C, Wolff. C, (1995). Porphyrin – Sensitized Generation of Singlet Molecular Oxygen: Comparison of Steady – State and Time Resolved Methods. *J. Phys. Chem.* **99**, 9825 – 9830.

58. Wilkinson. F, and Brummer. J. G, (1981). Rate Constants for the Decay and Reactions of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Reference Data* **10** (4), 809 – 999.
59. Tsuruta. L.R, Quintilio. W, Costa. M. H. B, Carmona - Ribeiro. A. M, (1997) Interactions between Cationic Liposomes and an Antigenic Protein: The Physical Chemistry of the Immunoadjuvant Action. *J. Lipid Res.*, **38**, 2003-2011.
60. Schales. O, Schales. S. S. A, (1941). Simple and Accurate Method for the Determination Chloride in Biological Fluids. *J. Biol. Chem.*, **140**, 879-884.
61. Fendler. J. H, (1980). Surfactant Vesicles as Membrane Mimetic Agents: Chacterization an Utilization. *Acc. Chem. Res.*, **13**, 7-13.
62. Carmona – Ribeiro. A. M, Midmore. B. R, (1992). Synthetic Bilayer Adsorptio onto Polystyrene Micropheres. *Langmuir*, **8**, 801-806.
63. Carmona – Ribeiro. A. M, Vieira. D. B, (2001) Synthetic Bilayer Fragments for Solubilization of Amphotericin B. *Journal of Colloid and Interface Science*, **244**, 427-431.
64. Gelvan. D, Saltman. E. P, (1990). *Biochem. Biophys. Acta*, **1035**, 353-360.
65. Halliwell. B, Gutteridge. J. M. C, (1998). *Free Radicals in Biology and Medicine*, London, 228.
66. Gutteridge. J. M. C, (1982). *Int. J. Biochem*, **14**, 649-653.
67. G. Marx. G, Chevion. M, (1985) *Biochem. J.*, **236**, 397 – 400.
68. Krasnovskii Jr. A. A, Khachaturova. G. T, Bulgaru. V. V, Polyakova. L. A, Krichevskii. G. E, (1985). Luminescence of Singlet Molecular Oxygen. Quantum Yels of Photosensitization by Dyes. *Dok. Akad. Nauk SSSR*, **285**(3), 654-658.
69. Stewart. F, Bass. P, Star. W, (1998) What does Photodynamic Therapy have to offer Radiation Oncologists (or their cancer patients) *Radiotherapy and Oncology*, **48**, 233-248.
70. Richter. A. M, Kelly. B, Chow. J, Liu. D. J, Towwers. G. H. N, Dolphin. D, Levy. J. G, (1987) Prelinary Studies On A More Effective Phototoxic Agent Than Hematoporphyrin, *J. OfThe National Cancer Institute*, **79**, (6), 1327-1332.

71. Kagawa. Y†, Efraim. R, (1966), Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation, *The Journal of Biological Chemistry*, **241**(10), 2467-2474.
72. C. L. Hawkins e M. J. Davies (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1360**, 84-96.
73. R. L. Levine, J. A. Williams, E.R. Stadatman, E. Shacter (1994) *Methods Enzymology*, **233**, 346.
74. Rodgers. A. J, (1987), Singlet Oxygen Quantum Yelds, *ACS Symposium Series*, **5**, (339), 76-97.
75. Nonell. S, Braslavsky†. S. E, Schaffner. K, (1990) Quantum Yeld of Production of Singlet Molecular Oxygen () in Aqueous Dispersions of SmallUnilamellar Lipid Vesicles. A Time-Resolved Near-IR Phosphorescence Study. *Photochem. Photobiol.* **51** (5), 551-556.
76. Valduga. G, Nonell. S, Reddi. E, Jori. G, Braslavsky. S. E, (1988) The Production Singlet Molecular Oxygen by Zinc (II) Phthalocyanine in Ethanol and in Unilamellar Vesicles. Chemical Quenching and Phosphorescence Studies. *Photochem. Photobiol.* **48** (1) 1-5.