

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E
BIOLOGIA

Estudos comparativos do processo de fototransformação da Protoporfirina IX sintética e endógena em soluções homogêneas e na presença de estruturas biomiméticas naturais e sintéticas.

FERNANDO SILVA PENA

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

Ano 2013

FERNANDO SILVA PENA

Estudos comparativos do processo de fototransformação da Protoporfirina IX sintética e endógena em soluções homogêneas e na presença de estruturas biomiméticas naturais e sintéticas.

ORIENTAÇÃO: PROF. DOUTOR IOURI BORISSEVITCH

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Área de concentração: Fotobiofísica

RIBEIRÃO PRETO – SP

Ano 2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Nome: Pena, Fernando Silva

Titulo: Estudos comparativos do processo de fototransformação da Protoporfirina IX sintética e endógena em soluções homogêneas e na presença de estruturas biomiméticas naturais e sintéticas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação a minha família por todo apoio e carinho, principalmente a minha esposa Edith pelo suporte nos momentos difíceis além de todo amor e compreensão.

Agradecimentos

Ao professor Iouri, por toda dedicação e atenção na orientação deste trabalho e pela amizade que se formou durante esse tempo trabalhando juntos.

Aos amigos sempre presentes nas horas de dificuldade e nas horas de felicidades, compartilhando bons momentos juntos.

A Família por ter proporcionado a educação necessária para chegar até aqui, por todo o carinho e amor.

Ao Departamento de Física, a USP e aos órgãos fomentadores: Capes, CNPq e Fapesp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Aplicação do FS para TFD, (1) aplicação do FS, (2) acúmulo de FS no tumor após intervalo de tempo, (3) irradiação do local a ser tratado e (4) organismo sem tumor após TFD. -----29
- Figura 2.** Diagrama mostrando os mecanismos de ação do tipo I e II que ocorrem na TFD, assim como os processos envolvidos.-----32
- Figura 3.** Representação estrutural do anel porfirínico.-----34
- Figura 4.** Representação estrutural da PpIX. -----35
- Figura 5.** Disposição geométrica dos agregados tipo H e J e HJ.-----37
- Figura 6.** Representação estrutural tridimensional da membrana plasmática.-----39
- Figura 7.** Ilustração de moléculas de surfactantes anfifílicos, sendo (A) surfactantes e (B) micela.-----40
- Figura 8.** Representação esquemática da estrutura micelar, indicando as três regiões que a compõe, região interna (a), região externa (b) e região intermediária (c).-----41
- Figura 9.** Esquema óptico dos principais componentes do espectrofotômetro. As letras representam: (a) fonte de luz, (b) colimador, (c) prisma ou rede de difração, (d) fenda seletora de, (e) compartimento de amostras com cubeta contendo solução, (f) detector, (g) amplificador .-----47
- Figura 10.** (1). Fonte da luz de análise (lâmpada ou laser); (2) e (4) sistemas óticos; (3) amostra; (5) monocromador; (6) fotomultiplicador; (7) fonte de alta tensão; (8) registrador (osciloscópio digital); (9) analisador (computador); (10) fonte de corrente; (11) fonte de pulsos de luz de excitação (laser); (12) fonte de potência para pulsos de excitação.-----51
- Figura 11.** Esquema representativo para determinação da variação de absorção no comprimento de onda de análise.-----51

- Figura 12.** Espectros normalizados de absorção da PpIX sintética em solução de Acetona, ACN+DMSO (3:1) e tampão fosfato.-----54
- Figura 13.** Espectro normalizado de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) e tampão fosfato.-----55
- Figura 14.** Espectro normalizado de absorção da PpIX sintética e endógena em soluções não aquosas.-----56
- Figura 15.** Espectro normalizados de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=402\text{nm}$ da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) e em solução tampão fosfato.-----57
- Figura 16.** Espectro normalizado de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=402\text{nm}$ da PpIX sintética em solução de ACN +DMSO e tampão fosfato.-----57
- Figura 17.** Espectro normalizado de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=402\text{nm}$ da PpIX endógena e sintética em solução de ACN+DMSO (3:1).-----58
- Figura 18.** Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de tampão e ACN+DMSO (3:1) com a excitação em $\lambda=402\text{nm}$ corrigida por absorbância.-----58
- Figura 19.** Espectro normalizado de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=503\text{nm}$, 537nm e 576nm da PpIX endógena e sintética em solução de ACN+DMSO(3:1).-----59
- Figura 20.** Espectro normalizado de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=503\text{nm}$, 537nm e 576nm da PpIX endógena e sintética em solução de tampão.-----59
- Figura 21.** Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de CTAB em diferentes concentrações.-----61
- Figura 22.** Espectro de absorção da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de CTAB em diferentes concentrações.-----61
- Figura 23.** Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de HPS em diferentes concentrações.-----63
- Figura 24.** Espectro de absorção da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de HPS em diferentes concentrações.-----63

Figura 25. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de SDS em diferentes concentrações.-----64

Figura 26. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de SDS em diferentes concentrações.-----64

Figura 27. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de TRITON-X100 em diferentes concentrações.-----65

Figura 28. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de TRITON-X100 em diferentes concentrações.-----65

Figura 29. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de Albumina de soro bovino em diferentes concentrações.-----66

Figura 30. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de Albumina de soro bovino em diferentes concentrações.-----66

Figura 31. Espectro de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de HPS em diferentes concentrações.-----68

Figura 32. Espectro de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de HPS em diferentes concentrações.-----68

Figura 33. Espectro de emissão de fluorescência excitado em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de SDS em diferentes concentrações.-----69

Figura 34. Espectro de emissão de fluorescência excitado em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de SDS em diferentes concentrações.-----69

Figura 35. Espectro de emissão de fluorescência excitado em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de Albumina de soro bovino em diferentes concentrações.-----70

Figura 36. Espectro de emissão de fluorescência excitado em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de Albumina de soro bovino em diferentes concentrações.-----70

Figura 37. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para CTAB e PpIX endógena.-----72

Figura 38. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para CTAB e PpIX sintética em solução tampão fosfato.-----73

Figura 39. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para HPS em PpIX endógena em solução tampão fosfato.-----73

Figura 40. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para HPS em PpIX sintética em solução tampão fosfato.-----74

Figura 41 Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para SDS em PpIX endógena em solução tampão fosfato. -----74

Figura 42. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para SDS em PpIX sintética em solução tampão fosfato.-----75

Figura 43. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para TRITON-X100 em PpIX endógena em solução tampão fosfato.-----75

Figura 44. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para TRITON-X100 em PpIX sintética em solução tampão fosfato.-----76

Figura 45. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para albumina de soro bovino em PpIX endógena em solução tampão fosfato.-----76

Figura 46. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para albumina de soro bovino em PpIX sintética em solução tampão fosfato.-----77

Figura 47. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) irradiado por 15, 30 e 60 minutos.-----79

Figura 48. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) irradiado por 15, 30 e 60 minutos.-----80

Figura 49. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de acetona irradiado por 15, 30 e 45 minutos.-----80

Figura 50. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão irradiado por 15, 30, 45 e 120 minutos.-----81

Figura 51. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão irradiado por 15, 60, 120 e 180 minutos.-----81

Figura 52. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de acetona e tampão com excitação em $\lambda=670\text{nm}$ irradiado por 45 e 90 minutos.-----83

Figura 53. Espectro de excitação da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) com emissão em $\lambda=675\text{nm}$ irradiado por 15, 30, 45,90 e 135 minutos.-----84

Figura 54. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 15, 30 e 60 minutos.-----85

Figura 55. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de acetona com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 45 e 90 minutos.-----85

Figura 56. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de tampão com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 45 e 90 minutos.-----86

Figura 57. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 15, 30 e 45 minutos.-----86

Figura 58. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de tampão com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 60, 120 e 180 minutos.-----87

Figura 59. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de micelas de CTAB (2mM) irradiado por 60, 120, 180 e 240 minutos.-----88

Figura 60. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de micelas de CTAB (2mM) irradiado por 60, 120, 180 e 240 minutos.-----89

Figura 61. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de micelas de HPS (400uM) irradiado por 60, 120, 180 e 240 minutos.-----89

Figura 62. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de micelas de HPS (400uM) irradiado por 60, 120, 180 e 240 minutos.-----90

Figura 63. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de micelas de SDS (40mM) irradiado por 120, 240 e 360 minutos.-----90

Figura 64. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de micelas de SDS (40mM) irradiado por 60, 120, 180, 240 e 360 minutos.-----91

Figura 65. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de micelas de TRITON-X100 (2mM) irradiado por 60, 120, 180, e 240 minutos.-----91

Figura 66. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de micelas de TRITON-X100 (3,5mM) irradiado por 60, 120, 180, e 240 minutos.-----92

Figura 67. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de ASB (5mM) irradiado por 60, 120, 180, e 240 minutos.-----92

Figura 68. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de ASB (5mM) irradiado por 60, 120, e 180 minutos.-----93

Figura 69. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de CTAB (2mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos.-----94

Figura 70. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de CTAB (2mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 120, 240, e 360 minutos.-----95

Figura 71. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de HPS (400uM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 60, 120 e 300 minutos.-----95

Figura 72. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução tampão na presença de micelas de HPS (400uM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 120, 180, 300 e 420 minutos.-----96

Figura 73. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de SDS (40mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 120, 240 e 360 minutos.-----96

Figura 74. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução tampão na presença de micelas de SDS (40mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 120, 240 e 360 minutos.-----97

Figura 75. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de TRITON-X100 (2mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 120, 240 e 360 minutos.-----97

Figura 76. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução tampão na presença de micelas de TRITON-X100 (3,5mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 120, 240 e 360 minutos.-----98

Figura 77. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de ASB (5mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 60, 120, 180, 240 e 300 minutos.-----98

Figura 78. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução tampão na presença de micelas de ASB (5mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos.-----99

Figura 79. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de ar, irradiado por 30 e 45min.-----101

Figura 80. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença e ausência de O₂, irradiado por 15, 30 e 45min.-----101

Figura 81. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença e ausência de O₂, irradiado por 15, 30 e 45min.-----102

Figura 82. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de ar, irradiado por 45, 90 e 135min.-----102

Figura 83. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença e ausência de O₂, irradiado por 45, 90 e 135min.-----103

Figura 84. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de ar e excitação em $\lambda=570\text{nm}$ irradiado por 30 e 45 minutos.-----104

Figura 85. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na ausência de O₂ e excitação em $\lambda=570\text{nm}$ irradiado por 15, 30 e 45 minutos.-----105

Figura 86. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de ar e excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 45, 90 e 135 minutos.-----105

Figura 87. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) na ausência O₂ e excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 45, 90 e 135 minutos.-----106

Figura 88. Curva de decaimento da absorção em $\lambda=470\text{nm}$ do tripleto da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) com adição de O₂ e seu respectivo ajuste mono-exponencial.-----108

Figura 89. Curva de decaimento da absorção em $\lambda=470\text{nm}$ do tripleto da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença do ar e seu respectivo ajuste mono-exponencial.-----108

Figura 90. Curva de decaimento da absorção em $\lambda=470\text{nm}$ do tripleto da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na ausência de O₂ e seu respectivo ajuste mono-exponencial.-----109

Figura 91. Curva cinética de formação e de decaimento do oxigênio singlete, em amostra de PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1), e seu respectivo ajuste.-----110

LISTA DE SIGLAS

TFD	Terapia fotodinâmica
<i>PDT</i>	<i>Photodynamic therapy</i>
FS	Fotossensibilizador
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
DF	Diagnóstico por fluorescência
PDD	<i>Photodynamic diagnosis</i>
PpIX	Protoporfirina IX
ALA	Ácido aminolevulínico
DMSO	Dimetilsulfóxido
ACN	Acetonitrilo.
EROs	Espécie reativa do oxigênio
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
DHP	Hematoporfirina
CIS	Cruzamento intersistemas
FPp	Fotoprotoporfirina
cmc	Concentração micelar crítica
ASB	Albumina de soro bovino
BSA	Bovine serum albumine
ASH	Albumina de soro humano
SDS	Dodecil sulfato de sódio
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
HPS	N-hexadecil-N, N, dimetil-3-3 amônio-1-propano sulfonado
Triton X-100	4-1,1,3,3-tetrametilbutifenil-polietileno glicol
FM	Fosfato monobásico

FD	Fosfato Dibásico
NaOH	Hidróxido de sódio
HCl	Ácido clorídrico
UV	Ultra violeta

Sumário

Resumo	21
Abstract	23
1. Introdução	25
2. Objetivo	28
3. Fundamentação Teórica	28
3.1 Terapia Fotodinâmica	28
3.2 História	30
3.3 Mecanismos de ação	31
3.4 Fotossensibilizadores (FS)	33
3.5 Porfirinas	33
3.6 Protoporfirina IX	34
3.7 Fotoprodutos	35
3.8 Glândula de Harder	36
3.9 Agregados moleculares	37
3.10 Membranas Biológicas e meios Biomiméticos	38
3.10.1 Estrutura de membrana celular	38
3.10.2 Micelas	40
3.10.3 Albumina	41
4. Materiais e métodos	42
4.1 Materiais	42

4.1.1	Protoporfirina IX sintética -----	42
4.1.2	Protoporfirina endógena -----	42
4.1.3	Tensoativos -----	43
4.1.4	Albumina -----	43
4.2	Preparação das amostras -----	44
4.2.1	Tampão fosfato -----	44
4.2.2	PpIX sintética -----	44
4.2.3	PpIX endógena -----	44
4.2.4	Surfactantes -----	45
4.2.5	Albumina -----	45
4.2.6	Fototransformação -----	46
4.3	Técnicas experimentais -----	46
4.3.1	Espectroscopia de absorção ótica -----	46
4.3.2	Espectroscopia de fluorescência -----	48
4.3.3	Flash fotólise -----	49
5.	Resultados e Discussão -----	53
5.1	Espectros óticos da PpIX endógena e sintética em meios não aquoso e aquoso -----	53
5.2	Espectros óticos da PpIX endógena e sintética em meio aquoso na presença de surfactantes e albumina -----	61
5.3	Fototransformação da PpIX endógena e sintética em meios homogêneos não aquoso e aquoso -----	79

5.4	Fototransformação da PpIX endógena e sintética na presença de estruturas biomiméticas -----	88
5.5	Efeito do oxigênio na fototransformação da PpIX endógena e sintética em meio homogêneo -----	100
6.	Conclusão -----	111
6.1	Perspectivas futuras-----	114
7.	Referências Bibliográficas -----	115

Resumo

Neste trabalho realizou-se estudos comparativos da fototransformação da protoporfirina IX (PpIX) sintética e endógena, extraída de glândulas Harderianas dos ratos da espécie *Rattus Novergicus Albinus*, quando irradiada pela luz visível. A fototransformação foi analisada através de monitoramento dos espectros de absorção ótica e de fluorescência em soluções aquosas homogêneas de tampão fosfato e na presença de micelas e albumina de soro bovino (ASB) e em soluções não aquosas de Acetonitrila e Dimetilsulfóxido na proporção 3:1 e em acetona, todos na presença e ausência de oxigênio. Além disso, foram obtidos através de técnica de flash fotólise as curvas cinéticas da absorção do Triplete da PpIX e da fosforescência do oxigênio singleto.

Observamos que sob ação de luz visível, a PpIX sofre fototransformação cujas características dependem tanto da natureza da PpIX quanto do ambiente onde a PpIX se encontra. Devido a sua alta hidrofobicidade a PpIX sintética em solução aquosa está presente em forma de agregados o que diminui a velocidade da sua fototransformação. Já a PpIX endógena, quando em soluções aquosas, não sofre agregação, pois continua ligada com algumas estruturas biológicas de natureza anfifílica, que sobraram após sua extração de glândulas, e sua velocidade de fototransformação é elevada. A ligação com essas estruturas aumenta a afinidade da PpIX endógena com micelas e dificulta sua ligação com a ASB. Os processos de fototransformação de ambas as PpIX na interação com as micelas, com ASB e em tecidos glandulares *in vivo* são semelhantes. Isso mostra que o processo de fototransformação em meio micelar e na interação com ASB modela com sucesso o processo dentro de tecidos.

Baseando-se nos fatos que a taxa de fototransformação da PpIX aumenta na presença do oxigênio e que foi observada a formação do oxigênio singleto pela transferência de energia do estado triplete da PpIX para o oxigênio molecular, podemos dizer que o mecanismo tipo II contribui na fototransformação da PpIX e esse mecanismo é responsável pela formação de fotoproduto, caracterizado pelos novos picos nos espectros de absorção ótica

e de fluorescência. Entretanto, a existência de fototransformação da PpIX na ausência do oxigênio mostra a participação de outros mecanismos de fototransformação.

Abstract

In this work we carried out comparative studies of phototransformation of protoporphyrin IX (PpIX) both synthetic and endogenous, extracted from the Harderian glands of the *Rattus Novergicus Albinus*, when irradiated by visible light. The phototransformation was analyzed by monitoring the PpIX optical absorption and fluorescence spectra in homogeneous aqueous solution (phosphate buffer) and in the presence of bovine serum albumin (BSA), micelles, formed from different surfactants, in non-aqueous acetonitrile and dimethyl sulfoxide 3:1 solutions, and in acetone, both in the presence and absence of oxygen. Besides, the kinetic curves of the PpIX Triplet state absorption and the singlet oxygen phosphorescence were obtained using the flash photolysis technique.

It was observed that when irradiated with visible light PpIX suffers phototransformation with characteristics depending on its nature and on the environment. Due to high hydrophobicity the synthetic PpIX forms aggregates, which reduces its phototransformation rate, while the endogenous PpIX is not aggregated due to its interaction with the residues of some biological amphiphilic structures, which continue after its extraction from glands, and its phototransformation rate is elevated. Besides, the interaction with these structures increases the endogenous porphyrin affinity with micelles and reduces that with BSA. The characteristics of both PpIX phototransformation in micellar media, at the interaction with BSA and in the gland tissues *in vivo* are similar. This demonstrates that the phototransformation process in micellar media and at the interaction with BSA may successfully simulate the process in the tissue.

Basing on the facts that the phototransformation rate increases in the presence of molecular oxygen and that the singlet oxygen formation due to energy transfer from the PpIX triplet state to oxygen was observed we can conclude that the type II mechanism contributes on the PpIX

phototransformation and is responsible on the formation of a photoproduct with observed new optical absorption and fluorescence peaks. At the same time, the PpIX phototransformation in the oxygen absence shows the participation of other mechanisms on the PpIX phototransformation.

1. Introdução.

A terapia fotodinâmica (TFD) vem do termo em inglês *photodynamic therapy (PDT)* e vem sendo utilizado como alternativa aos tratamentos tradicionais de combate ao câncer.

Os principais métodos utilizados hoje em dia para o tratamento de neoplasias são a cirurgia, quimioterapia e radioterapia. A cirurgia, sendo uma técnica invasiva é a retirada do tumor, dilacerando assim o corpo do paciente, podendo causar sérios problemas psíquicos, como baixa autoestima. A quimioterapia e radioterapia são técnicas não localizadas, causando assim muitos efeitos colaterais como a diminuição da resistência do organismo, podendo causar outras mutações gênicas estimulando a criação de tecidos neoplásicos; vômito, cansaço, falta de apetite, reações na pele, além de não poder ser utilizadas repetidas vezes devido à acumulação dos efeitos negativos de cada tratamento [1].

Já a TFD por ser um método não invasivo, de alto grau de seletividade, baixa toxicidade ao organismo; não apresentando nenhum efeito colateral inevitável e podendo ser utilizada quantas vezes necessárias, torna-se uma ferramenta eficiente e cuidadosa no tratamento de tumores.

Apesar das vantagens da TFD, ela possui algumas limitações. A necessidade de utilizar a luz de região espectral visível para a ativação de agentes fotoativos (fotossensibilizadores, FS), torna sua penetração de baixa profundidade, cerca de 2 mm para comprimentos de onda $\lambda \approx 400\text{nm}$ até $\approx 2\text{cm}$ para $\lambda \approx 600\text{nm}$, dependendo do tipo de tecido irradiado. Tornando necessária a utilização, nesse tipo de tratamento, de luz na região espectral $\lambda \geq 600\text{nm}$, chamada “janela terapêutica”, onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes.

Além do uso para tratamento de câncer, a TFD tem sido utilizada para tratamento de periodontite crônica [2]; em infecções virais como a AIDS [3] e psoríase [4].

Devido à sua localização preferencial na região do tumor, fotossensibilizadores que possuem a fluorescência, podem ser utilizados com sucesso para diagnosticar e localizar tumores, através da técnica chamada de diagnóstico por fluorescência (DF) ou *photodynamic diagnosis* (PDD) [5].

Devido à precisa definição das fronteiras de tumor, a DF é utilizada no tratamento de câncer juntamente com a cirurgia, eliminando a extração desnecessária de tecido como é comum neste procedimento, já que o tumor tem por característica ser amorfo; o procedimento padrão é sempre retirar uma área maior que o necessário a fim de não permanecer nenhum resto de tecido tumoral. Com a DF pode reduzir-se esse dano possibilitando a retirada apenas do tecido afetado.

Um problema sério na utilização da TFD é a determinação do grau de destruição do tecido em tratamento, em função do tempo de irradiação e da concentração de FS, para assim se determinar uma dose adequada de irradiação a ser utilizada em tratamento. O método da análise deve ser preferencialmente não invasivo e funcionar em tempo real durante o tratamento.

Ao ser irradiado, o FS pode sofrer transformação, gerando fotoprodutos que podem apresentar toxicidade no escuro, prejudicando o organismo do paciente [6]. Além disso, a fototransformação diminui a concentração de FS no tumor, diminuindo assim a eficiência do tratamento. Por outro lado, produtos formados podem ser fototóxicos o que pode aumentar a eficiência do processo.

A fototransformação acontece em paralelo com o processo de destruição do tumor. Por isso, a determinação do grau de fototransformação do FS no processo de tratamento poderia ser utilizada para determinar o grau da destruição do tumor.

Geralmente, a fototransformação do FS está acompanhada por mudanças de suas características espectroscópicas, tais como os espectros de absorvância e de fluorescência. Desse ponto de vista, os estudos das mudanças das características espectrais do FS durante sua fototransformação possuem um

interesse especial, pois essas mudanças poderiam ser usadas como testes do grau de fototransformação do FS e conseqüentemente, como testes do grau de destruição do tecido durante a aplicação de luz em TFD. Entre os métodos espectroscópicos a fluorescência possui certas vantagens, sendo um método não invasivo, de alta sensibilidade e fácil aplicação durante o processo de tratamento, obtendo informações em tempo real.

O processo de fototransformação do FS depende das características físico-químicas do ambiente em que ele se encontra. Por isso, seria mais certo realizar seus estudos diretamente dentro do tecido. Entretanto, a realização dos estudos durante o processo de tratamento de um paciente não é adequado nem de ponto de vista técnico nem ético. Sendo, portanto, necessário realizar esses estudos usando animais com tumores artificiais ou utilizando alguns sistemas que mimetizam a estrutura de tecidos.

Os compostos mais utilizados em TFD são as porfirinas, devido à sua fotoatividade, fotoestabilidade, estabilidade química e alta absorção na região espectral do visível e do infravermelho próximo, além de sua alta afinidade com tecidos tumorais. Dentre as porfirinas a protoporfirina IX (PpIX) tem destaque para ser aplicada em TFD por ser um composto nativo do organismo, responsável por funções vitais de organismos aeróbicos. Além disso, nos últimos anos foi desenvolvida uma forma TFD, baseada na introdução no organismo do paciente de ácido aminolevulínico (ALA), que estimula a superprodução da PpIX dentro de tecido tumoral [7].

A PpIX tem um espectro de fluorescência, cujo perfil possui mudanças características durante sua fototransformação. Além disso, existem alguns animais como os ratos da espécie *Rattus Novergicus Albinus* que são capazes de sintetizar e armazenar grande quantidade de PpIX em suas glândulas harderianas [8].

Recentemente, foi mostrada a correlação entre o grau das mudanças sob a irradiação luminosa do perfil do espectro de fluorescência da PpIX, obtidos

diretamente do tecido de glândulas harderiana de ratos, e grau de destruição do tecido glandular [8].

Por esses motivos, existe um interesse especial nos estudos mais detalhados das características espectroscópicas da PpIX e suas mudanças durante sua fototransformação, tanto dentro do tecidos biológico natural, quanto dentro de sistemas modelos.

2. Objetivo

Neste trabalho tem-se como objetivo a realização de estudos comparativos de fototransformação da PpIX endógena, tirada da glândula harderiana dos ratos da espécie *Rattus Novergicus Albinus*, e sintética; irradiadas com luz na faixa espectral do visível em soluções homogêneas (tampão fosfato e solvente orgânico Acetonitrila e DMSO na proporção 3:1) e na presença de estruturas biomiméticas naturais (albumina de soro bovino) e sintéticas (micelas formadas de surfactantes com diferentes estados de carga e estruturas) visando monitorar a evolução do efeito fotodinâmico, através das técnicas de absorção óptica, de fluorescência e de flash fotólise.

3. Fundamentação Teórica.

3.1 Terapia Fotodinâmica.

O mecanismo da TFD está baseado no efeito fotodinâmico, que inclui a interação entre o FS, luz na região visível ou infravermelho próximo e oxigênio molecular, produzindo as espécies reativas de oxigênio (EROs, *reactive oxygen species*, ROS) [GLOSSARY OF TERMS USED IN PHOTOCHEMISTRY 3rd EDITION]. Os EROs iniciam sequências de reações, que destroem por necrose ou

apoptose às células de tecidos tumorais, alguns tipos de bactérias, vírus ou fungos que provocam doenças de pele [2;3;4]. Além da sua ação direta, a TFD pode produzir efeitos indiretos, estimulando o sistema imunológico do paciente, possibilitando uma resposta natural do organismo a outras células cancerígenas presentes no organismo; ou causando danos diretos às células endoteliais da vasculatura tumoral, bloqueando assim a passagem de oxigênio e nutrientes para as células tumorais ocasionando a estagnação ou diminuindo o crescimento do tumor, podendo até mesmo causar sua morte [9].

A aplicação do FS se dá por via oral, intravenosa ou aplicação tópica. Após um determinado tempo, o FS alcança sua concentração máxima nas células doentes sendo então irradiado com luz visível de comprimento de onda adequado ao FS utilizado, como ilustrado na Figura 1. O tempo de espera, entre a aplicação de FS e a irradiação, depende do FS utilizado e do local a ser tratado.

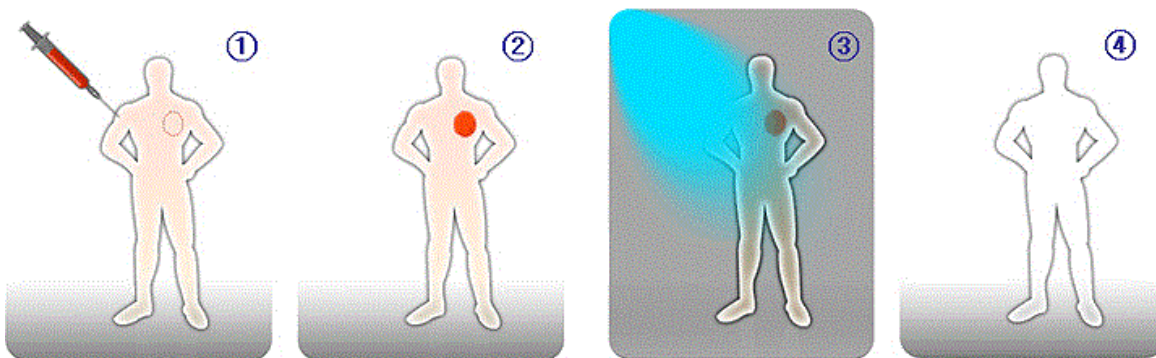


Figura 1. Aplicação do FS para TFD; (1) aplicação do FS, (2) acúmulo de FS no tumor após intervalo de tempo, (3) irradiação do local a ser tratado e (4) organismo sem tumor após TFD.

3.2. História

Há registros de TFD no livro *Eber Papiros* do antigo Egito datado em torno de 1550 A.C (10), onde se utilizava extrato de plantas via aplicação cutânea para o tratamento de doenças na pele. Também se tem registros no livro Indiano Atharva Veda de 1500 A.C onde se utilizava sementes de uma determinada planta seguida de exposição ao sol. Já no século X e XIII temos referências Chinesas e Indianas da utilização de plantas e sementes para o tratamento de vitiligo. [11]

Porém, apenas em 1900, Raab observou que ao expor microrganismos na presença de um corante (derivado de acridine) à luz solar e na presença de oxigênio, fez com que esses morressem, embora permanecessem vivos no escuro [12]. F. Meyer-Betz foi o primeiro a estudar a hematoporfirina, derivado de porfirina, ele auto-injetou a substância expondo-se à luz solar, causando-lhe edemas e hiperpigmentação, confirmando a fotossensibilidade das porfirinas.

Em 1924, A. Policard observou que a hematoporfirina apresentava uma coloração vermelha quando irradiada com luz ultravioleta, ao realizar mais teste descobriu que o FS se acumulava em tecidos tumorais mais do que em saudáveis, podendo assim ser utilizado também como diagnóstico, descobrindo uma nova finalidade para os FS [13].

Em 1978, com os trabalhos do Dr. Thomas J. Dougherty, que obteve resultados positivos ao tratar uma serie de pacientes com câncer, utilizando derivados de porfirina. Isso fez com que a TFD fosse reconhecida como um tratamento efetivo contra o câncer [14].

Derivados oligoméricos de hematoporfirina (DHP), uma mistura oligomérica de ésteres e éteres, são chamados de primeira geração de FS composto por três produtos vendidos no mercado; Photofrin, aprovado nos EUA em 1994, Photogem aprovado na Rússia em 1990 e Photosan aprovado na Europa em 2002. Esses FS apesar de eficientes apresentam grande retenção pelos tecidos saudáveis, o que

causa fotossensibilização cutânea do paciente. Assim a procura por novos FS, mais eficientes e com menor dano ao paciente, tem sido grande e gerado frutos preciosos para a TFD. Algumas das substâncias pesquisadas além das Porfirinas são Clorinas, Bacterioclorinas e Ftalocianinas [11]. Entre essas, a aplicação de PpIX e ALA possuem boas vantagens.

3.3. Mecanismos de ação.

O FS na presença do oxigênio molecular ao ser irradiado com luz de comprimento de onda adequado absorve fótons, iniciando uma série de reações que causam a morte da célula. Este processo pode ocorrer através de dois mecanismos como é representado na Figura 2.

O FS, no estado fundamental singleto (S_0), ao ser irradiado pode passar para o estado excitado singleto (S_1), podendo voltar ao estado fundamental emitindo fluorescência, a qual pode ser usada para diagnóstico de tumores por fluorescência, ou transformar sua energia em calor pelos processos de conversão interna (CI) e em consequência da relaxação vibracional. Por outro lado, a molécula nesse estado pode reagir com alguns sistemas da célula, gerando íons-radicaís que reagem com o oxigênio molecular formando EROs e dando assim origem a reações do Tipo I.

Outra possibilidade é o FS no estado excitado (S_1) sofrer transição para o estado excitado tripleto (T_1) através de cruzamento intersistemas (CIS), neste estado o FS excitado (T_1) pode também sofrer reações do Tipo I, gerando EROs através de transferência de elétrons, pode voltar ao estado fundamental singleto emitindo fosforescência ou ainda por processos CIS e relaxação vibracional. Além disso, o FS no estado excitado T_1 pode transferir energia para o oxigênio molecular, cujo estado fundamental é tripleto, formando oxigênio singleto, que é

uma espécie altamente reativa que inicia diversas reações com alvos biológicos induzindo a morte da célula (mecanismo do Tipo II).

Estudos concluem a grande importância e dependência do oxigênio no tratamento de tumor por TFD, já que o oxigênio singlete é o principal responsável pela morte celular através de reações do Tipo II [15]. Estudos mostram que a porcentagem de ocorrência do mecanismo do Tipo II é em torno de 90%, enquanto, que a ocorrência de mecanismos do Tipo I é em torno de 10% [16].

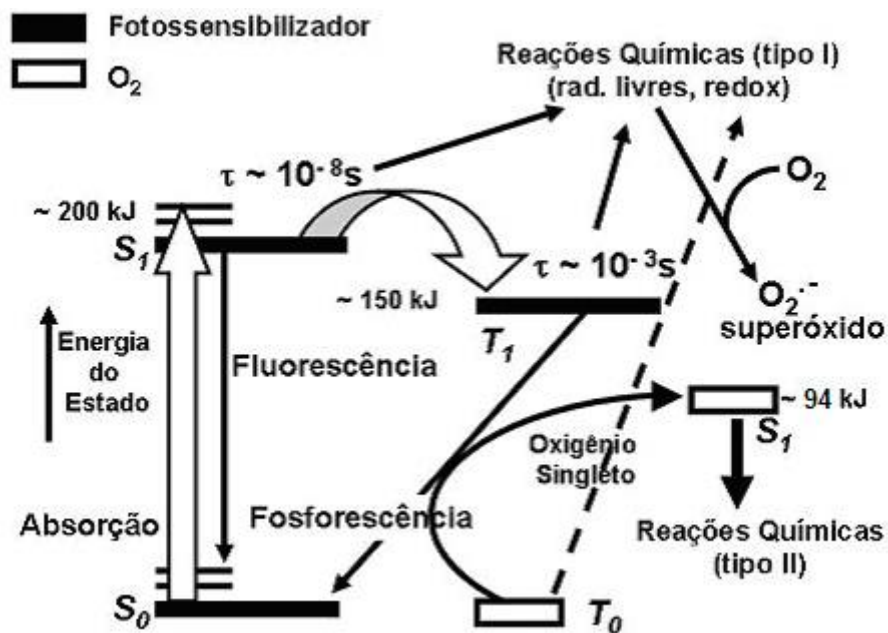


Figura 2. Diagrama mostrando os mecanismos de ação do Tipo I e II que ocorrem na TFD, assim como os processos envolvidos.

3.4 Fotossensibilizadores (FS).

Fotossensibilizador em TFD é uma substância sensível à luz, que quando irradiado na presença do oxigênio inicia uma série de reações físico-químicas, (mecanismos do Tipo I e II).

Um FS ideal para o uso em TFD teria que possuir algumas propriedades [17]:

- a) Alta absorção em comprimentos de onda entre ~ 600 - 850 nm.
- b) Alta eficiência de produção de oxigênio singleto, para uma alta eficiência fotodinâmica.
- c) Possuir baixa toxicidade no escuro e localizarem-se seletivamente nos tecidos a serem tratados perto de alvos celulares e subcelulares suscetíveis.
- d) Alta estabilidade química e fotoquímica.
- e) Possuir espécies moleculares puras; síntese fácil e de baixo custo.
- f) Ser solúvel em água.

Ainda hoje não existe no mercado um fármaco com todas essas propriedades, porém há bons FS como alguns tipos de porfirina.

3.5 Porfirinas.

As porfirinas são a classe de FS mais estudados em TFD, pois são estáveis quimicamente e fotoquimicamente, possuem picos de absorção de intensidade relativamente alta na região espectral $\lambda > 600\text{nm}$, alto rendimento quântico da produção do estado tripleto e conseqüentemente produção do oxigênio singleto, devido à sua estrutura química permitem a síntese de espécies com características desejadas. Além disso, entre família de porfirinas se encontram alguns compostos naturais ao organismo, sendo de grande importância para o funcionamento de sistemas bioquímicos como os complexos de porfirina com manganês, responsável pelo processo da fotossíntese; ou complexos de porfirina

com ferro, responsável pelo transporte de oxigênio no organismo pela hemoglobina.

As porfirinas possuem, na sua estrutura, um anel tetrapirrólico cíclico chamado de anel porfirínico representado na Figura 3, o que lhe confere uma rigidez estrutural e um longo tempo de vida do estado tripleto [18]. Além disso, esse anel permite sua ligação com vários tipos de grupos colaterais, como também a introdução de íons metálicos ou prótons dentro do anel.

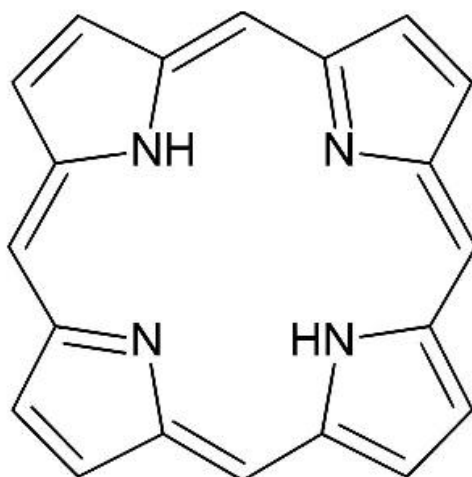


Figura 3. Representação estrutural do anel porfirínico.

Essas mudanças levam a uma alteração das propriedades da molécula, possibilitando obter moléculas com características desejadas. O anel porfirínico é responsável pelo espectro de absorção da porfirina, determinando sua coloração intensa e sua alta absorção de luz na região visível [18].

3.6 Protoporfirina IX.

A protoporfirina IX (PpIX), representada estruturalmente na Figura 4, é um composto da família das porfirinas, sendo um composto natural já presente em organismos; estando relacionada com a síntese de proteína do grupo Heme, responsável pelo armazenamento e transporte de oxigênio molecular no organismo. Não apresentando efeitos colaterais e com alta afinidade por tecidos

tumorais, atrai uma atenção especial para ser utilizada como FS em TFD. Pode-se também utilizar o ALA, estimulador da síntese da PpIX, de forma a obter um maior grau de seletividade de células tumorais, sendo hoje em dia um dos FS mais utilizados em TFD.

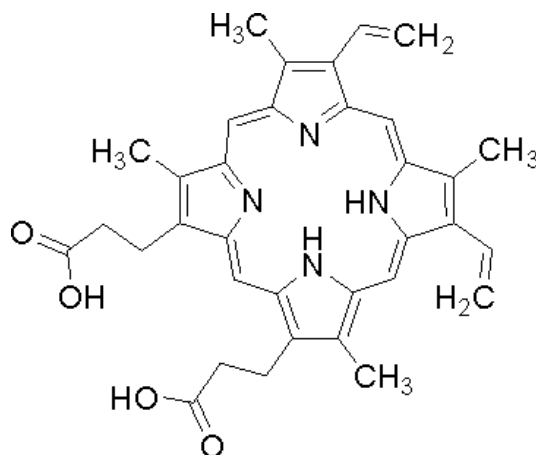


Figura 4. Representação estrutural da PpIX.

A PpIX possui uma coloração avermelhada apresentando uma absorção alta na região de 350 até 450 nm (banda Soret) e mais fraca na região espectral de 635 a 710nm (região de bandas Q), emitindo forte fluorescência em 670nm. Ao ser irradiado, com luz na região do espectro visível, apresenta o aparecimento de novas bandas de absorção e de fluorescência, que correspondem à formação de fotoprodutos [19].

3.7 Fotoprodutos.

Quando irradiamos alguns FS, observamos em seu espectro de absorção e fluorescência a redução de algumas bandas e o surgimento de bandas novas. Essa mudança espectral é devido à fototransformação do FS, gerando fotoprodutos cujas concentrações dependem das espécies ativas. Essas mudanças em seu espectro podem ser usadas para determinar o grau de TFD no tecido. Os fotoprodutos podem ainda ter características de FS, podendo ser fototóxicos, aumentando a eficiência do tratamento ou apresentar toxicidade no

escuro, o que prejudicaria o paciente [20]. Além disso, a fototransformação diminui a concentração de FS, podendo diminuir o efeito da TFD. [21].

Por estes motivos se torna interessante o estudo destes fotoprodutos assim como seu processo de fototransformação.

A cicloadição do oxigênio singlete em um ou ambos os grupos vinil da PpIX, com redução da dupla ponte adjacente, dá origem ao fotoproduto denominado Fotoprotoporfirina (FPp) que, por sua vez, pode gerar outro fotoproduto denominado Produto II, como observado no tratamento através de luz de $\lambda = 670$ nm de cultura de células com FPp [22,23].

O mecanismo de fototransformação, sua velocidade e estrutura final dependem do meio em que FS se encontram. Devido a estes aspectos, torna-se importante o conhecimento do processo de fototransformações da PpIX em organismo e na presença dos sistemas que modelam as estruturas celulares nativas a fim de melhor compreender e utilizar esse FS e fotoproduto. Existe um interesse especial no estudo de tecidos biológicos que apresentam substâncias endógenas que absorvem radiações óticas similares ao processo da TFD, como a glândula harderiana.

3.8 Glândula de Harder.

Esta glândula está presente na maioria dos vertebrados terrestres, estando ausente apenas em morcegos, vacas, equinos, carnívoros terrestres, grandes primatas e homem. Ela foi descrita pela primeira vez em 1964, por Johann Jacob Harder, como sendo uma glândula do tipo lacrimal. Nos mamíferos ela se situa na posição retro orbital, ocupando toda a superfície posterior do olho. As glândulas harderianas em cada classe de animais secretam uma substância diferente. Em mamíferos existem três tipos de secreções, sendo eles lipídios, produtos indóis e porfirinas que são características de roedores. O papel destas glândulas ainda não está muito bem esclarecido [23].

Em ratos da espécie Wistar (*Rattus Norvegicus*), esta glândula produz uma grande quantidade de lipídios, indóis e PpIX, formando um complexo que são secretados no saco da conjuntiva do olho. Esta característica de sintetizar uma grande quantidade de PpIX, o torna objeto de interesse como modelo para estudos relacionados a TFD utilizando PpIX [23].

3.9 Agregados moleculares.

Um agregado pode ser considerado como uma aglomeração de inúmeras partículas ou moléculas que se juntam sem, entretanto, haver alguma ligação química entre elas. O fenômeno da agregação está presente na natureza e é de grande importância, podemos utilizar como exemplo as membranas celulares, que são agregação de fosfolipídios formando a bicamada que separa o interior do exterior celular e responsável pela interação entre os dois meios [24].

Os mecanismos de formação de agregados moleculares são baseados nas ações de forças intermoleculares, como interação eletrostática, interação π - π , pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e o efeito hidrofóbico. A agregação modifica as características dos estados eletrônicos dos FS, alterando suas características espectrais e energéticas. Tal processo reduz a produção de oxigênio singlete e por sua vez a atividade fotodinâmica [25, 26].

Entre os agregados moleculares existem duas importantes classes conhecidos como agregados **J** e **H**. O que identifica cada um desses dois grupos é o arranjo em que as moléculas estão dispostas. Os agregados tipo **J** possuem suas moléculas dispostas lado a lado, já os agregados tipo **H** possuem as moléculas face a face (Figura 5).

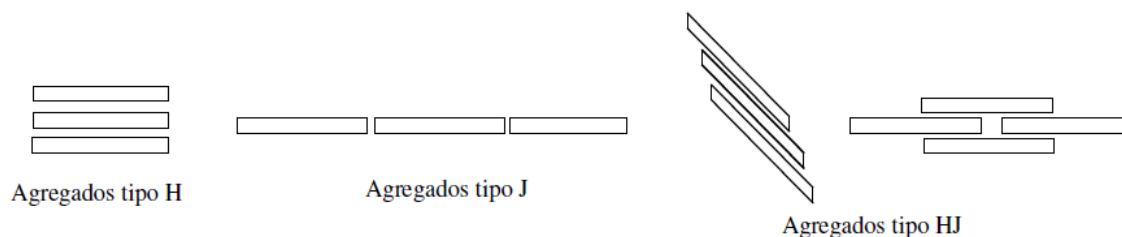


Figura 5. Disposição geométrica dos agregados tipo H e J e HJ

A característica principal dos agregados em relação às mudanças espectrais, é que os agregados **J** exibem uma banda de absorção ótica deslocada para o vermelho em relação à banda de absorção dos monômeros. Já os do tipo **H** apresentam um deslocamento da banda de absorção para o azul.

3.10 Membranas Biológicas e meios Biomiméticos.

As estruturas e funcionalidades de sistemas vivos são de uma complexidade que dificulta o estudo da interação de compostos a estes sistemas. A maioria destas interações é mediada pelas membranas celulares. Os compostos exógenos ao se ligarem com as membranas sofrem mudanças em suas características físicas. Eles podem também alterar as características da membrana influenciando no transporte através desta, assim como induzindo mudanças no funcionamento de proteínas ligadas a ela [27].

O uso de sistemas Biomiméticos, por sua menor simplicidade nos permite estudar essas interações. A palavra Biomimético vem do grego bio (vida) e mimesis (imitação), e trata-se da utilização de sistemas-modelos organizados no estudo dos mecanismos moleculares de ação de compostos.

Assim o estudo da interação da PpIX com estruturas biomiméticas será de grande importância para nosso trabalho, visto que esta interação causa mudanças nas características fotofísicas e fotoquímicas dos FS e devido à similaridade destes meios com sistemas vivos nos permitirá conhecer melhor esses mecanismos.

3.10.1 Estrutura de membrana celular.

Membranas biológicas são de crucial importância para muitos fenômenos celulares, elas são sistemas extremamente organizados e de alta complexidade, sendo responsável por toda interação intracelular com o meio extracelular, através de moléculas com atividades biológicas presente em sua estrutura, principalmente

por proteínas e lipídios. A Figura 6 representa a estrutura da membrana celular, também chamada de membrana plasmática ou citoplasmática [28].

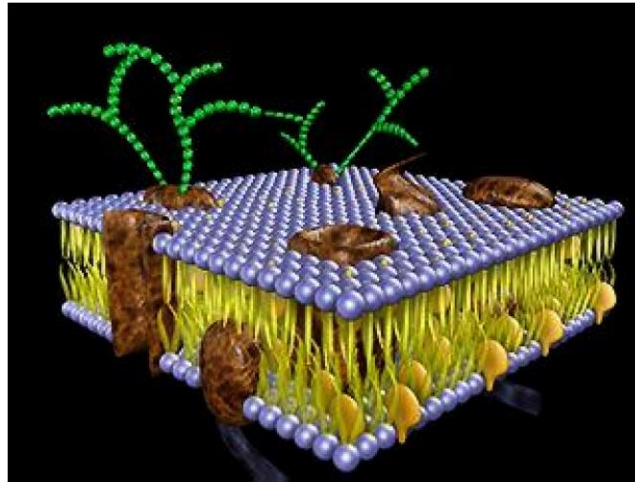


Figura 6. Representação estrutural tridimensional da membrana plasmática.

O modelo de fluído mosaico de Singer e Nicolson apresenta a estrutura da membrana formada por uma bicamada lipídica, na qual estão incorporadas as proteínas. Os lipídios da membrana são fosfolípídeos, cujas moléculas têm caráter anfifílico, possuindo dois grupos apolares, de natureza hidrofóbica, denominados de “calda” e um grupo polar de natureza hidrofílica denominado de “cabeça” [28]. De acordo com essa estrutura, temos três regiões distintas:

1. Região interna, hidrofóbica, formado pela parte apolar das moléculas chamada de calda, essa região não contém água e caracterizada pela constante dielétrica $\epsilon = 1-2$.
2. Região superficial da membrana, formado pela parte polar do fosfolípídeo, também chamada de cabeça. Nessa região $\epsilon = 5-15$, dependendo da estrutura de fosfolípídeos.
3. Região compreendida entre a parte polar da membrana e o meio aquoso. Esta região está caracterizada por variação da ϵ de 5-15 da região polar das cabeças de fosfolípídeo até 81 em meio aquoso.

Devido à importância das membranas celulares responsáveis pela interação do meio intracelular com o meio extracelular se torna de grande importância o estudo de sua interação com FS.

3.10.2 Micelas.

Micelas são compostos formados por surfactantes ou tensoativos, que são moléculas anfifílicas, compostas por uma parte polar (hidrofílica) também chamada de “cabeça” e uma parte apolar (hidrofóbica) também chamada de “cauda”, como ilustrado na figura 7. A parte polar pode ou não conter cargas elétricas. A classificação dos surfactantes pode ser feita de acordo com essas cargas, sendo aniônicos (carga negativa), catiônicos (carga positiva), não iônicos (neutro) e zwitteriônicos (quando cargas positivas e negativas estão presentes juntos na cabeça) [29].

Ao atingir certa concentração, chamada de Concentração Micelar Crítica (CMC), os tensoativos formam agregados termodinamicamente estáveis com uma estrutura específica que recebe o nome de micelas. A CMC varia de surfactante para surfactante, assim como variam com o meio em que se encontram dependendo das características deste [29].

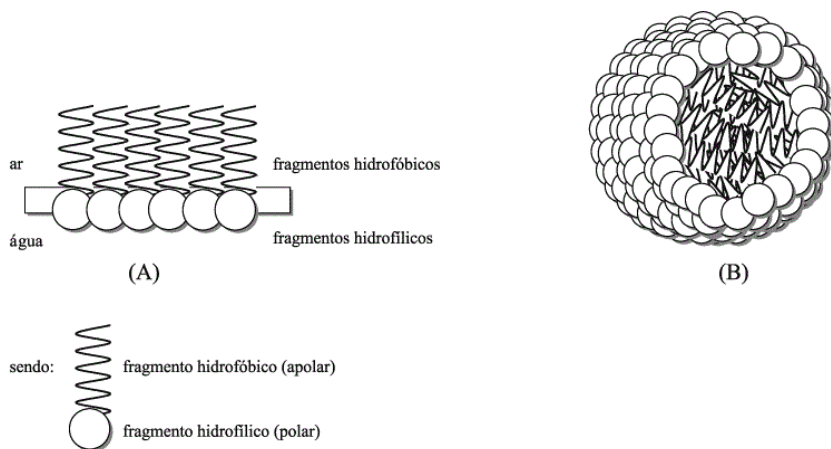


Figura 7. Ilustração de moléculas de surfactantes anfifílicos, sendo (A) surfactantes e (B) micela.

A estrutura micelar mimetiza a estrutura da membrana celular, tendo basicamente três regiões (Figura 8):

1. Região interna (a) hidrofóbica formada pela parte apolar da molécula de tensoativos, com constante dielétrica baixa ($\epsilon \approx 2 - 5$).
2. Região esférica superficial (b) formada pela parte polar (hidrofílica) da molécula de tensoativos ($\epsilon \approx 5 - 15$).
3. Região intermediária (c) entre a parte polar e o meio aquoso homogêneo, com um gradiente da constante dielétrica de 15 até 81 nas distâncias de 10 – 100 Å. Essa região é chamada de “camada de Gouy-Chapman”.

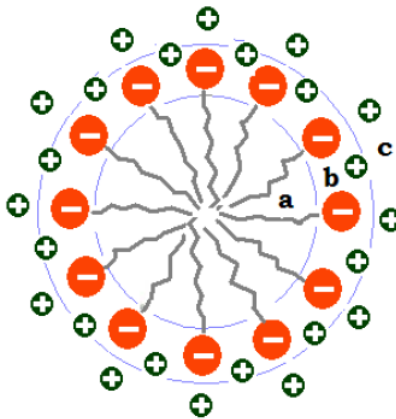


Figura 8. Representação esquemática da estrutura micelar, indicando as três regiões que a compõem, região interna (a), região externa (b) e região intermediária (c).

Neste trabalho utilizamos micelas aniônicas, catiônicas, não iônicas e zwitteriônicas.

3.10.3 Albumina.

As albuminas são as proteínas mais abundantes no sangue que têm o papel de transporte multifuncional, e por esse motivo possuem diversos sítios de ligação específicos e não específicos. Albumina de soro bovino (ASB) possui estrutura similar à albumina de soro humano (ASH); ela é formada por uma cadeia peptídica simples de 583 aminoácidos, estando com uma carga total negativa em pH 7,0 e com ponto isoelétrico próximo de pH 4.0 [30]. Albuminas possuem

grande afinidade por pequenos compostos aromáticos carregados negativamente [31]. Um composto, sendo introduzido no organismo, com uma grande probabilidade entra em contato com a molécula de albumina. Por esse motivo utilizamos ASB em nosso trabalho como um bom modelo biomimético.

4. Materiais e métodos.

4.1 Materiais.

4.1.1 Protoporfirina IX sintética.

A PpIX sintética foi obtida da Sigma-Aldrich, possui grau de pureza $\geq 95\%$ e foi utilizada sem purificação adicional. Sua solubilidade em água é baixa, porém, é solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO) e em acetonitrilo (ACN). Nos experimentos a PpIX foi utilizada em soluções orgânicas de ACN e DMSO na proporção de 3:1 e em acetona e em solução aquosa e tampão fosfato em pH 7,0 [0,2M]. Nesses últimos casos algumas alíquotas da solução estoque de alta concentração da PpIX em ACN/DMSO (3:1) foram adicionadas em soluções aquosa ou de tampão assim que o conteúdo da componente não aquosa não ultrapassava 5% por volume.

4.1.2 Protoporfirina endógena.

A protoporfirina IX endógena foi extraída e cedida pelo Doutor Edmyr Rosa dos Reis, da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas (UNICAMP).

Para a obtenção da PpIX endógena foram usados de 20 a 30 ratos da linhagem Wistar da espécie *Rattus Novergicus Albinus* do sexo masculino, de massa aproximadamente 380g e idade de 20 semanas. Os animais foram recém-desmamados e mantidos em condições ambientais normais e alimentados com ração comercial para ratos (Labina Purina) e água. Para a retirada das glândulas,

os animais foram anestesiados com injeção 0,3 ml/100g de tiopental (Thiopental Sódico) 25 mg/ml e após a retirada foram sacrificados por aprofundamento do anestésico.

Para a extração da PpIX é utilizado o método Lim, C.K et al 2000. Após a extração as glândulas foram lavadas três vezes em solução de cloreto de sódio 0,99M (a fim de retirar resíduos de sangue), fragmentadas e colocadas em um homogeneizador de vidro contendo uma solução de ACN/DMSO (3:1). Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 15000 rpm, a 5°C durante 5 minutos. Após o descarte do pélete, o sobrenadante foi colocado em frasco âmbar e estocado a 5°C [23]

4.1.3 Tensoativos.

Os tensoativos utilizados foram dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), N-hexadecil-N, N, dimetil-3-3 amônio-1-propano sulfonado (HPS) e 4-1,1,3,3-tetrametilbutifenil-polietileno glicol (Triton X-100). Todos obtidos da Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co). Sendo suas cargas respectivamente aniônica (-), catiônica (+), zwitteriônica (+-) e neutra (0). As soluções estoque de surfactantes foram preparados em concentração acima de CMC em solução tampão fosfato 0,2M com pH 7,0.

4.1.4 Albumina.

Foi utilizada albumina de soro bovino, proveniente da Sigma-Aldrich com pureza > 95%.

4.2 Preparação das amostras.

4.2.1. Tampão fosfato

A solução de tampão fosfato foi preparada em água de qualidade mili-Q utilizando fosfato monobásico (FM) com peso molecular de 138,01 gr/M e fosfato dibásico (FD) de peso molecular 268 gr/M. Para obtermos uma solução 0,2M dissolveu-se 2,72gr de FM em 100mL e 5,36 gr de FD em 100mL, em seguida misturou-se os dois compostos na proporção 33:67, obtendo uma solução com pH aproximadamente 7,0 que foi ajustado adicionando soluções concentradas de NaOH e HCl, sendo monitoradas pelo pH-metro Analyser pH 300.

4.2.2 PpIX sintética.

As soluções de PpIX sintética em solvente orgânico, foram preparadas de duas maneiras. Para obtenção do coeficiente de absorção molar variou-se a concentração de 0 a 250mM utilizando como base de cálculo o peso molecular da PpIX como sendo de 562,66 gr/Mol. Já para os experimentos em água e tampão utilizamos a solução estoque como já foi explicado acima. Para análise monitoramos os seus espectros de absorção e de emissão de fluorescência.

4.2.3 PpIX endógena.

Para os experimentos com PpIX endógena, utilizou-se a solução estoque em ACN+DMCO (3:1) armazenada a 5°C que foi adicionada à solução tampão, não ultrapassando 5% o conteúdo das solventes não aquosas em solução final e de modo que a absorbância inicial não seja maior que 0,5. Foram monitorados seus espectros de absorção e de emissão de fluorescência.

4.2.4 Surfactantes.

As soluções de estoque de surfactantes foram preparadas em concentrações acima de suas CMC afim de ter certeza que na solução haveria micelas formadas. As concentrações das soluções estoque em tampão fosfato (pH 7,0, 0,2 M) para cada surfactante foram SDS [1M], CTAB [100mM], HPS [100mM], TRITON X-100 [100mM]. Os valores de CMC encontrados na literatura para os respectivos surfactantes são: 10mM, 1mM, 50uM e 0,24mM.

A interação com micelar foi estudada adicionando solução estoque de surfactante, acima e abaixo de sua CMC para cada tipo, em solução de PpIX aquosa, obtendo múltiplos espectros de absorbância e de emissão de fluorescência.

Nos experimentos da fototransformação da PpIX na presença de micelas foi utilizada a concentração de surfactante acima da CMC e tão alta que praticamente todas moléculas de PpIX já se encontram ligadas com as micelas. Essa concentração foi determinada pelo monitoramento dos espectros de absorção e da fluorescência assim que atingimos sua saturação no aumento da concentração do surfactante. Em seguida realizamos a irradiação da amostra e monitoramos os espectros de absorção da fluorescência em intervalos regulares de tempo.

4.2.5 Albumina

A albumina possui peso molecular ≈ 66.000 gr/M. Sua solução estoque foi feita em solução tampão fosfato (pH 7,0, 0,2M) numa concentração de 50mM.

Para os testes de interação entre a albumina e a PpIX variou-se a concentração de albumina em solução aquosa de PpIX, monitorando seus espectros de absorção e de emissão de fluorescência. No teste da fototransformação o procedimento seguido foi o mesmo utilizado nos surfactantes.

4.2.6 Fototransformação

A fototransformação da PpIX endógena e sintética, para os experimentos na presença e ausência de meios biomiméticos, foram obtidos pela irradiação da amostra por luz proveniente de uma lâmpada de xenônio de alta pressão de 75W, equipado com um filtro de vidro com transmitância na faixa espectral de $\lambda \geq 430\text{nm}$. Foi colocada, entre a lâmpada e a amostra, uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 2,0 cm, preenchida com água a fim de prevenir efeitos térmicos.

4.3 Técnicas experimentais.

4.3.1 Espectroscopia de absorção ótica.

Espectroscopia de absorção ótica é uma poderosa ferramenta, obtendo-se informações tanto estruturais quanto dinâmicas. O espectrofotômetro é um equipamento basicamente composto de uma fonte de radiação (lâmpada), um sistema ótico, compartimento para amostra e um ou mais detectores como está ilustrada na Figura 9. A fonte mais comum utilizada para obter espectro UV é de deutério ($\lambda < 350\text{ nm}$), para espectro visível, tungstênio-halogênio ($350\text{nm} < \lambda < 1100\text{nm}$). A radiação proveniente da fonte é colimada antes de passar por um prisma ou uma rede de difrações dispersivas que separam os diferentes comprimentos de onda [32]. Em aparelho utilizado nesse trabalho a faixa de comprimentos de onda atingida foi de 190nm a 1100nm.

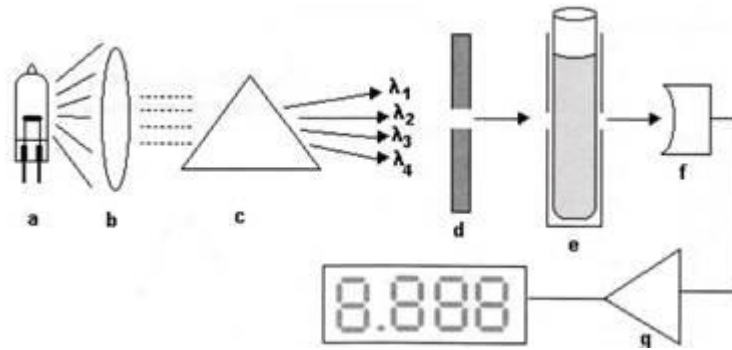


Figura 9. Esquema óptico dos principais componentes do espectrofotômetro. As letras representam: (a) fonte de luz, (b) colimador, (c) prisma ou rede de difração, (d) fenda seletora de, (e) compartimento de amostras com cubeta contendo solução, (f) detector, (g) amplificador [33].

Quando o feixe atinge a amostra, ocorrem alguns fenômenos tais como reflexão, espalhamento, absorção e transmissão; a relação entre eles é dada pela Equação 1.

$$I_o = I_r + I_e + I_a + I_t \quad (1)$$

Sendo:

- I_o a intensidade do feixe antes de atingir a cubeta;
- I_r a intensidade do feixe refletido devido à diferença de índice de refração entre os meios;
- I_e a intensidade do feixe espalhado devido a um meio não homogêneo ou flutuações na densidade da solução;
- I_a intensidade do feixe absorvido pela amostra;
- I_t intensidade do feixe transmitido.

O efeito de espalhamento pode ser desconsiderado se a amostra é não opaca. O efeito da reflexão pode ser anulado através da subtração da linha base, medida na ausência da substância a ser estudada.

Portanto a Equação 1 pode ser reduzida á Equação 2.

$$I_o = I_a + I_t \quad (2)$$

A relação entre a intensidade de radiação incidente e transmitida é dada pela lei de Lambert-Beer:

$$I_t = I_o e^{-\epsilon C b} \quad (3)$$

Sendo $\epsilon(\lambda)(\text{Mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$ é o coeficiente de absorção molar que é uma característica específica de cada composto e C a concentração em Mol.

A Equação 3 pode ser escrita como:

$$\log \frac{I_o}{I_t} = \epsilon C b = A \quad (4)$$

A Equação 4 nos dá o valor A que chamamos de absorbância [34].

O espectroscópio mede a absorbância da amostra em cada comprimento de onda incidido, fornecendo um gráfico o qual é chamado de espectro de absorção ótica da substância (absorbância *versus* comprimento de onda). Este espectro é único para cada substância e qualquer modificação em sua estrutura modifica o espectro.

Neste trabalho foi utilizado para obtenção dos espectros de absorção ótica o espectrofotômetro Beckman DU 640.

4.3.2 Espectroscopia de Fluorescência.

A fluorescência é um processo de emissão de fótons, envolvendo a transição entre os estados eletrônico excitado e fundamental de mesma multiplicidade de spin. Se a transição ocorre entre os estados com spins diferentes, temos o processo de fosforescência.

A dependência da intensidade de emissão da fluorescência com o comprimento de onda é chamado de espectro de emissão da fluorescência.

Por outro lado, pode-se apenas registrar emissões que ocorram num comprimento de onda fixo, enquanto varia-se o comprimento de onda de excitação, esse é o chamado espectro de excitação.

Uma característica importante da fluorescência que mostra a contribuição do processo de emissão de fótons na dissipação da energia de excitação é o rendimento quântico da fluorescência

$$\Phi_{fl} = \frac{I_{em}}{I_{abs}} \quad (5)$$

Em que I_{em} é a intensidade da luz emitida e I_{abs} é a absorvida, respectivamente.

Para que Φ_{fl} ocorra alto, uma molécula precisa ter estrutura mais rígida e/ou estar em um meio bastante viscoso. Esses dois fatores diminuem a probabilidade da desativação não radiativa $S_1 \rightarrow S_0$ e assim favorecem o processo da emissão.

Neste trabalho utilizamos o fluorímetro Hitachi FL4500 para monitorar os espectros da emissão e da excitação da fluorescência.

4.3.3 Flash fotólise

Pelo método de flash-fotólise a amostra é excitada por curtos pulsos de luz ou por uma sequência de pulsos, enquanto as mudanças temporais de suas propriedades são monitoradas. Nesse método, as lâmpadas de pulso ou lasers são usualmente utilizadas como fontes de pulsos da luz.

Com esse método é possível determinar espectros, rendimentos quânticos, níveis de energia e outras características de produtos com curtos tempos de vida, produzidos pela luz. Entre eles, estão os estados excitados eletrônicos,

vibracionais e rotacionais, radicais livres, fotoisômeros, etc. Alguns desses, ainda transitórios, são importantes para processos de transformações químicas devidas altas energias e configurações dos elétrons não estáveis. Radicais livres e estados excitados mais baixos (singletos e tripletos) são de importância maior, pois esses possuem tempos de vida relativamente longos, o que aumenta a probabilidade de suas reações com outros compostos. O método de flash-fotólise possibilita determinar a ordem de uma reação rápida, calcular suas constantes de velocidade e outras características cinéticas e termodinâmicas.

As características mais importantes do equipamento de flash-fotólise são: o tempo (τ_p), a energia (U_p) e a região espectral do pulso da luz de excitação, as quais podem ser escolhidas conforme as características do sistema a ser estudado. Para as soluções líquidas homogêneas os valores de τ_p mais comuns estão de 10^{-3} até 10^{-8} s. Esses valores caracterizam os tempos de vida de estados excitados eletrônicos mais baixos (S1 e T1), fotoisômeros, reações bimoleculares, ou seja, reações de radicais, transporte de energia, etc. Porém, podem existir os tempos muito mais curtos ($< 10^{-8}$ s), quando, por exemplo, é formado um complexo ou o sistema é micro-heterogêneo. Essa é a propriedade mais comum de soluções de polímeros (líquidas e sólidas) e especialmente de sistemas biológicos [28,35].

O esquema principal de aparelho de flash-fotólise com análise através de registro de absorção ótica é mostrado na Figura 10 abaixo

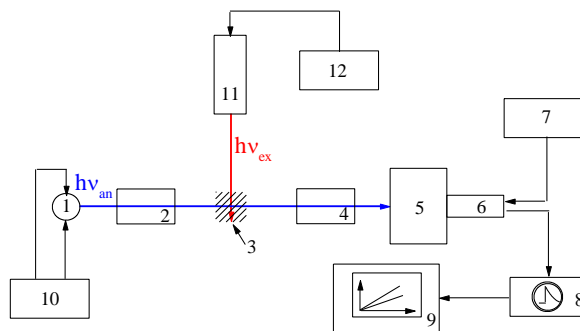


Figura 10. (1). Fonte da luz de análise (lâmpada ou laser); (2) e (4) sistemas óticos; (3) amostra; (5) monocrômador; (6) fotomultiplicador; (7) fonte de alta tensão; (8) registrador (osciloscópio digital); (9) analisador (computador); (10) fonte de corrente; (11) fonte de pulsos de luz de excitação (laser); (12) fonte de potência para pulsos de excitação [35].

O tempo de vida relativamente longo do estado tripleto T_1 aumenta a probabilidade de sua reação com outros componentes do sistema, se comparado com o estado S_1 . Uma vez que o espectro de absorção do estado tripleto é estabelecido, a cinética de decaimento de T_1 pode ser analisada através das medidas de absorção óptica da amostra em função do tempo. A determinação da variação de absorção no comprimento de onda de análise pode ser obtida da forma expressa na figura 11:

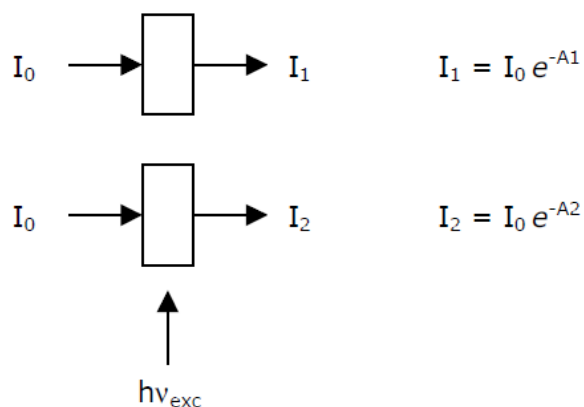


Figura 11. Esquema representativo para determinação da variação de absorção no comprimento de onda de análise.

Em que I_0 é a intensidade de luz incidente, I_1 é a intensidade de luz transmitida pela amostra antes do pulso fotolisante, quando a absorção da amostra é A_1 e I_2 é a intensidade da luz transmitida pela amostra após o pulso fotolisante, quando a absorção da amostra é A_2

Deste modo podemos escrever,

$$\frac{I_2}{I_1} = e^{(A_2 - A_1)} = e^{(\Delta A)} \quad (6)$$

Se apresentarmos I_2 como $I_1 - \Delta I$ podemos escrever

$$\frac{I_2}{I_1 - \Delta I} = e^{\Delta A} \quad (7)$$

$$\Delta A = \log \frac{I_2}{I_1 - \Delta I} \quad (8)$$

ΔA pode ser relacionada com a concentração da seguinte forma:

$$A_1 = \varepsilon_{SS} C_0 \quad (9)$$

$$A_2 = \varepsilon_{SS}(C_0 - C_T) + \varepsilon_{TT} C_T = \varepsilon_{SS} C_0 + (\varepsilon_{TT} - \varepsilon_{SS}) C_T \quad (10)$$

$$\Delta A = A_2 - A_1 = (\varepsilon_{TT} - \varepsilon_{SS}) C_T = \text{const} \times C_T \quad (11)$$

$$C_T = C_T(t) \quad (12)$$

$$\Delta A = \text{const} \times C_T(t) \quad (13)$$

Em que ε_{SS} e ε_{TT} são os coeficientes de absorção molar de transições singleto-singleto e tripleto-tripletto respectivamente; C_0 é a concentração inicial de moléculas no estado fundamental e C_T é a concentração de moléculas no estado excitado tripleto.

Neste trabalho o estado tripleto da PpIX foi produzido por pulsos de 532 nm com duração de 3 ns do segundo harmônico do Nd:YAG SL4000 *spectrum laser system*. A absorção óptica da amostra foi registrada em 470 nm, que é o máximo de absorção da transição $T_1 \rightarrow T_n$ para PpIX.

A geração do oxigênio singleto foi induzida por excitação da PpIX com os pulsos de 532 nm com duração de 10 ns do segundo harmônico do Nd:YAG SL4000 *spectrum laser system*. A sua cinética de formação e de decaimento foi monitorada através da sua fosforescência em 1270 nm.

5. Resultados e Discussão.

5.1 Espectros de absorção óptica das PpIX endógena e sintética em meios não aquoso e aquoso.

O espectro de absorção óptica da PpIX sintética depende do meio em que se encontra como podemos ver na Figura 12 onde temos seu espectro em tampão fosfato, acetona e ACN+DMSO (3:1). Podemos observar, que ao mudar de meio não aquoso para o aquoso a PpIX sintética sofre uma grande mudança em seu espectro, apresentando um deslocamento das bandas de absorção em $\lambda = 630$, 576 e 537 nm para o vermelho, e um deslocamento para o azul das bandas $\lambda = 503$ nm e 402nm.

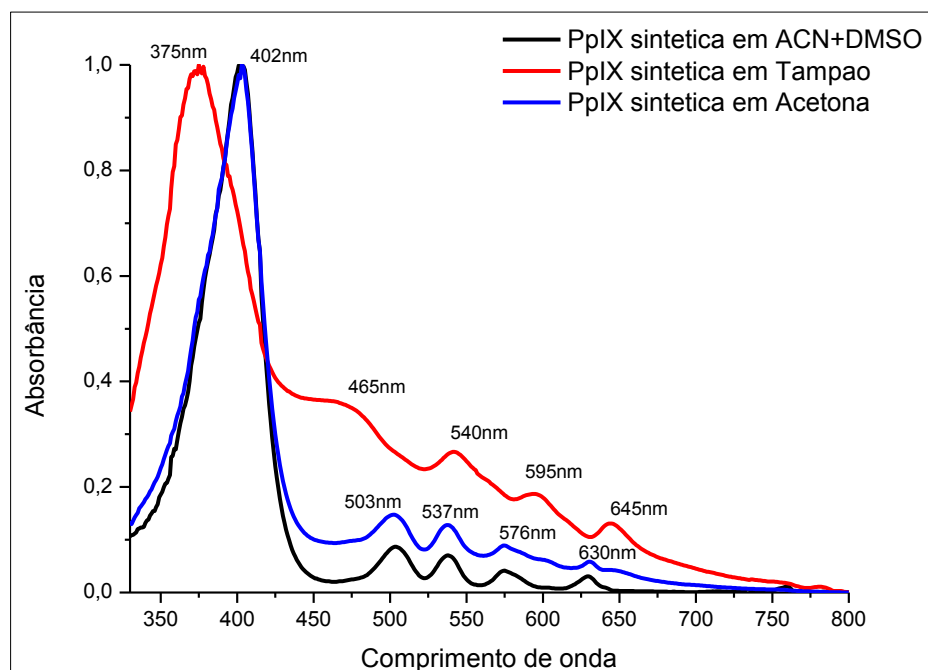


Figura 12. Espectros normalizados de absorção da PpIX sintética em solução de Acetona, ACN+DMSO (3:1) e tampão fosfato.

Além disso, foi observada a diminuição em uma ou duas ordens de grandeza dos coeficientes de absorção molar em solução tampão se comparada com a solução em meios não aquosos (Tabela 1).

Tabela 1. Os coeficientes de absorção molar da PpIX sintética em meios não aquoso e aquoso

	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ * cm ⁻¹)
PpIX sintética em ACN:DMSO	402	1,14E+05
	504	1,01E+04
	538	8,47E+03
PpIX sintética em tampão	380	1,48E+03
	465	1,18E+03
	540	8,37E+02

Já a PpIX endógena como podemos ver na Figura 13, quando mudamos do meio não aquoso (ACN+DMSO) para o aquoso (tampão fosfato) não se observou mudanças muito drásticas como acontece com a PpIX sintética, porém, ainda assim notamos um pequeno deslocamento das bandas de absorção para o vermelho. Isso indica que a PpIX endógena já está de alguma forma em um envolto não aquoso, que provavelmente ligou-se com as moléculas de PpIX em glândulas, continuando ligado depois da extração e purificação da amostra.

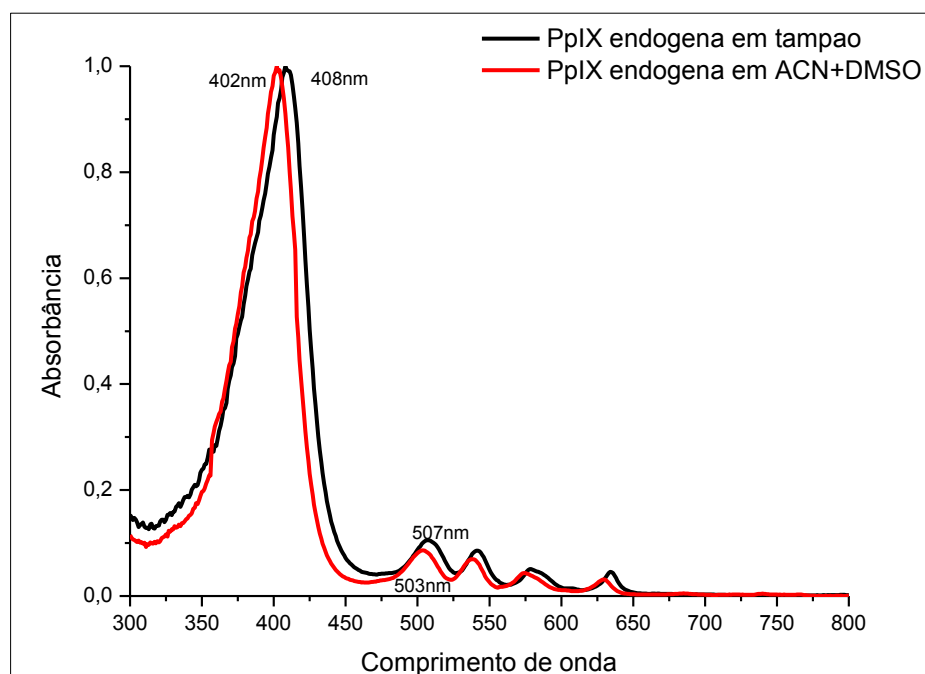


Figura 13. Espectro normalizado de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) e tampão fosfato.

Na Figura 14 podemos ver o espectro de absorbância das PpIX sintética e endógena em solução de ACN+DMSO (3:1). Os dois espectros são iguais.

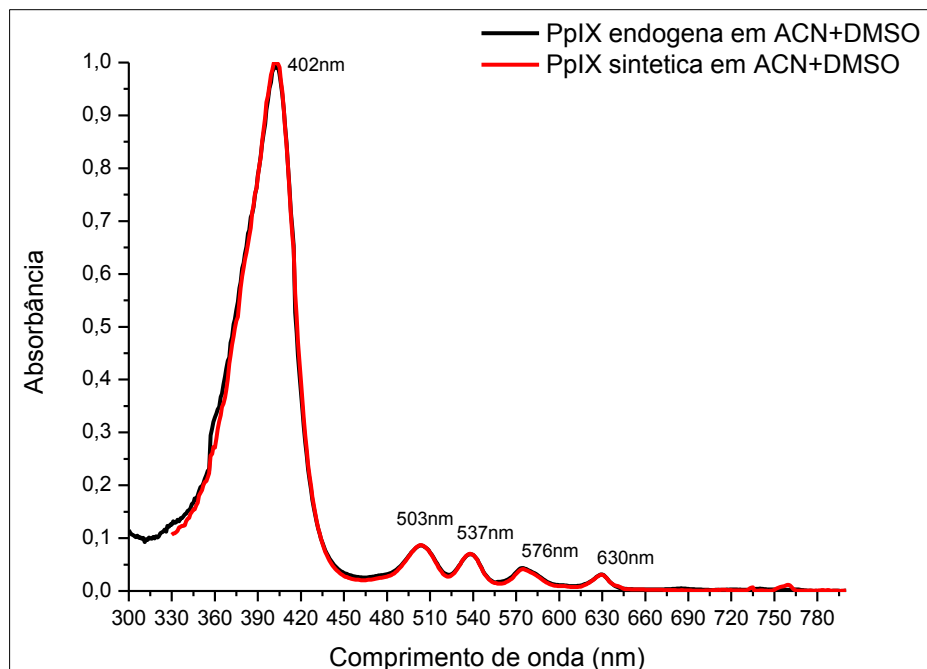


Figura 14. Espectro normalizado de absorção da PpIX sintética e endógena em soluções não aquosas.

Nas Figuras 15 até 20 estão apresentados os espectros da emissão de fluorescência das PpIX sintética e endógena nos meios ACN+DMSO, acetona e tampão fosfato com a excitação em $\lambda=402\text{nm}$.

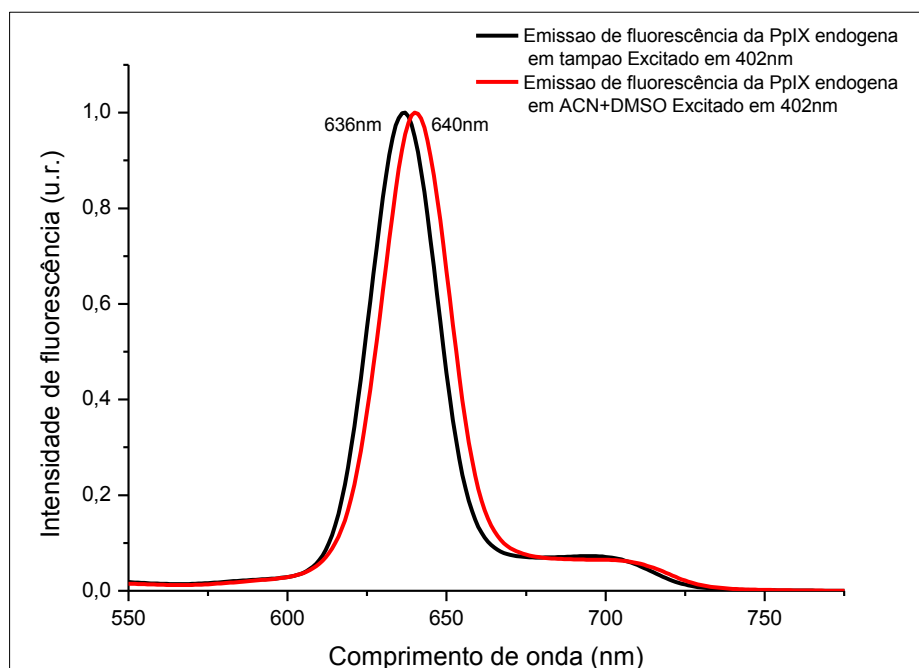


Figura 15. Espectro normalizados de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=402\text{nm}$ da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) e em solução tampão fosfato.

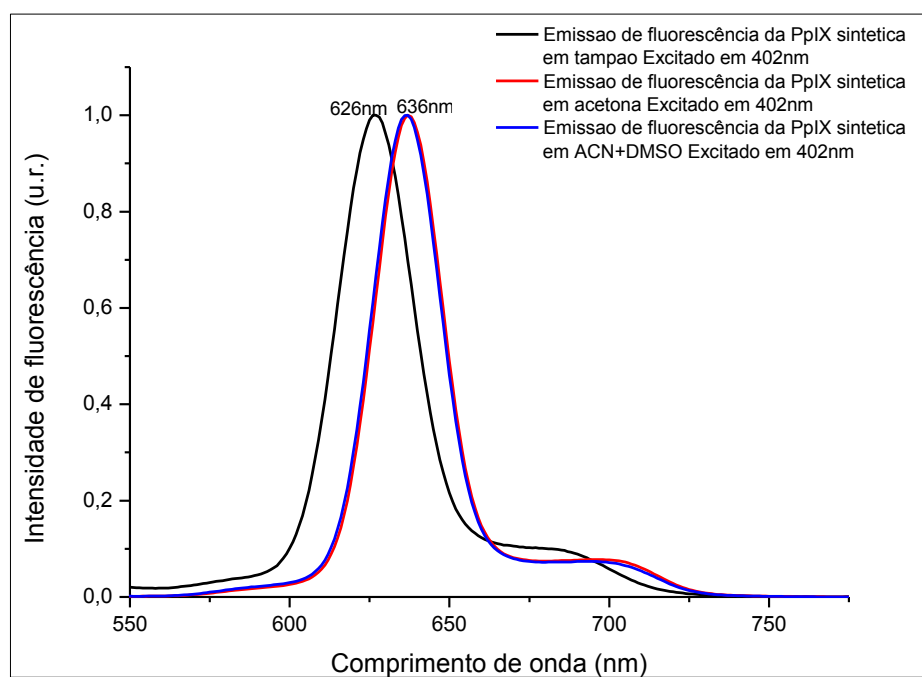


Figura 16. Espectro normalizado de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=402\text{nm}$ da PpIX sintética em solução de ACN +DMSO e tampão fosfato.

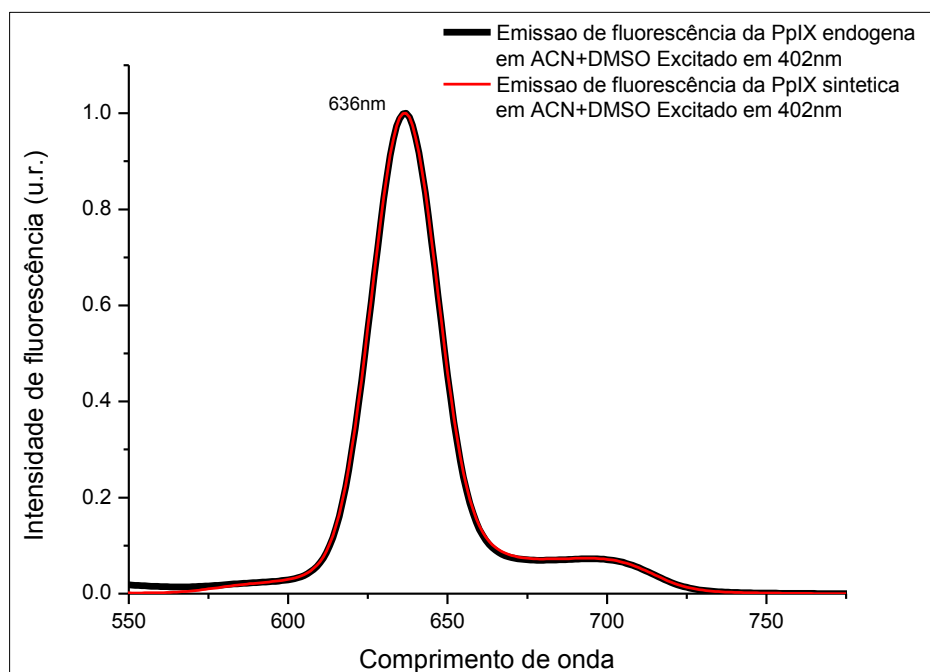


Figura 17. Espectro normalizado de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=402\text{nm}$ da PpIX endógena e sintética em solução de ACN+DMSO (3:1).

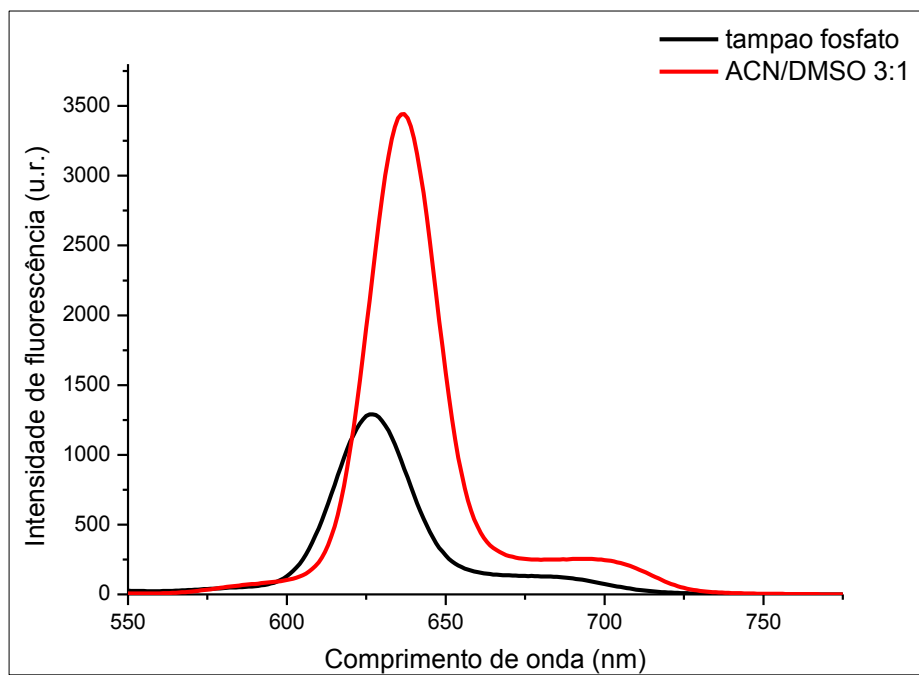


Figura 18. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de tampão e ACN+DMSO (3:1) com a excitação em $\lambda=402\text{nm}$ corrigida por absorvância.

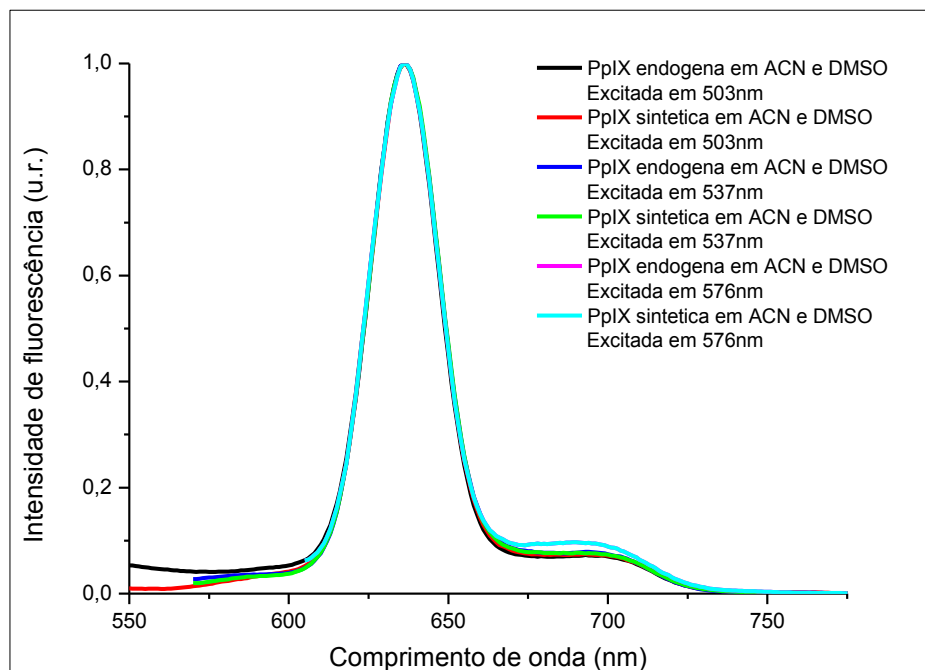


Figura 19. Espectros normalizados de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=503\text{nm}$, 537nm e 576nm das PpIX endógena e sintética em solução de ACN+DMSO(3:1).

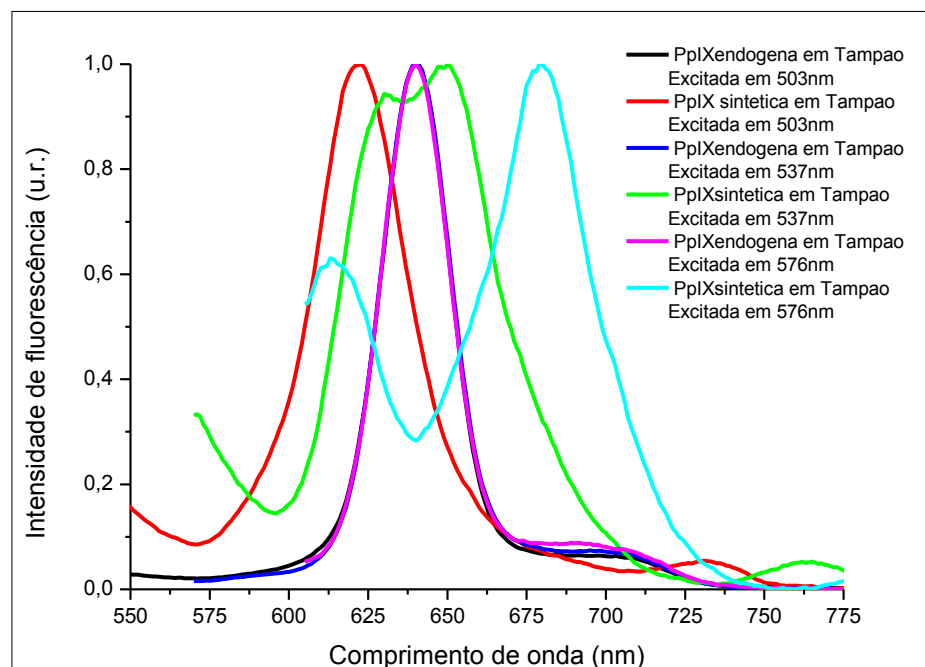


Figura 20. Espectros normalizados de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=503\text{nm}$, 537nm e 576nm das PpIX endógena e sintética em solução de tampão.

Igualmente ao ocorrido com os espectros de absorção, os espectros de emissão da fluorescência da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1), acetona e em solução tampão são semelhantes. Entretanto os espectros de PpIX sintética em soluções não aquosas são semelhantes com aqueles da PpIX endógena, quando que em solução tampão, porém, observa-se um deslocamento do espectro da fluorescência da PpIX sintética de 10 nm para azul (Figura 16) .

Além disso, foi observada a diminuição da intensidade da fluorescência da PpIX sintética em solução tampão em relação as soluções não aquosas. Os espectros da fluorescência tanto da PpIX sintética quanto endógena em solução não aquosa obtidos com excitação em diferentes comprimentos de onda são semelhantes (Figura 19), quando que o perfil do espectro da PpIX sintética em solução tampão depende drasticamente do comprimento de onda da excitação (Figura 20).

Baseando-se nos resultados apresentados acima podemos concluir que em solução aquosa (tampão) a PpIX sintética possui características diferentes daquelas em soluções não aquosas. Isso pode ser associado com a baixa solubilidade da PpIX em meio aquoso, que se resulta, provavelmente, em sua agregação, modificando seu espectro de absorção e diminuindo a intensidade da fluorescência. Essa consideração está em acordo com o fato de que, o aumento da concentração da PpIX sintética em solução aquosa induz a precipitação e torna a solução opaca.

A dependência do espectro da emissão da fluorescência do comprimento de onda da excitação mostra que dentro da solução tampão a PpIX estão formando diversas espécies com diferentes estruturas. A presença de dois picos da fluorescência, um deslocado para vermelha e outro para azul, está associada, provavelmente, com a existência de dois tipos de agregados, H e J ou agregados mistos HJ.

Diferente da PpIX sintética, a PpIX extraída de glândulas mostra as características espectrais semelhantes em solução aquosas e não aquosas, e mostra a solubilidade em soluções aquosas maior do que PpIX sintética. Isso acontece, provavelmente, pois a PpIX endógena ao ser extraída continua ligada a algumas estruturas biológicas, as quais adaptam ela com o ambiente aquoso. Devido à alta hidrofobicidade das moléculas da PpIX essas estruturas devem possuir um caráter anfifílico e são provavelmente um tipo de fosfolipídio. Outra possibilidade é a ligação da PpIX com algumas proteínas. Para confirmar essas sugestões realizamos os experimentos na presença de surfactantes, os quais também possuem as características anfifílicas, e a proteína albumina de soro bovino (ASB).

5.2 Espectros de absorção ótica das PpIX endógena e sintética em meio aquoso na presença de surfactantes e albumina.

Os espectros de absorção, das PpIX endógena e sintética, na presença de surfactantes e proteína ASB em concentrações variadas estão nas Figura 21 até a Figura 30, sendo as Figuras 21 e 22 referentes às amostras na presença de micela de CTAB, Figuras 23 e 24 na presença de micelas de HPS, Figuras 25 e 26 micelas de SDS, Figuras 27 e 28 na presença de micelas de TRITON –X100 e Figuras 29 e 30 referentes às amostras na presença de Albumina de soro bovino.

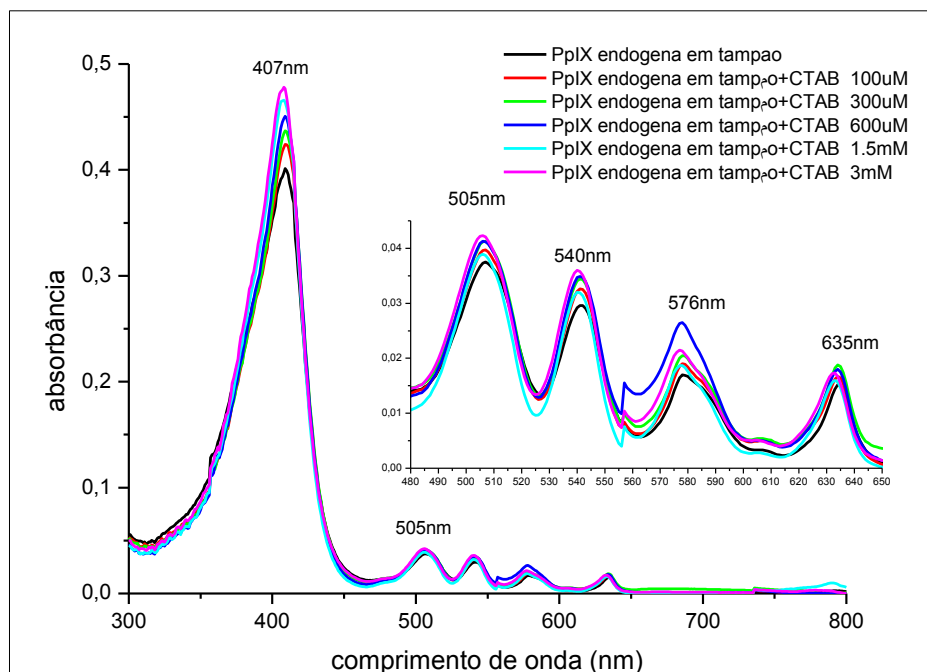


Figura 21. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de CTAB em diferentes concentrações.

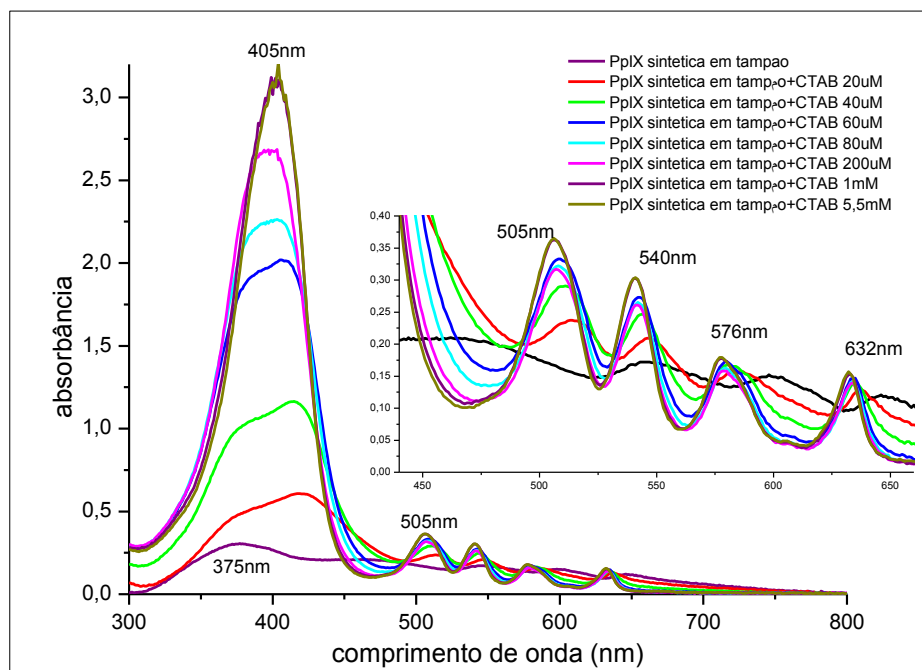


Figura 22. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de CTAB em diferentes concentrações.

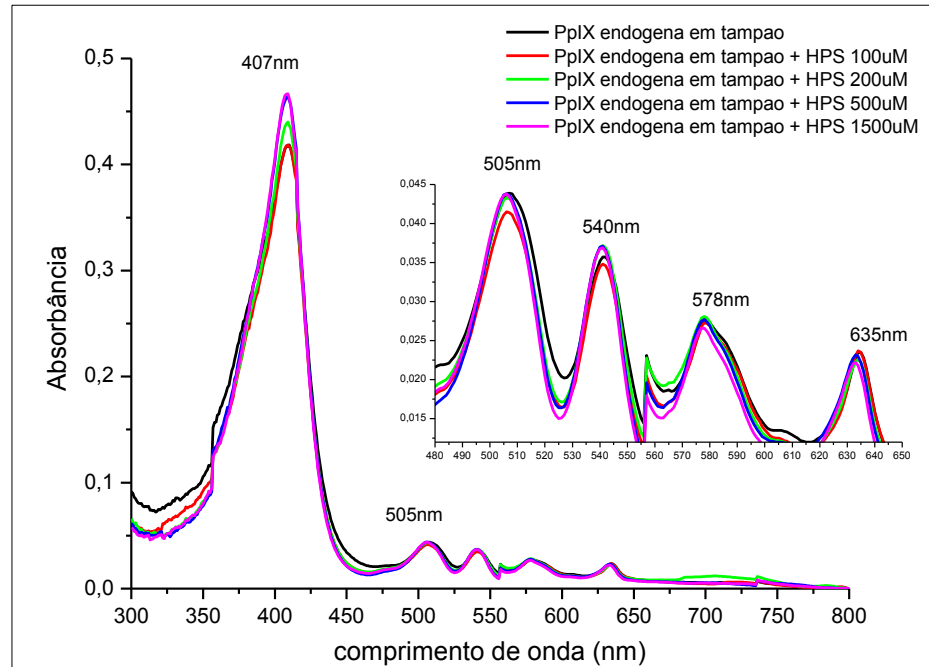


Figura 23. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de HPS em diferentes concentrações.

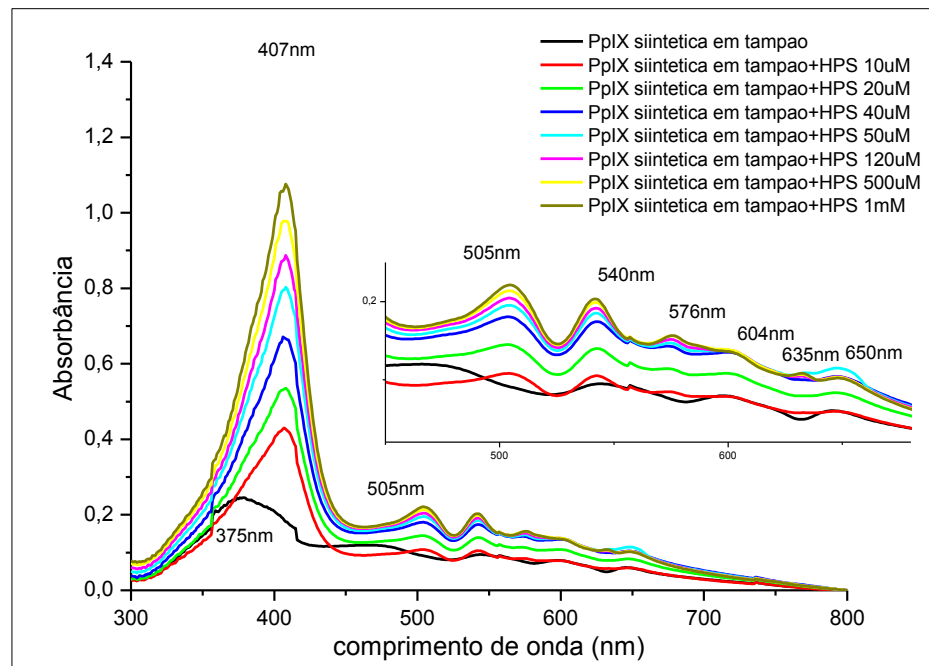


Figura 24. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de HPS em diferentes concentrações.

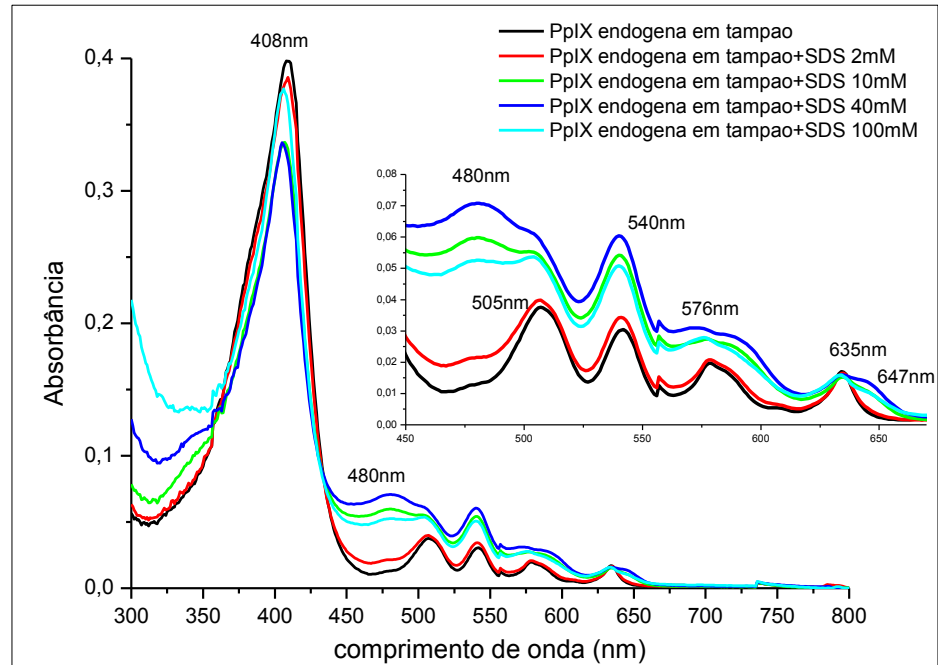


Figura 25. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de SDS em diferentes concentrações.

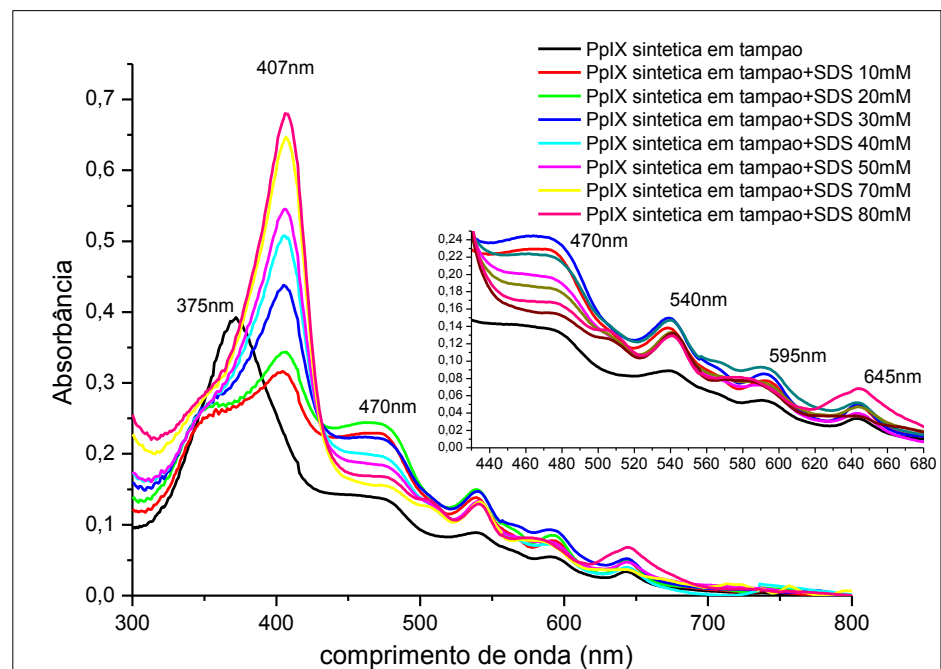


Figura 26. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de SDS em diferentes concentrações.

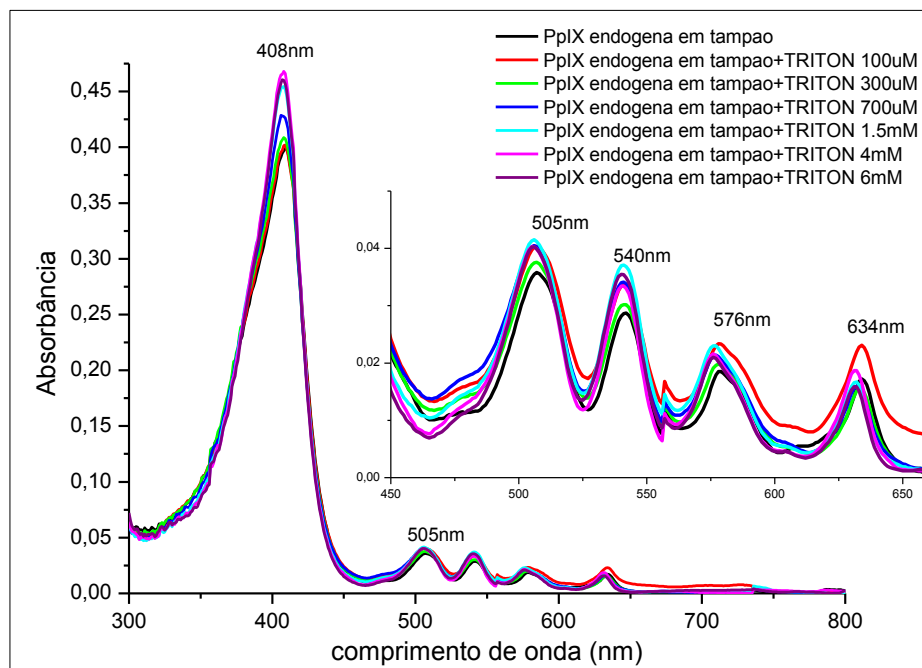


Figura 27. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de TRITON-X100 em diferentes concentrações.

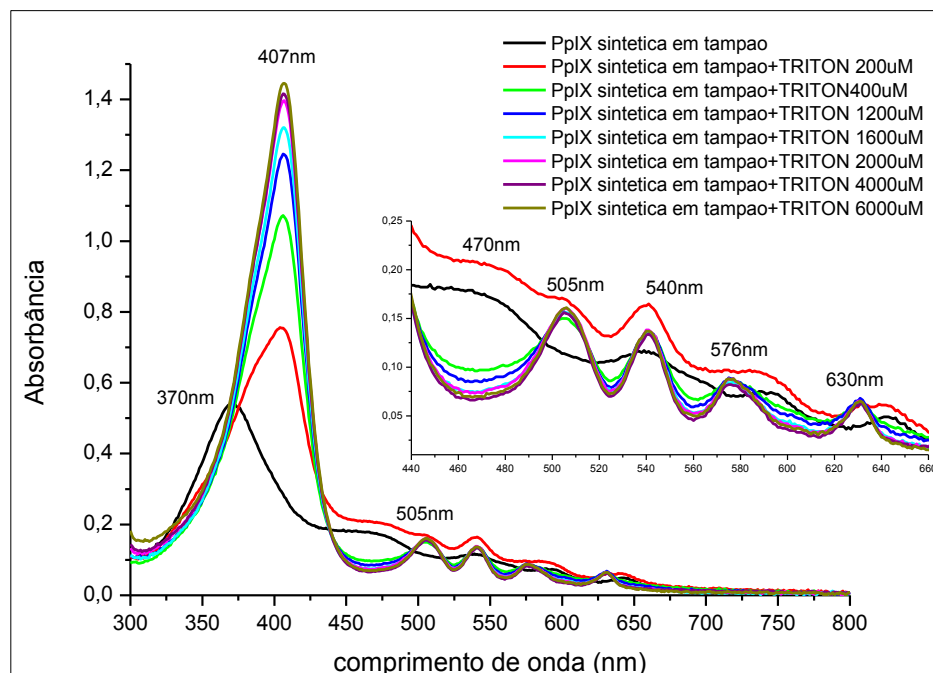


Figura 28. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de TRITON-X100 em diferentes concentrações.

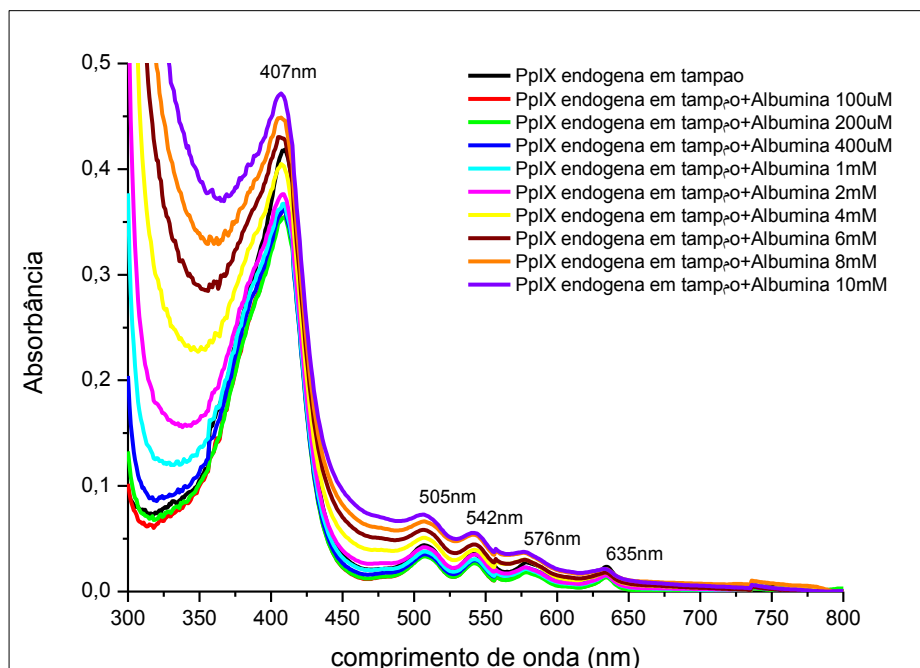


Figura 29. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de Albumina de soro bovino em diferentes concentrações.

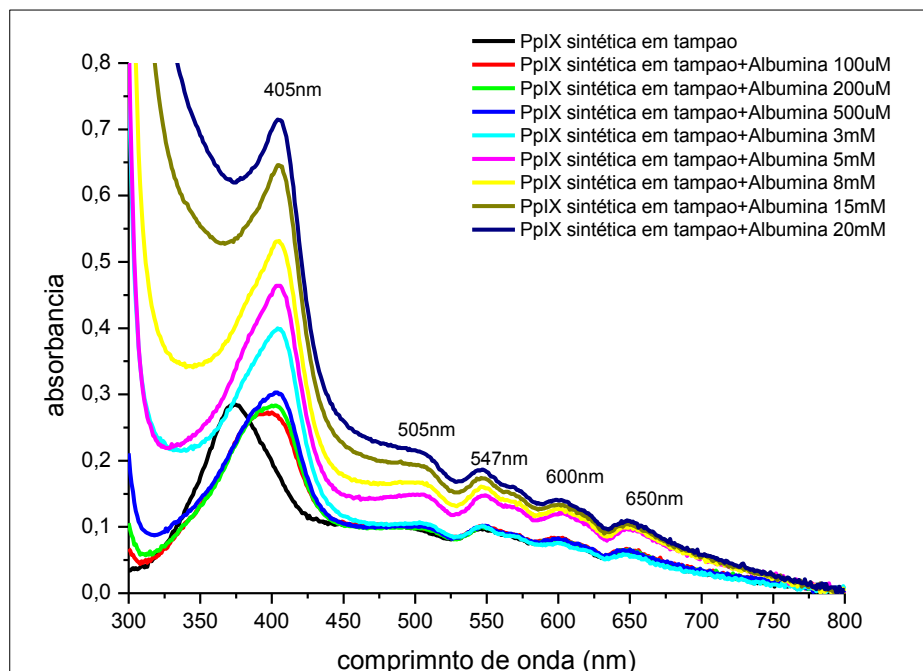


Figura 30. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de Albumina de soro bovino em diferentes concentrações.

Pode se ver que o espectro da PpIX endógena, na presença de surfactantes e ASB, sofre as mudanças pequenas em seu espectro de absorção refletido em pequeno aumento da absorção em toda a região de absorção. Finalmente, os espectros de absorção coincidem com os em soluções não aquosas. Entretanto, na presença de micelas de SDS, formadas por surfactantes aniônico, além de aumento de absorção foi observada a formação de dois novos picos de absorção em $\lambda=480\text{nm}$ e em $\lambda\approx 647\text{nm}$.

Já a PpIX sintética, na presença de micelas formadas por surfactantes catiônico (CTAB) e não iônicos (TRITON-X100), e da proteína ASB, teve seu espectro transformado para a forma obtida em soluções não aquosas ou o espectro de PpIX endógena. Enquanto que, na presença de micelas formadas por surfactantes aniônicos (SDS), semelhante com PpIX endógena, foi observada a formação dos picos em $\lambda=480\text{nm}$ e em $\lambda\approx 645\text{nm}$. Na presença de micelas formadas por surfactantes zwitteriônicos (HPS) houve também o aparecimento de dois picos em $\lambda=604\text{nm}$ e $\lambda=650\text{nm}$.

As Figuras 31 até 36 mostram os espectros de emissão de fluorescência das amostras de PpIX endógena e sintética na presença de surfactantes e de ASB.

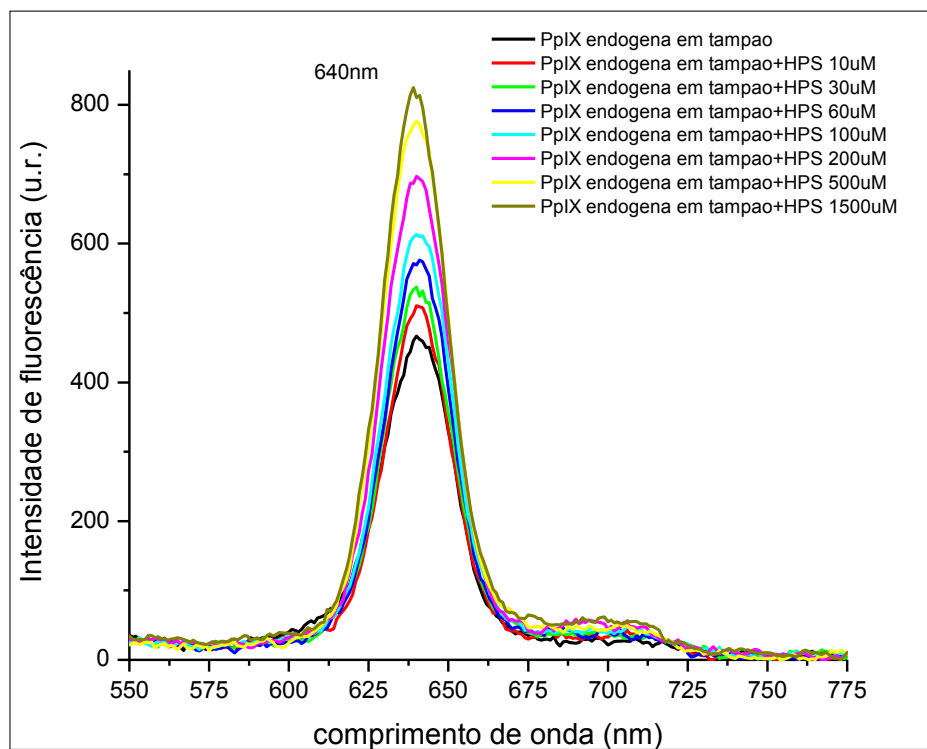


Figura 31. Espectro de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de HPS em diferentes concentrações.

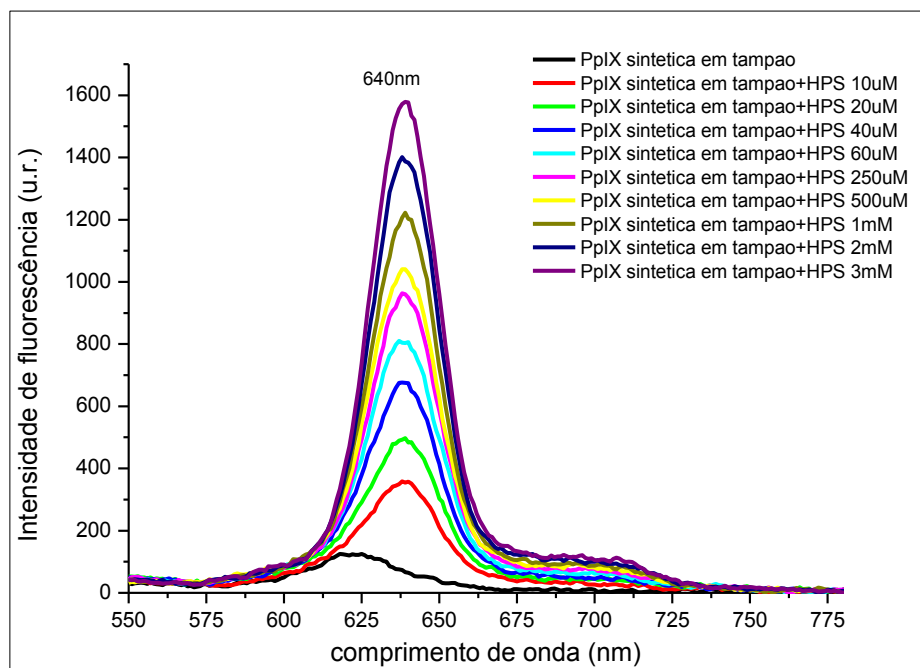


Figura 32. Espectro de emissão de fluorescência excitada em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de HPS em diferentes concentrações.

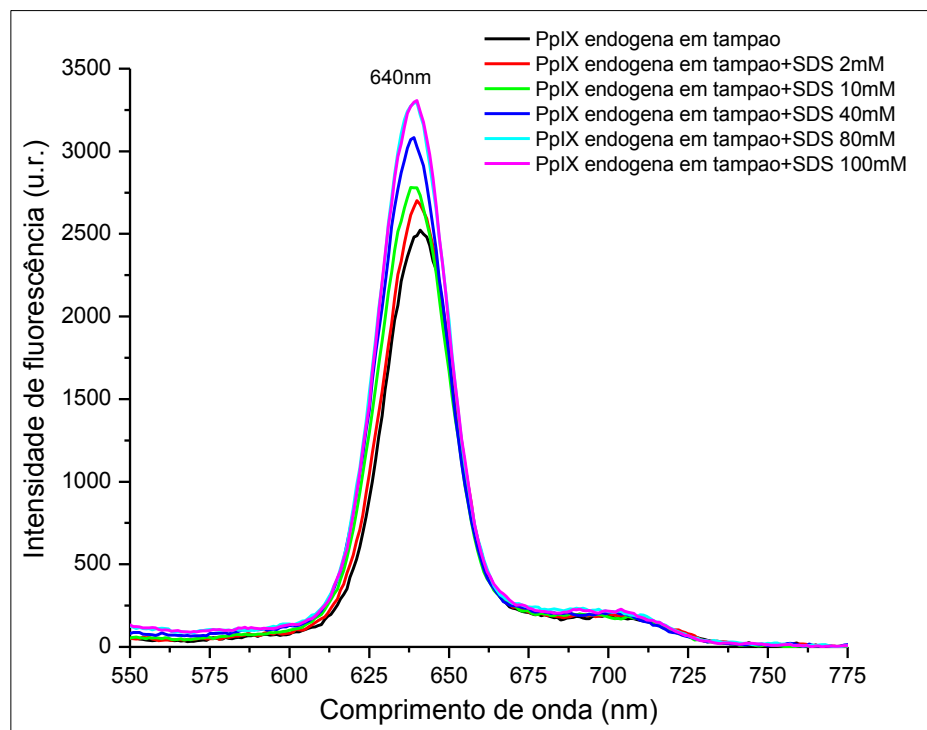


Figura 33. Espectro de emissão de fluorescência excitado em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de SDS em diferentes concentrações.

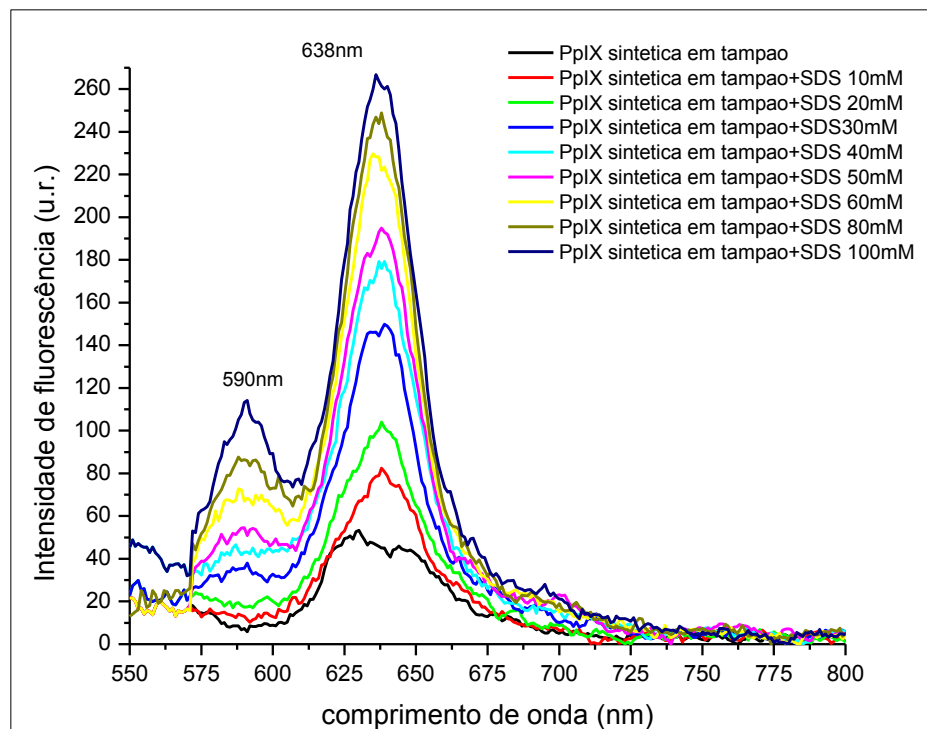


Figura 34. Espectro de emissão de fluorescência excitado em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de SDS em diferentes concentrações.

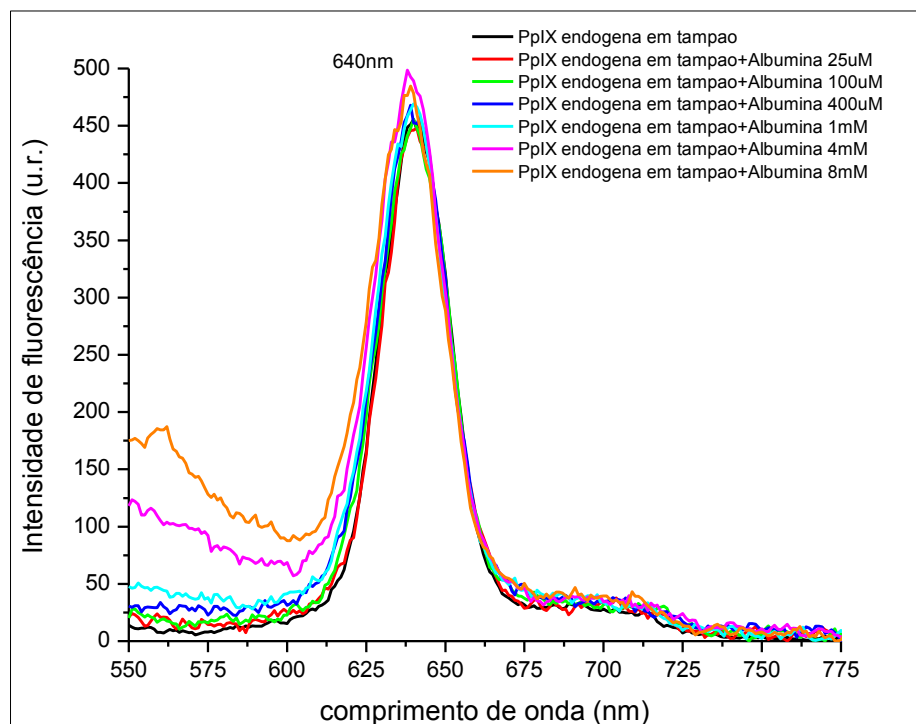


Figura 35. Espectro de emissão de fluorescência excitado em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX endógena em solução tampão fosfato na presença de Albumina de soro bovino em diferentes concentrações.

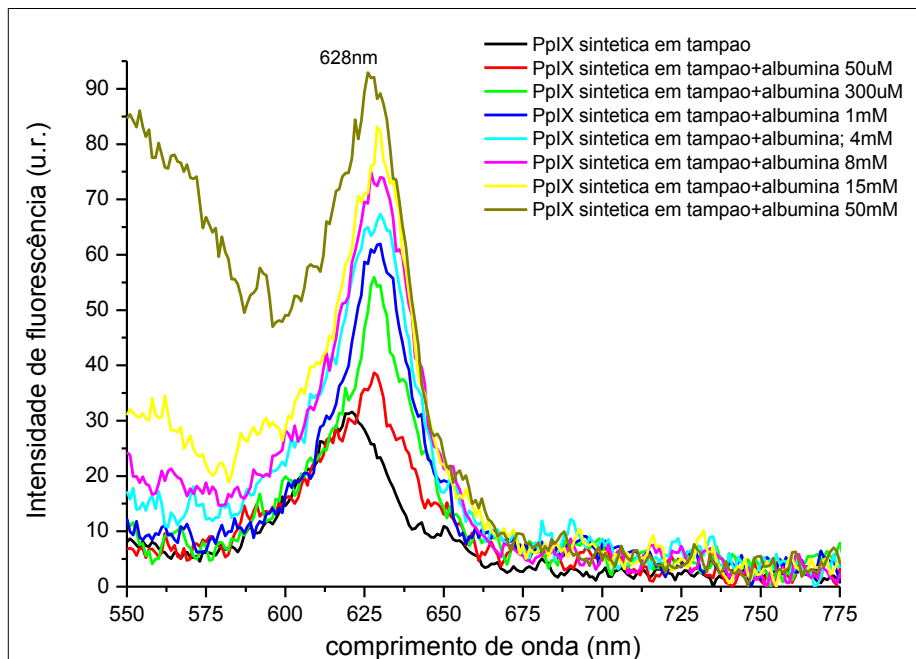


Figura 36. Espectro de emissão de fluorescência excitado em $\lambda=505\text{nm}$ da PpIX sintética em solução tampão fosfato na presença de Albumina de soro bovino em diferentes concentrações.

A adição de surfactantes e proteína ASB causaram o crescimento da intensidade da emissão da PpIX sintética e mudanças no perfil dos espectros de emissão de fluorescência, aproximando eles aos espectros da sua emissão em solventes não aquosas e o da PpIX endógena com pico característico em $\lambda \approx 640\text{nm}$. Na presença de micelas de SDS temos o surgimento de um pico de emissão em $\lambda = 590\text{nm}$. Já a PpIX endógena, não sofre mudanças do perfil do espectro mostrando apenas um aumento na intensidade da emissão de fluorescência. O deslocamento do pico de emissão observado com a adição de ASB está associado com a contribuição do espalhamento da luz induzido pela ASB em altas concentrações.

Com a análise da intensidade integral dos espectros da emissão em função da concentração de micelas e de ASB obtiveram-se as constantes da ligação das PpIX sintética e endógena com as micelas e ASB utilizando a equação [36]

$$\frac{1}{F - F_{min}} = \frac{1}{F_{max} - F_{min}} + \frac{1}{F_{max} - F_{min}} * \frac{1}{k[M]} \quad (15)$$

Onde:

- F é a intensidade de fluorescência na presença de micelas ou ASB em concentração $[M]$ na solução;
- F_{min} é a intensidade de fluorescência na ausência de estrutura biomiméticas;
- F_{max} é a intensidade máxima que a fluorescência deve atingir quando $[M]$ se passa para infinito.
- $k(\text{M}^{-1})$ é a constante de ligação da PpIX com a micela ou ASB.

Nesse caso, a concentração $[M]$ de micelas foi calculada como:

$$[M] = \frac{[\text{Surf}] - \text{CMC}}{n}$$

Onde [Surf] é a concentração do surfactante, CMC é sua concentração micelar crítica e n é o número de agregação. A análise foi feita somente para $[\text{Surf}] > \text{CMC}$.

Nas Figuras 37 até 46 estão apresentadas as dependências $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ assim como seus respectivos ajustes lineares.

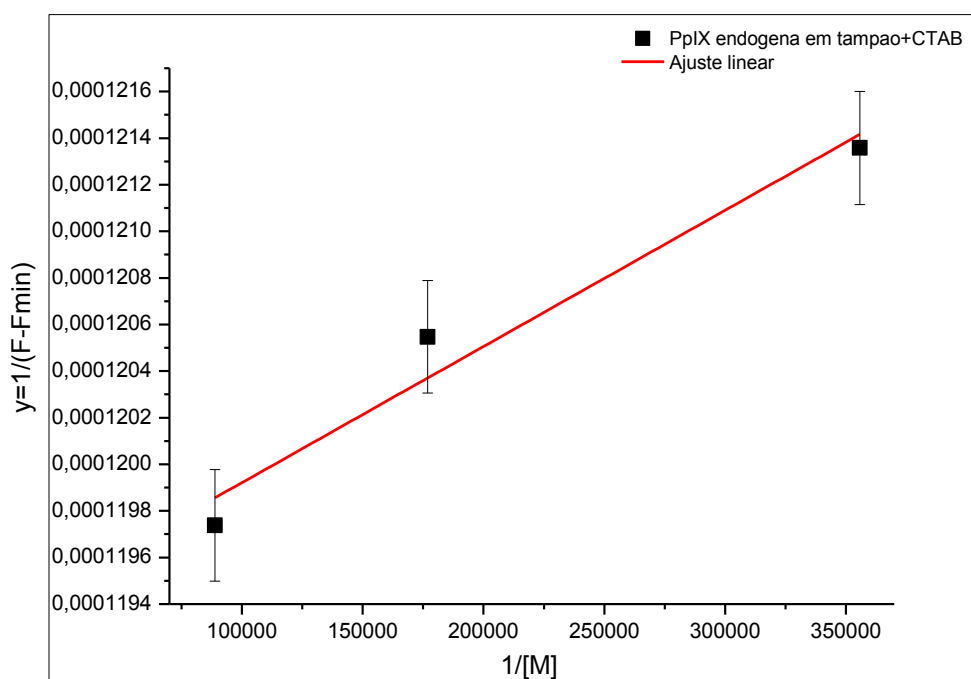


Figura 37. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para CTAB e PpIX endógena.

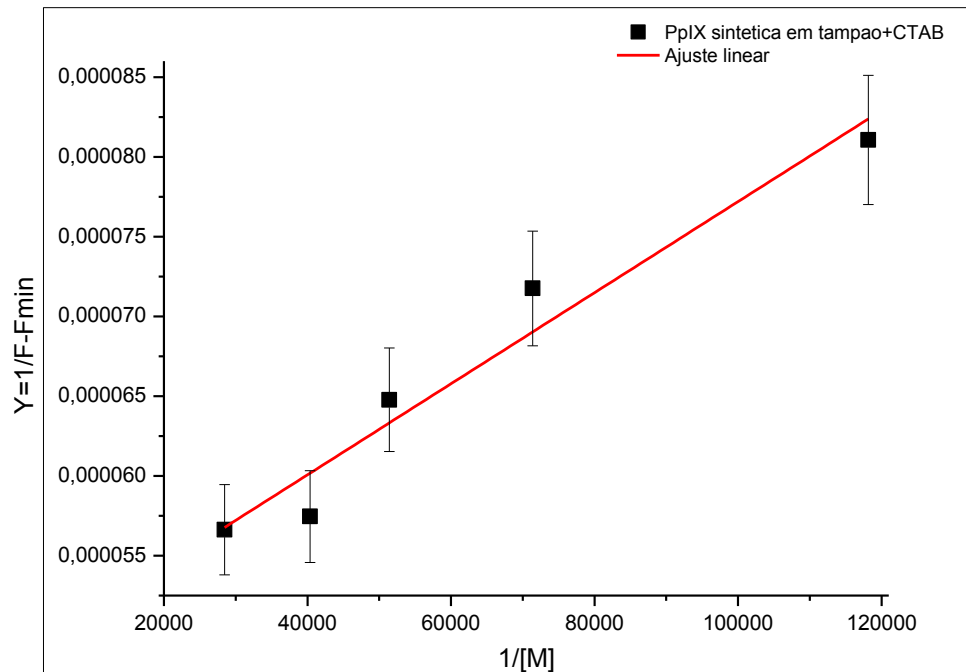


Figura 38. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para CTAB e PpIX sintética em solução tampão fosfato.

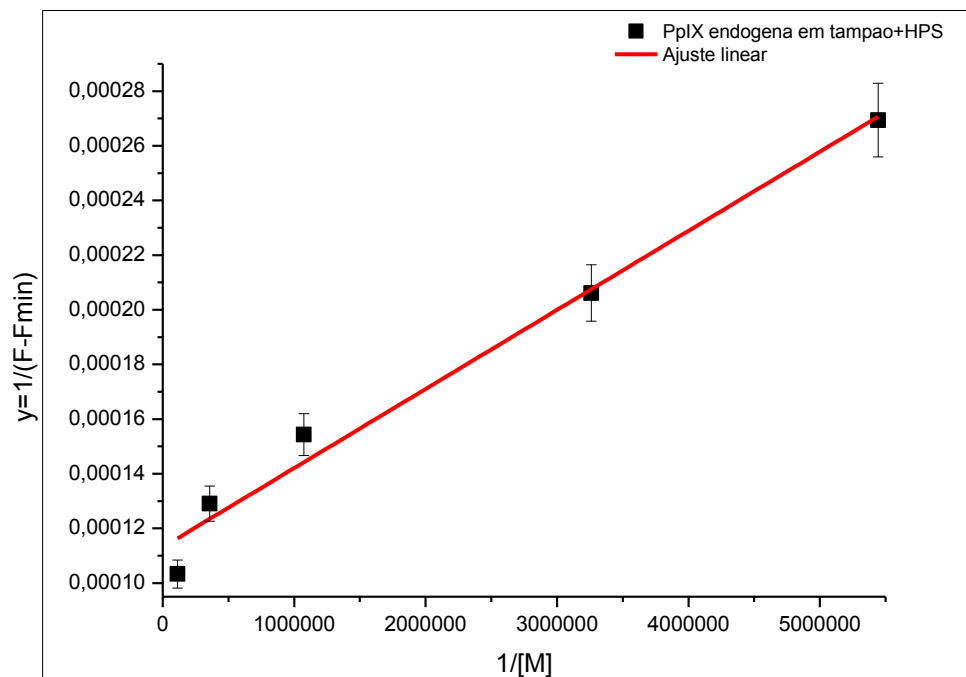


Figura 39. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para HPS em PpIX endógena em solução tampão fosfato.

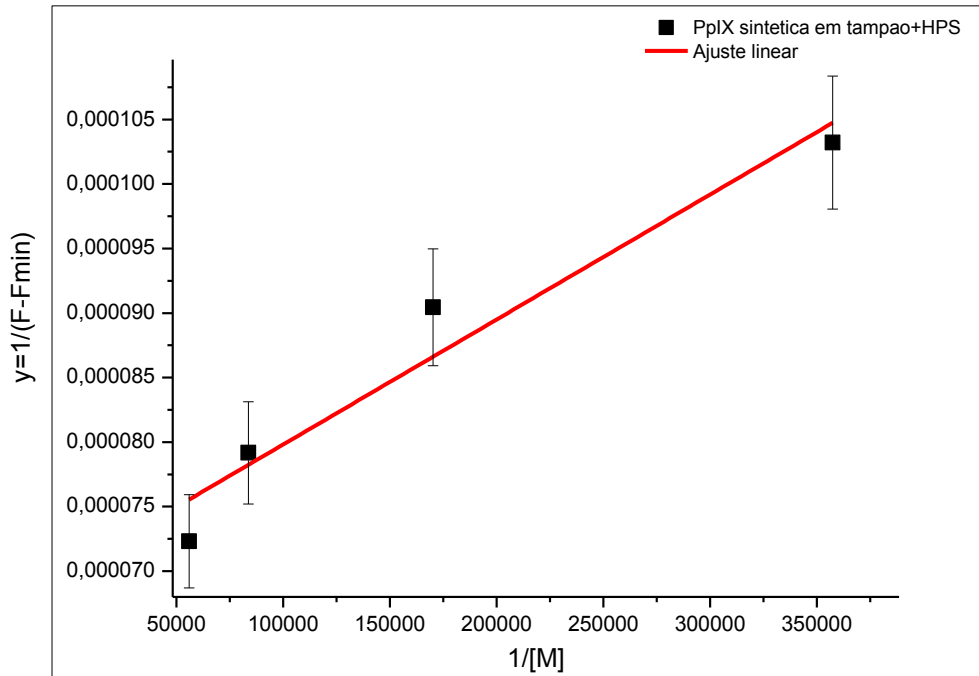


Figura 40. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para HPS em PpIX sintética em solução tampão fosfato.

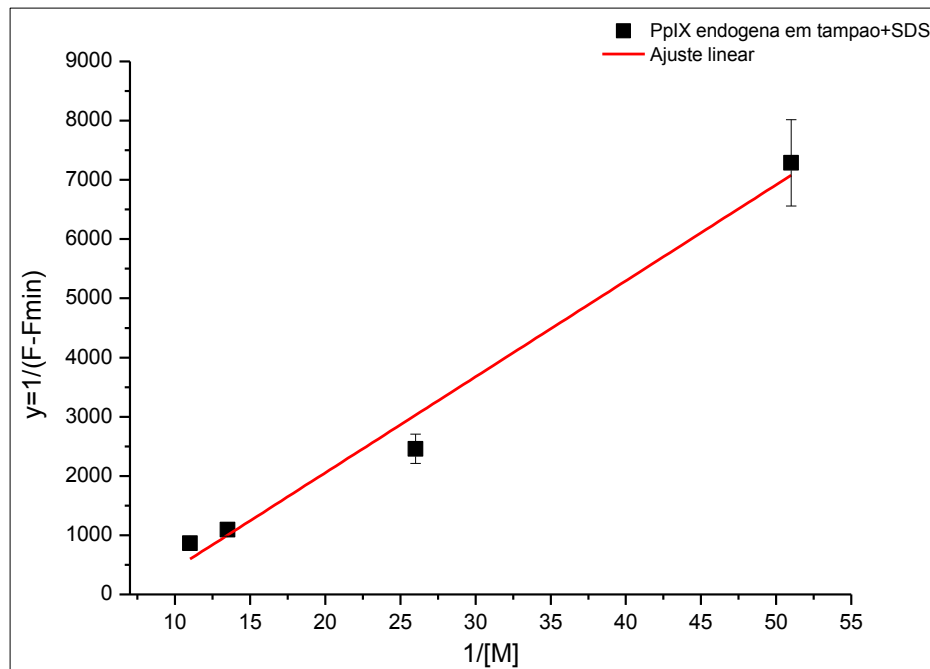


Figura 41. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para SDS em PpIX endógena em solução tampão fosfato.

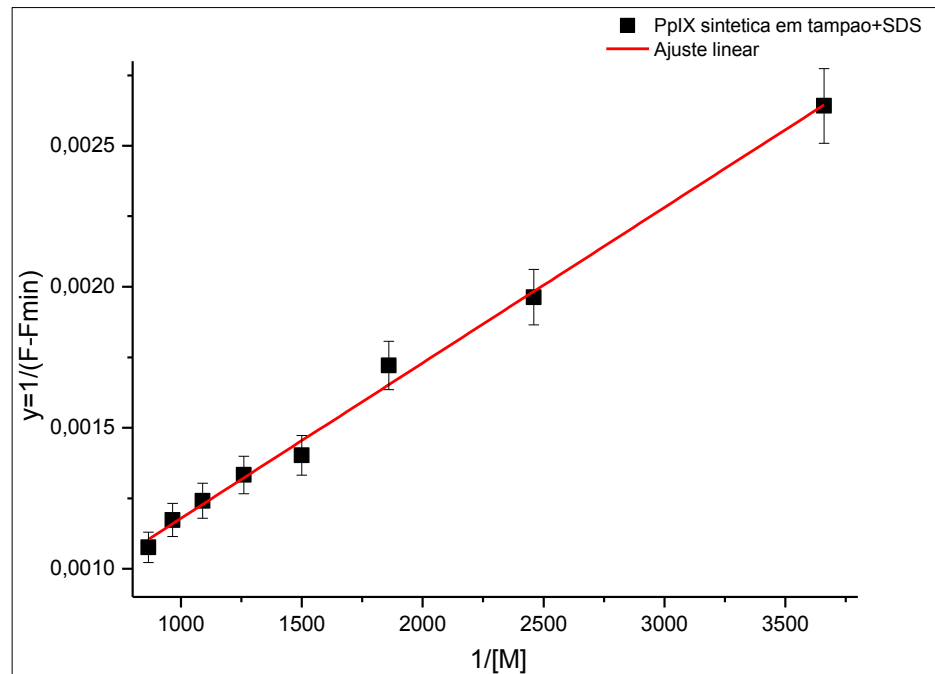


Figura 42. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para SDS em PpIX sintética em solução tampão fosfato.

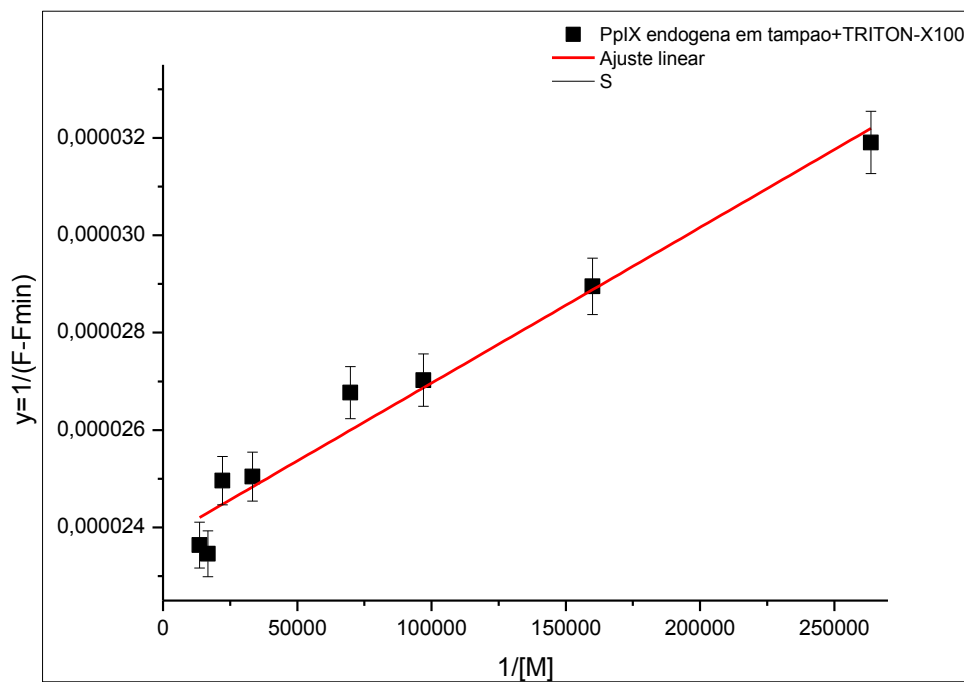


Figura 43. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para TRITON-X100 em PpIX endógena em solução tampão fosfato.

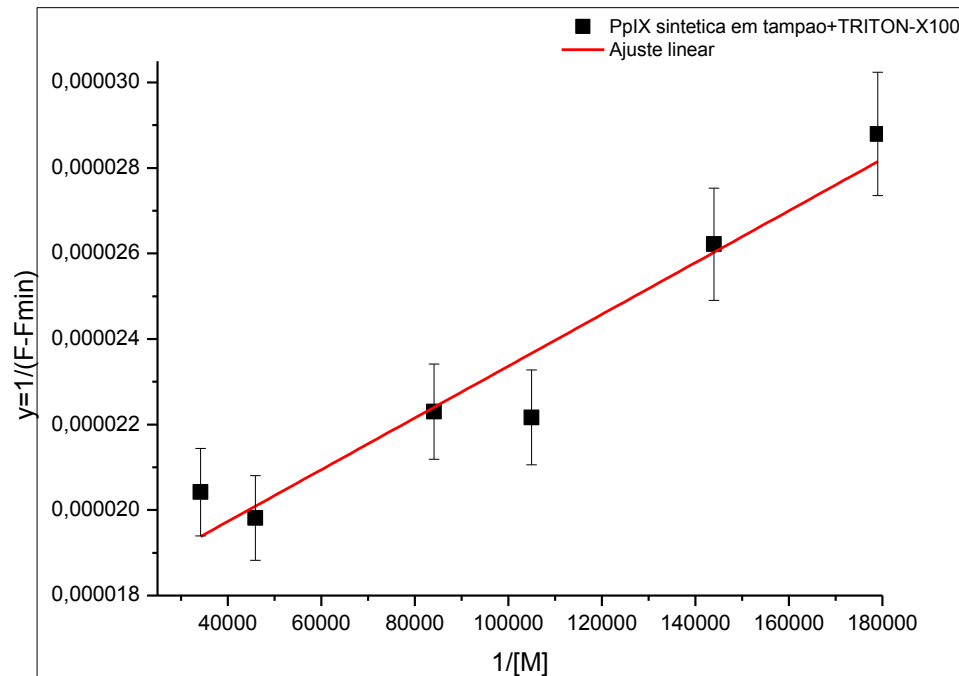


Figura 44. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para TRITON-X100 em PpIX sintética em solução tampão fosfato.

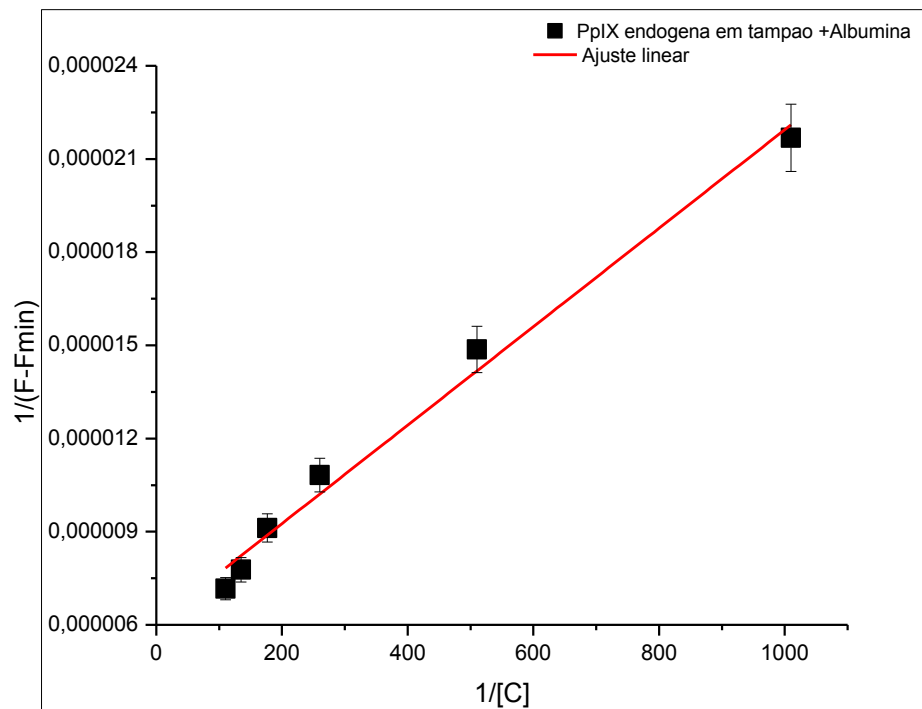


Figura 45. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para albumina de soro bovino em PpIX endógena em solução tampão fosfato.

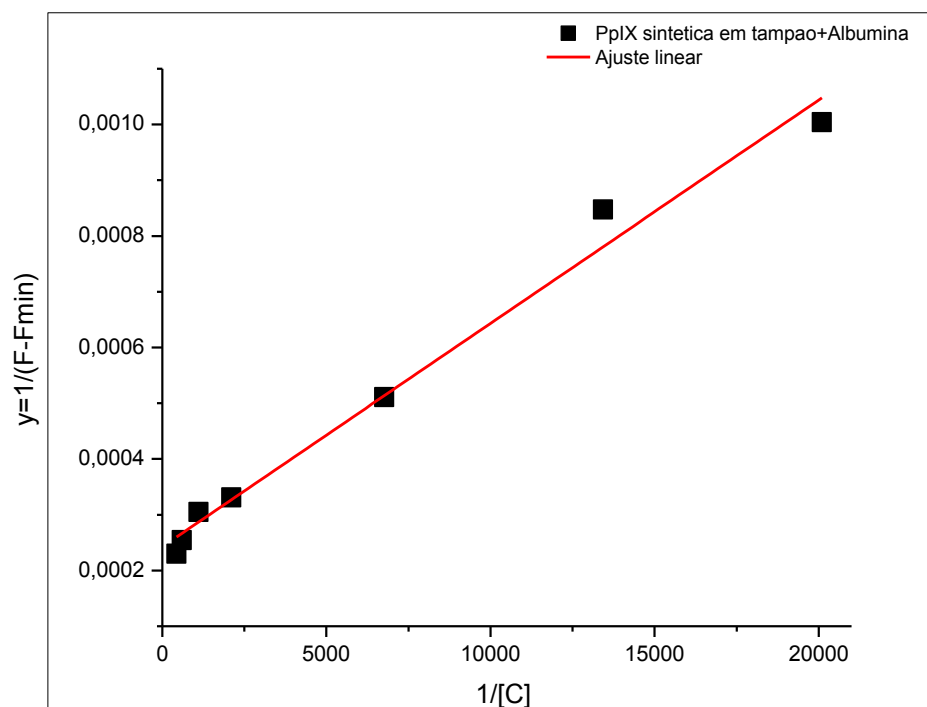


Figura 46. Ajuste linear da dependência $\frac{1}{F - F_{\min}} \leftrightarrow \frac{1}{[M]}$ para albumina de soro bovino em PpIX sintética em solução tampão fosfato.

Os valores calculados de k estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores calculados da constante de ligação (k) da PpIX endógena e sintética com micelas e proteína ASB em solução tampão fosfato e seus respectivos desvios quadráticos.

	cargas	PpIX sintética	PpIX endógena
Albumina	-----	$(6,1 \pm 0,3) \times 10^3$	$(3,8 \pm 0,2) \times 10^2$
CTAB	catiônica	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^5$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^7$
HPS	zwitteriônica	$(7,2 \pm 0,4) \times 10^5$	$(3,9 \pm 0,2) \times 10^6$
SDS	aniônica	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^2$	$(7,3 \pm 0,4) \times 10^2$
TRITON-X	Não iônica	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^5$	$(7,4 \pm 0,4) \times 10^5$

Pode se ver que para todos os surfactantes o valor k é maior para PpIX endógena, enquanto que, para ASB o maior valor de k foi observado para PpIX

sintética. Esses fatos estão em concordância com a sugestão de que a PpIX endógena existe em forma de um complexo com algumas estruturas anfifílicas, as quais aumentam sua afinidade com as micelas.

Em caso da ASB estas estruturas dificultam a ligação da PpIX com os sítios de ligação da ASB, enquanto que, a PpIX sintética não tem esses obstáculos.

Na interação de surfactante catiônico (CTAB), valor k alto, já na interação com surfactante aniônico (SDS) obteve-se um k de valor baixo. Isso nos mostra a importância da interação eletrostática entre a PpIX, que possui carga líquida -2, e sistemas nano-organizados carregados. Esse efeito é importante tanto para PpIX sintética quanto endógena. Porém, valores altos de k para a interação com surfactantes zwitteriônicos (HPS) e não iônicos (TRITON X-100) mostram a importância das interações não eletrostáticas.

De acordo com as mudanças observadas, nos espectros de absorção e nos espectros de emissão de fluorescência, da PpIX na presença das estruturas biomiméticas estudadas, podemos dizer que a PpIX sintética na presença de micelas zwitteriônica, catiônica e não-iônica se encontra em ambiente não aquoso, enquanto que sua afinidade com micelas aniônicas é mais fraca devido à repulsão eletrostática entre a PpIX e micela, por este motivo a influência da água continua sendo alta nas características da porfirina.

Importante anotar que o espectro da fluorescência da PpIX, que se encontra diretamente nas glândulas Harderianas, é semelhante daqueles da PpIX ligada com micelas ou com ASB. Isso mostra que dentro de glândulas a PpIX se encontra em ambiente não aquoso, cujas características podem ser modeladas por estruturas utilizadas.

5.3 Fototransformação das PpIX endógena e sintética em meios homogêneos não aquoso e aquoso.

Nas Figuras 47 até 51 estão os espectros de absorção da PpIX endógena e sintética em soluções homogêneas em função do tempo da irradiação.

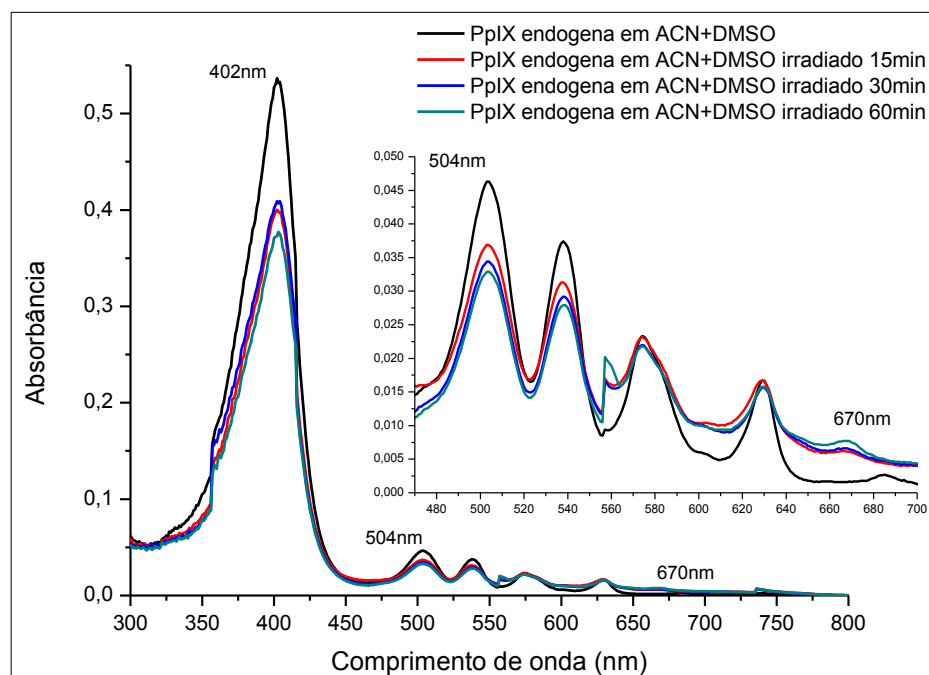


Figura 47. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) irradiado por 0, 15, 30 e 60 minutos.

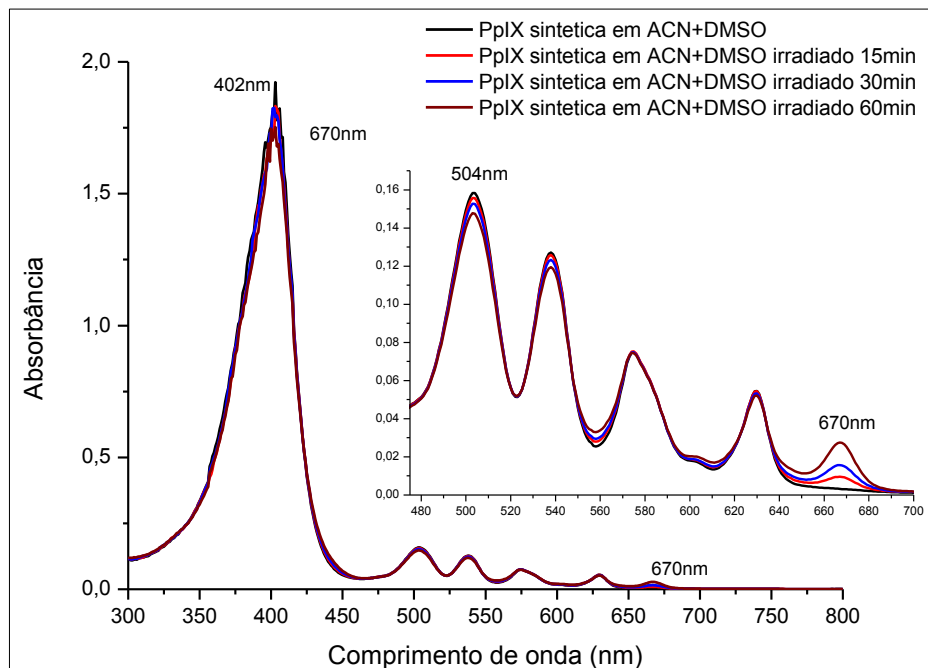


Figura 48. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) irradiado por 0, 15, 30 e 60 minutos.

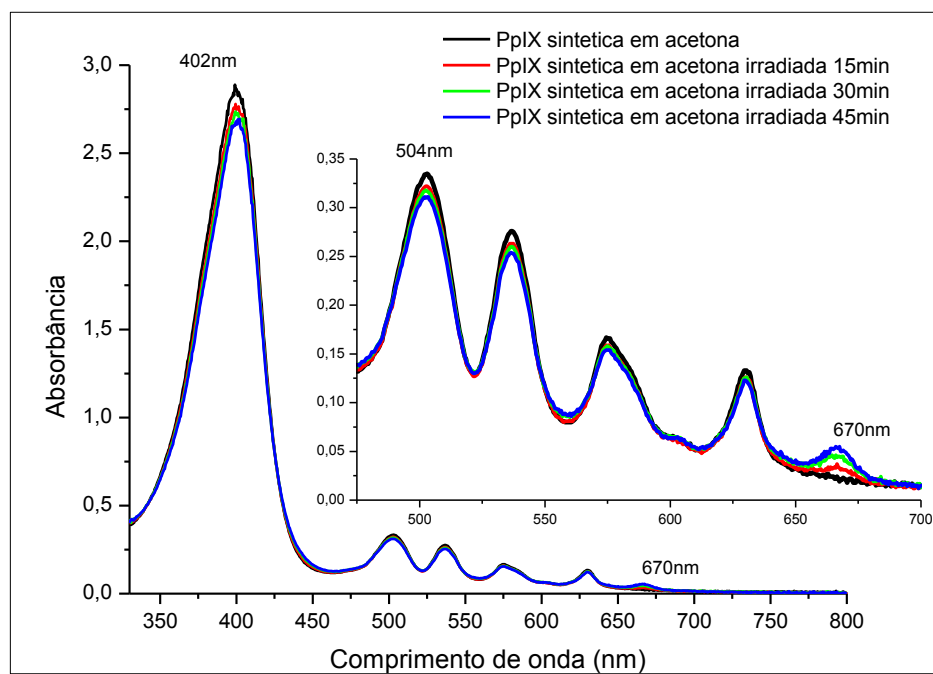


Figura 49. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de acetona irradiado por 0, 15, 30 e 45 minutos.

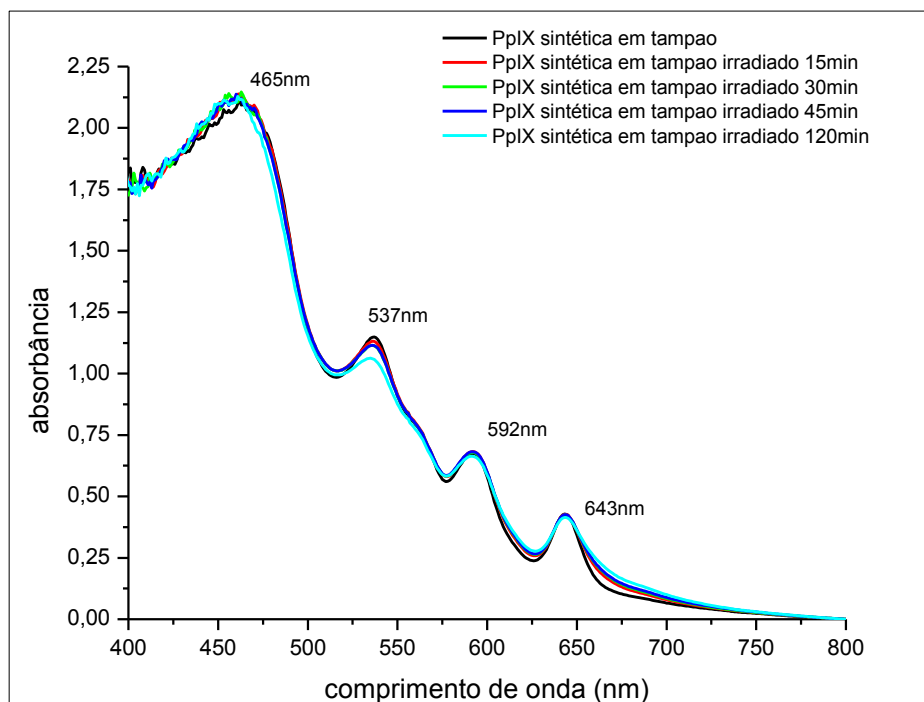


Figura 50. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão irradiado por 0, 15, 30, 45 e 120 minutos.

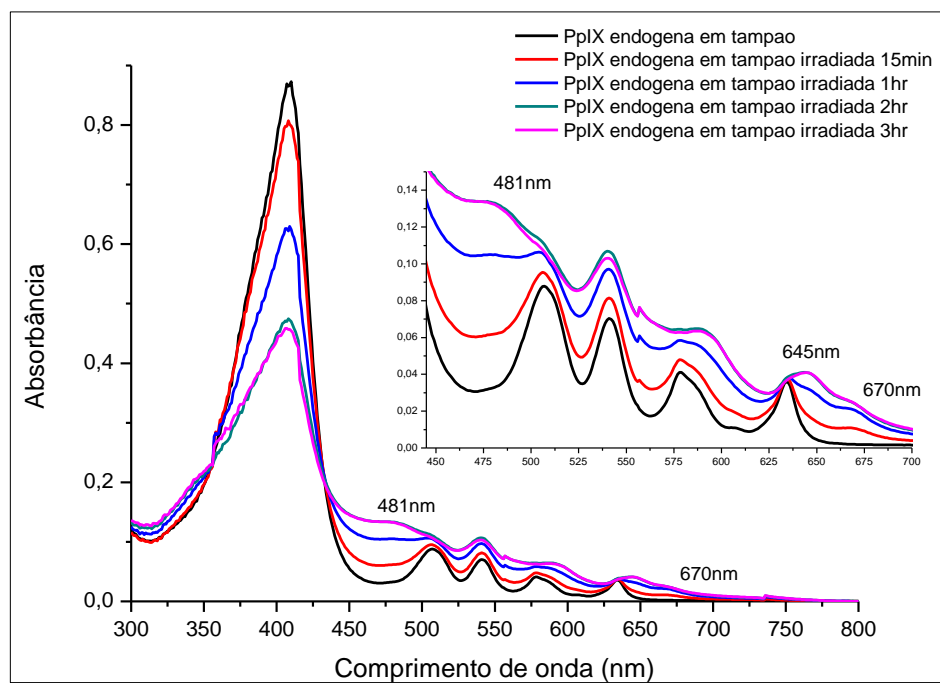


Figura 51. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão irradiado por 0, 15, 60, 120 e 180 minutos.

Pode ser visto nas figuras acima que as PpIX endógena e sintética em soluções não aquosas, ao irradiar com luz visível, observamos o surgimento de um novo pico de absorção em $\lambda \sim 670\text{nm}$ (Figuras 47, 48 e 49) em conjunto com a diminuição de outras bandas. Esse novo pico, é referente aos fotoprodutos formados durante a irradiação. Já a PpIX sintética em solução tampão, mesmo após longo tempo (>70 horas) [37] de irradiação não é observado mudanças significativas no espectro de absorção da porfirina nem a formação do pico referente ao fotoproduto. No caso da PpIX endógena, seu espectro de absorção antes da irradiação possui perfil igual àquela em solução não aquosa. Ao se irradiar, foi observada a diminuição da banda em $\lambda = 408\text{nm}$ ao longo do tempo. Além disso, observou-se o surgimento da banda de absorção do fotoproduto, mas com uma intensidade menor do que em meio não aquoso. Também observou-se o surgimento de um pico de absorbância em $\lambda = 481\text{nm}$ e o deslocamento das bandas de absorção em $\lambda = 576\text{nm}$ e 635nm para o vermelho, ambas mudanças foram observadas no espectro da PpIX endógena quando adicionado surfactante SDS. Essa semelhança pode ser associada com o efeito de destruição, tanto por luz como por SDS, da ligação da PpIX com os compostos anfífilicos com os quais a PpIX endógena está ligado. A atividade do SDS na destruição da membrana celular é bem conhecida [38].

Na Figura 52 estão apresentados os espectros de emissão de fluorescência da solução da PpIX sintética em ACD+DMSO com excitação no pico de absorção de fotoproduto em $\lambda = 670\text{nm}$.

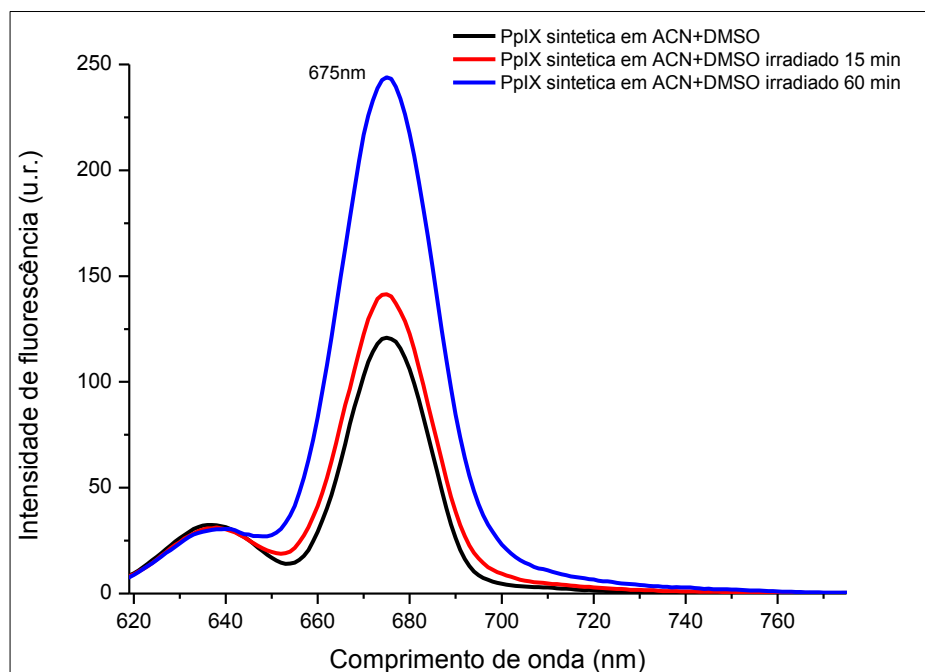


Figura 52. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução ACN+DMSO (3:1) com excitação em $\lambda=670\text{nm}$ irradiado por 0, 15 e 60 minutos.

Observou-se o aparecimento de uma nova banda de emissão com máximo em $\lambda=675\text{nm}$, que associamos com a fluorescência do fotoproduto.

Os espectros de excitação da fluorescência, da solução da PpIX sintética, em função do tempo de irradiação (Figura 53) mostraram o surgimento de mais duas novas bandas de absorção durante a irradiação em $\lambda=445\text{nm}$ e $\lambda=563\text{nm}$, as quais também associamos com a formação de fotoproduto.

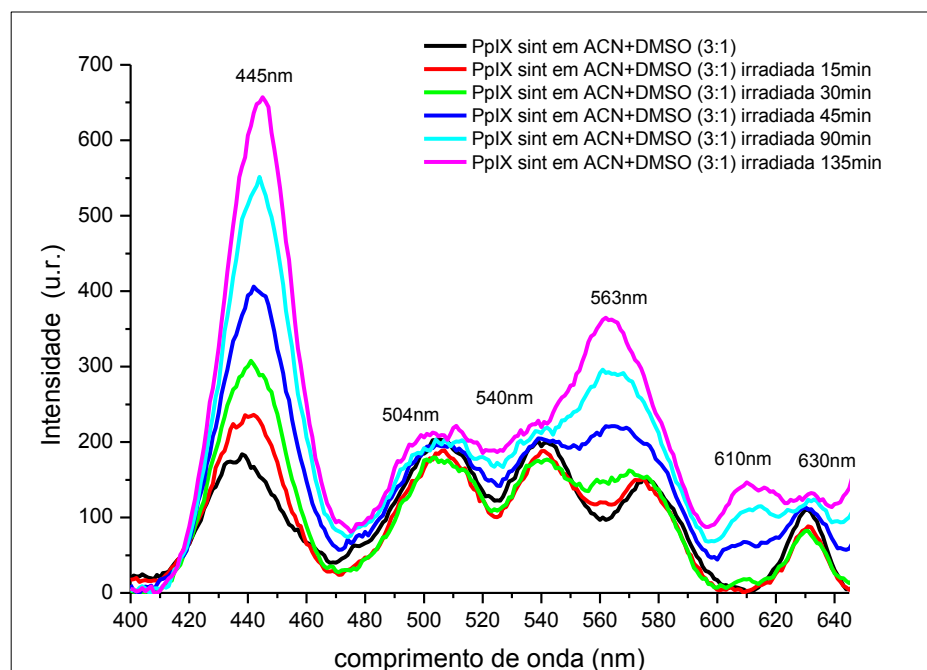


Figura 53. Espectro de excitação da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) com emissão em $\lambda=675\text{nm}$ irradiado por 0, 15, 30, 45, 90 e 135 minutos.

A própria PpIX também possui um pico de absorção em $\lambda=445\text{nm}$. Por isso, decidiu-se medir os espectros de emissão da fluorescência da solução, sob irradiação, usando a excitação em $\lambda=445\text{nm}$ a fim de observar as mudanças desses espectros em função do tempo de irradiação.

Nas Figuras 54 até a 56 estão apresentadas os espectros de emissão de fluorescência das PpIX endógena e sintética com excitação em $\lambda=445\text{nm}$.

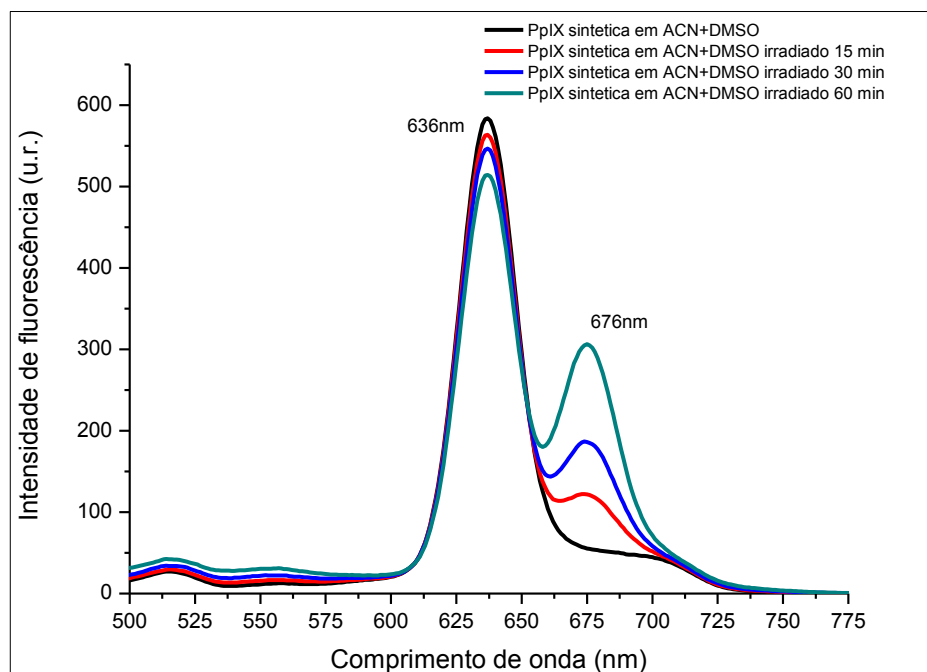


Figura 54. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 15, 30 e 60 minutos.

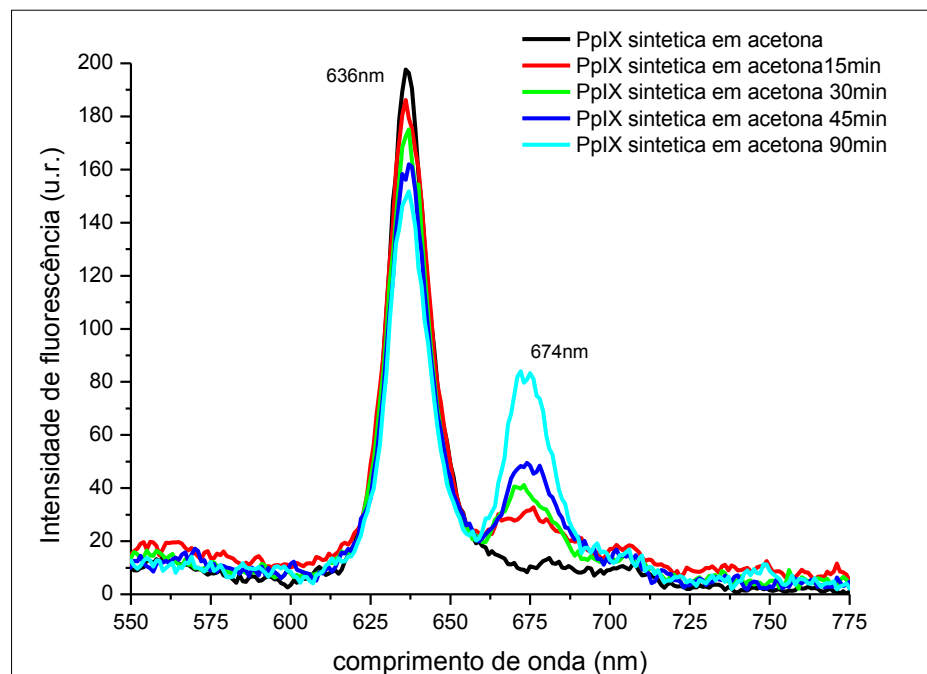


Figura 55. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de acetona com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 15, 30, 45 e 90 minutos.

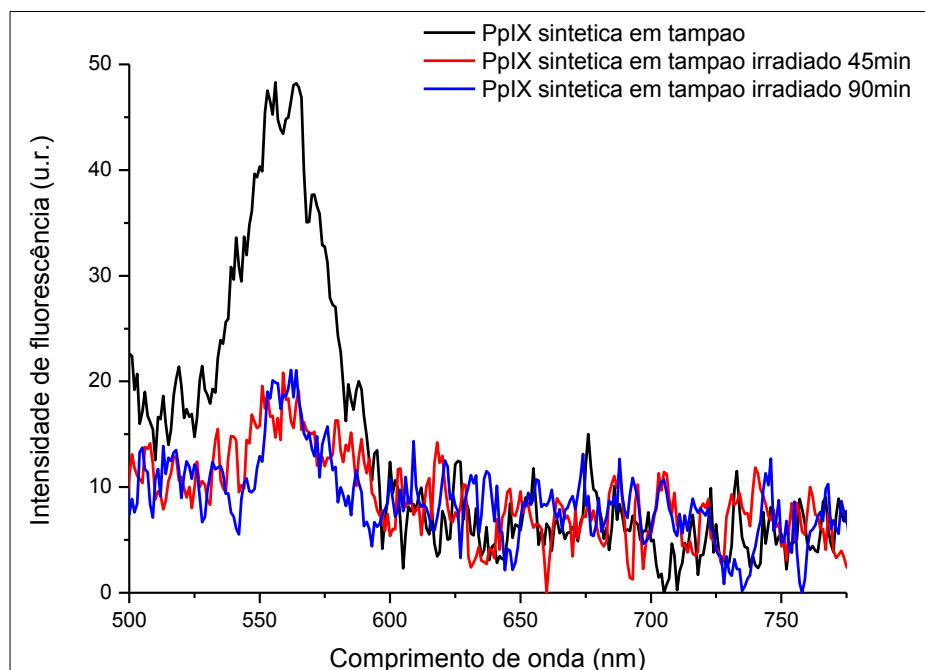


Figura 56. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de tampão com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 45 e 90 minutos.

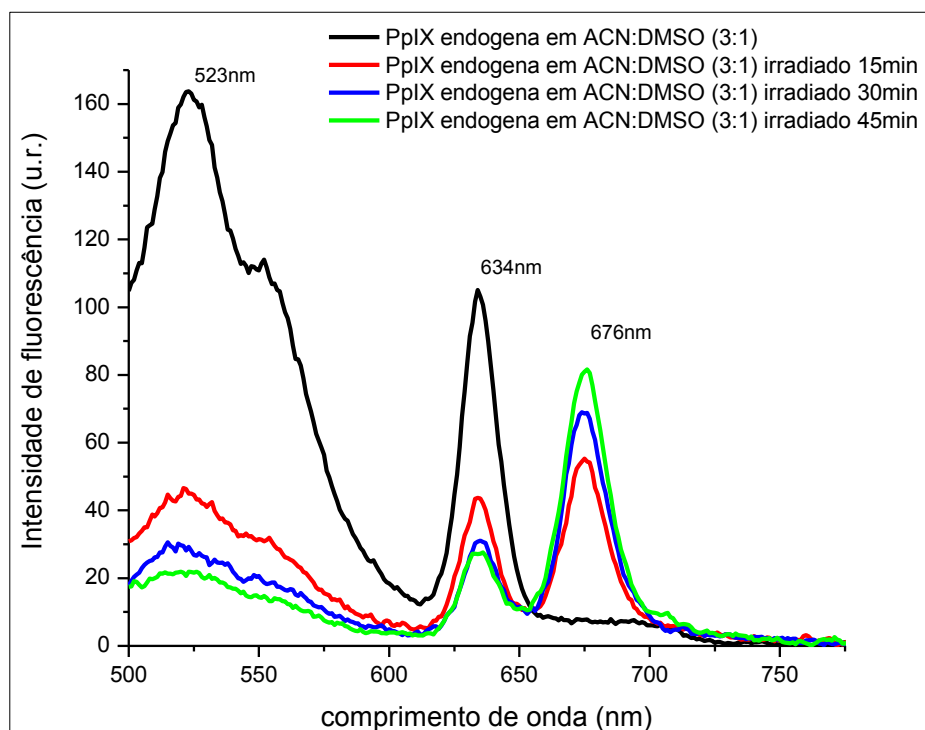


Figura 57. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 15, 30 e 45 minutos.

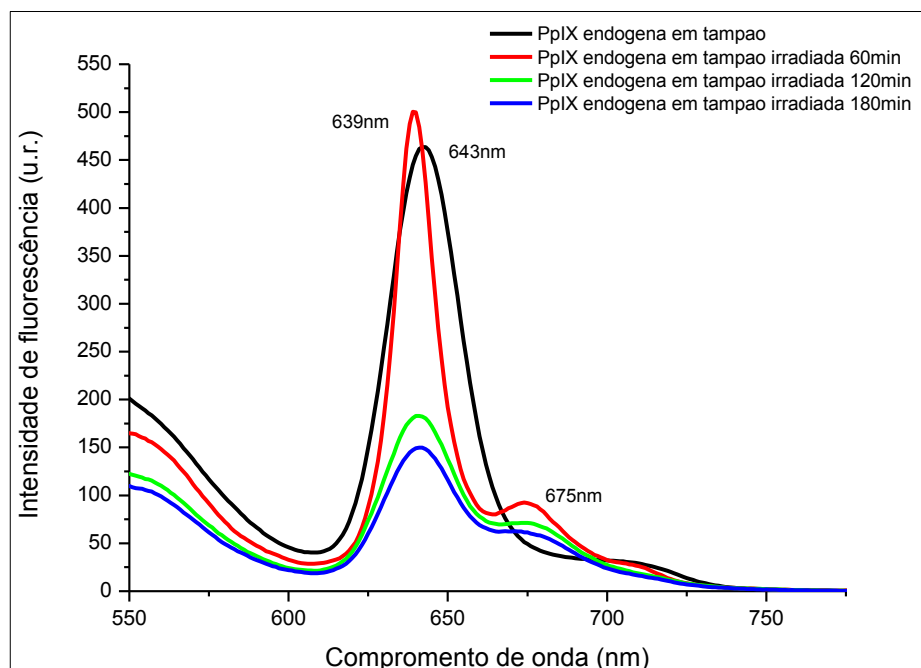


Figura 58. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de tampão com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 60, 120 e 180 minutos.

Observou-se que, em soluções não aquosas com aumento do tempo de irradiação o pico principal da fluorescência da PpIX sintética diminui, enquanto que, o pico de fotoproduto cresce simultaneamente. Importante de anotar que, o mesmo efeito foi observado quando a PpIX foi irradiada diretamente em glândulas harderianas [23]. Em solução tampão foi observada somente a diminuição da intensidade da fraca fluorescência da PpIX sem aparecimento de pico de fotoproduto.

Em caso da PpIX endógena observou-se efeito semelhante àquele em soluções não aquosas. Mas, além disso, foi observado um pico da fluorescência em $\lambda=523\text{ nm}$ que, provavelmente, está associado com outros compostos que formam complexo com PpIX extraída das glândulas. Entretanto, diferente da PpIX sintética, em solução aquosa, com 1 hora de irradiação temos uma mudança do perfil do espectro de emissão, com o decaimento da sua intensidade integral por fator 0,8, assim como o surgimento do pico em $\lambda=675\text{nm}$, referente ao fotoproduto. Entretanto, diferente do caso de soluções não aquosas, com seguinte aumento do

tempo de irradiação, observou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência de todo o espectro.

5.4 Fototransformação das PpIX endógena e sintética na presença de estruturas biomiméticas.

Nas Figuras 59 até 68 estão apresentados os espectros de absorção das PpIX endógena e sintética em solução tampão na presença de surfactantes e ASB, irradiados ao longo do tempo.

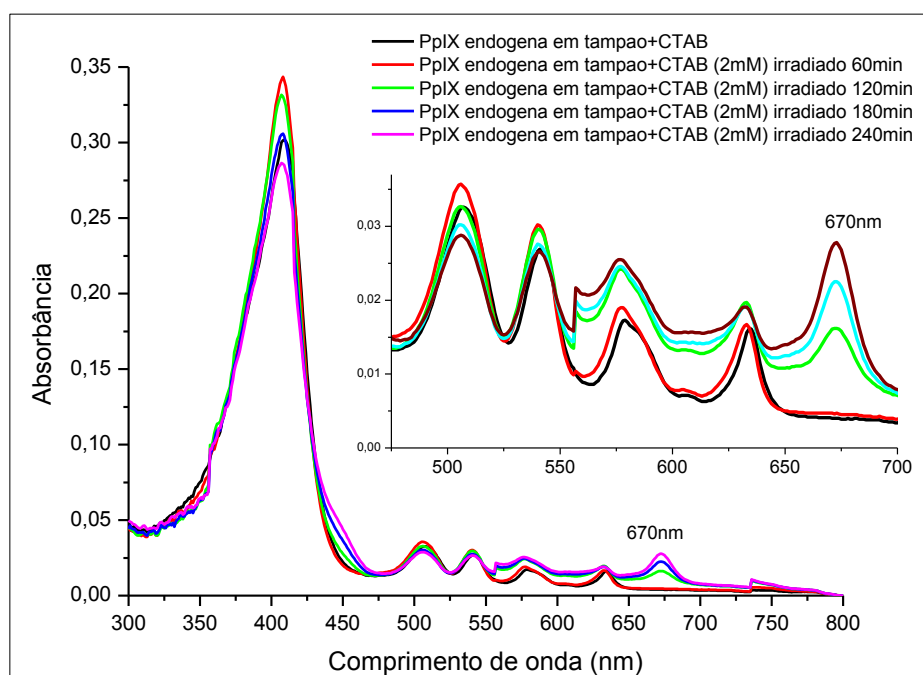


Figura 59. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de micelas de CTAB (2mM) irradiado por 0, 60, 120, 180 e 240 minutos.

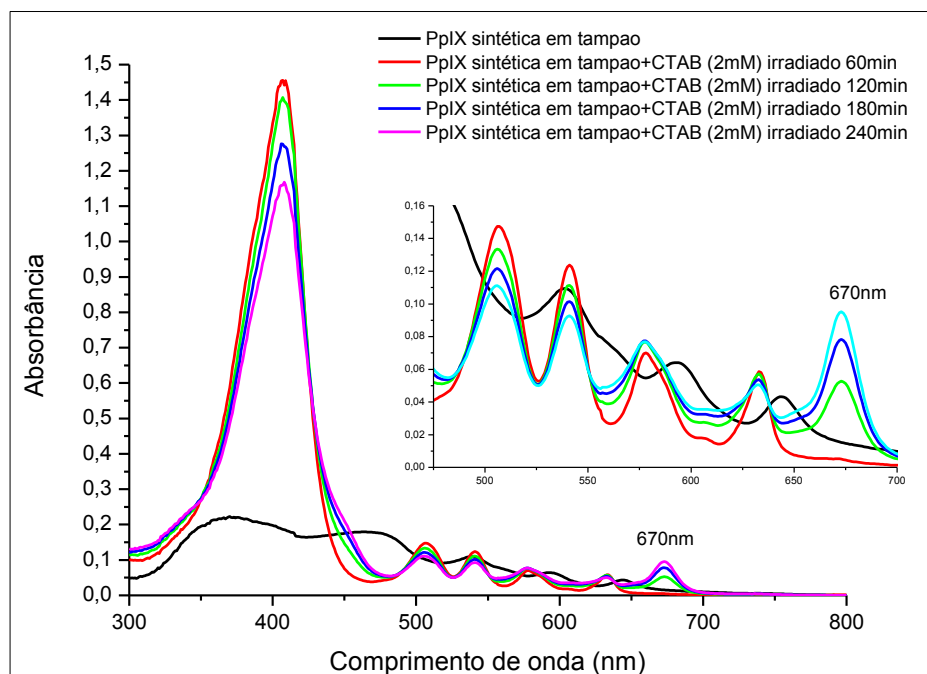


Figura 60. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de micelas de CTAB (2mM) irradiado por 0, 60, 120, 180 e 240 minutos.

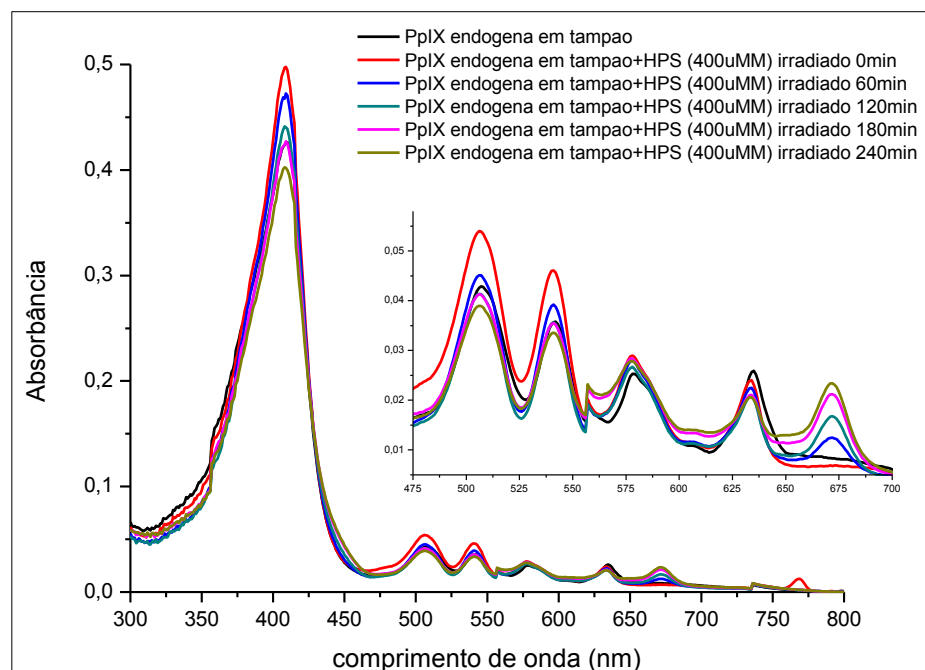


Figura 61. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de micelas de HPS (400uM) irradiado por 0, 60, 120, 180 e 240 minutos.

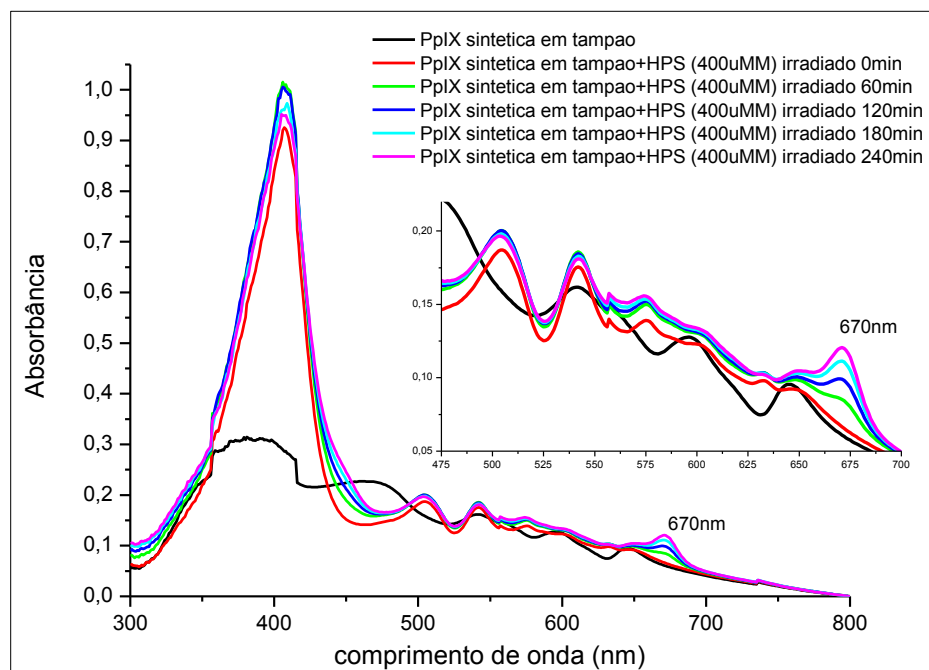


Figura 62. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de micelas de HPS (400uM) irradiado por 0, 60, 120, 180 e 240 minutos.

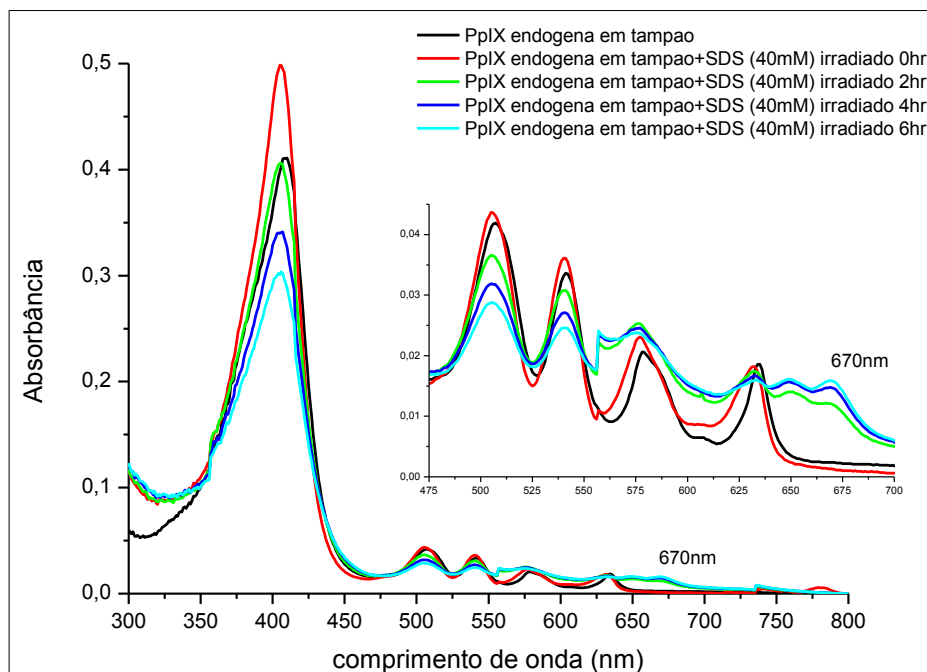


Figura 63. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de micelas de SDS (40mM) irradiado por 0, 120, 240 e 360 minutos.

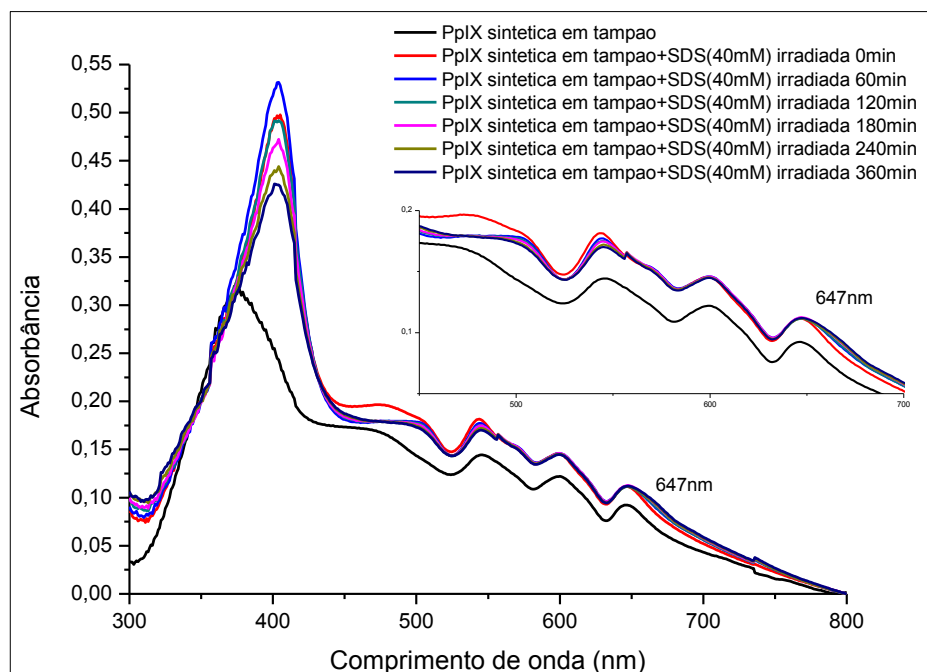


Figura 64. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de micelas de SDS (40mM) irradiado por 0, 60, 120, 180, 240 e 360 minutos.

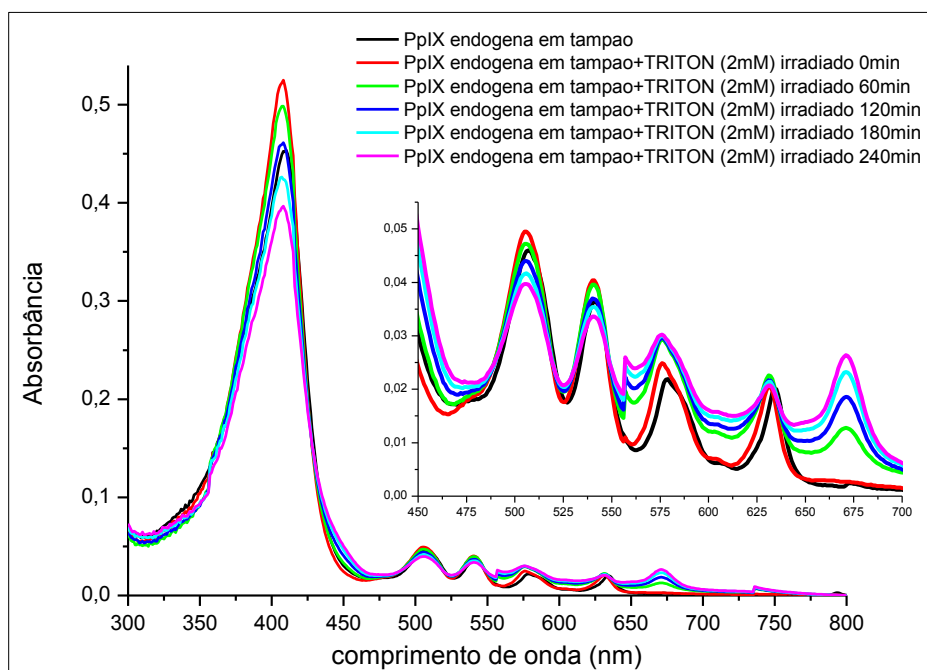


Figura 65. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de micelas de TRITON-X100 (2mM) irradiado por 0, 60, 120, 180, e 240 minutos.

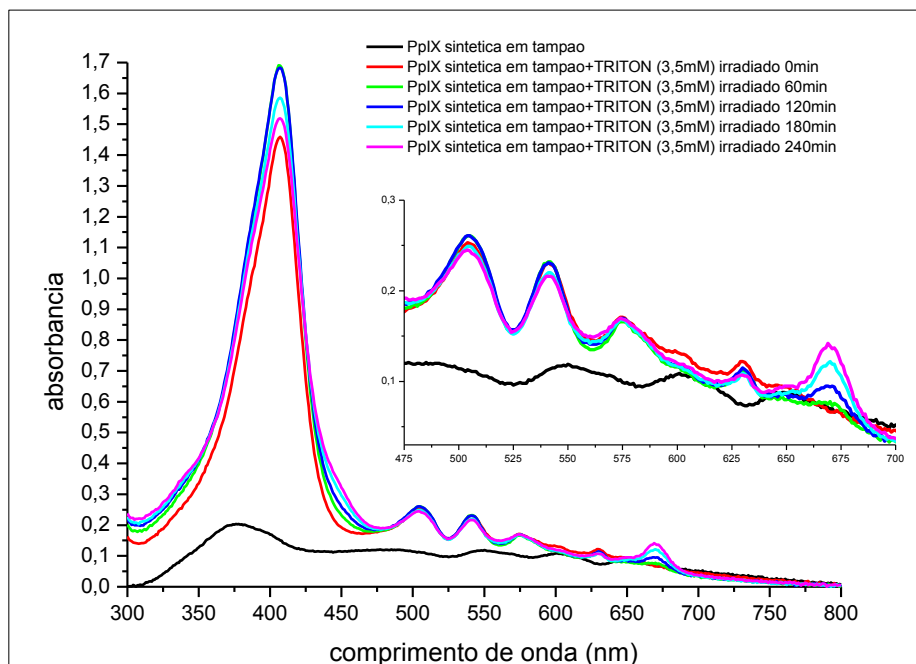


Figura 66. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de micelas de TRITON-X100 (3,5mM) irradiado por 0, 60, 120, 180, e 240 minutos.

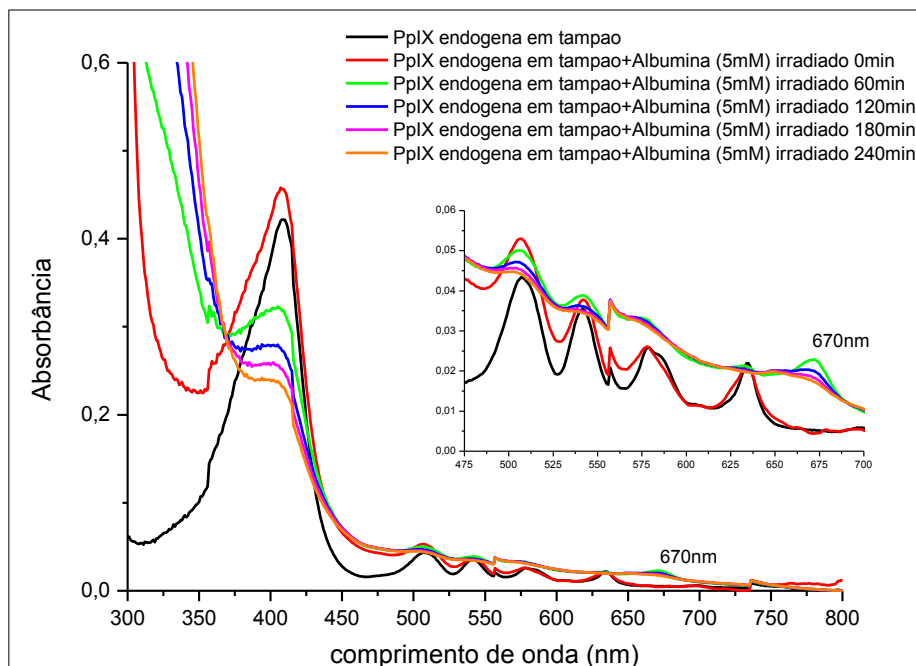


Figura 67. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de tampão na presença de ASB (5mM) irradiado por 0, 60, 120, 180, e 240 minutos.

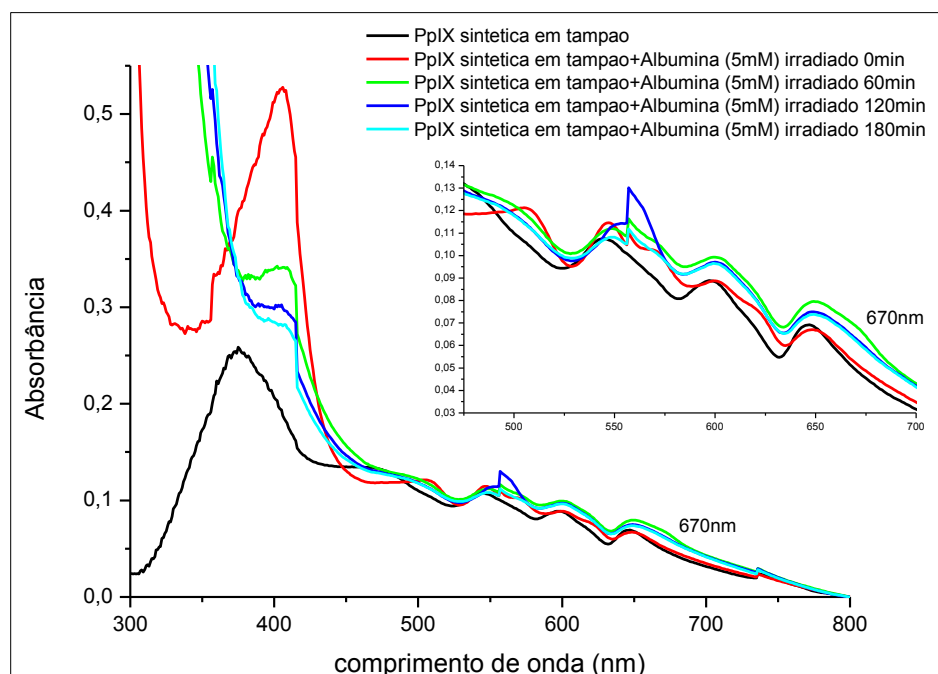


Figura 68. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de tampão na presença de ASB (5mM) irradiado por 0, 60, 120, e 180 minutos.

Das Figuras 59 até 68, podemos ver nos espectros de absorção, que com a irradiação da PpIX na presença de micelas, a fototransformação com a geração do fotoproduto indicado por aparecimento do pico de absorção em $\lambda=670\text{nm}$, ocorreu para quase todas as amostras como foi observado nos espectros de absorção da PpIX endógena e sintética em meio não aquoso ao serem irradiados. A exceção foi da PpIX sintética na presença de micelas de SDS que não houve o aparecimento do pico de absorbância em $\lambda=670\text{nm}$, indicando que não houve a síntese de fotoproduto, além disso, a fototransformação se deu de maneira muito branda, fato que pode ser notado pela ausência de grandes mudanças em seu espectro de absorção. Para PpIX endógena na presença de micelas SDS também observou-se os efeitos semelhantes àqueles observados em solução tampão. Esses fatos podem ser relacionados ao baixo valor de k obtido para a PpIX sintética e micelas de SDS, o que faz com que a PpIX permaneça em meio aquoso, e seu espectro com o perfil semelhante ao obtido para a PpIX em solução tampão irradiado (Figuras 50 e 51). Além disso, é conhecido que as micelas de

SDS contem maior quantidade da água na sua estrutura se comparar com outras micelas.

Na irradiação da PpIX na presença de ASB (Figuras 67 e 68), também houve a fototransformação do FS e a síntese de fotoproduto, porém, na PpIX sintética notamos o surgimento do pico em $\lambda=670$, referente ao fotoproduto, enquanto que, se continuar a ser irradiação por mas tempo, podemos notar uma diminuição do mesmo. Isso pode ser devido à atividade do FS que destrói a ligação existente entre a PpIX e ABS.

Nas Figuras 69 até 78 estão apresentados os espectros de emissão de fluorescência da PpIX endógena e sintética na presença de micelas e ASB, irradiadas ao longo do tempo, com excitação em $\lambda=445\text{nm}$.

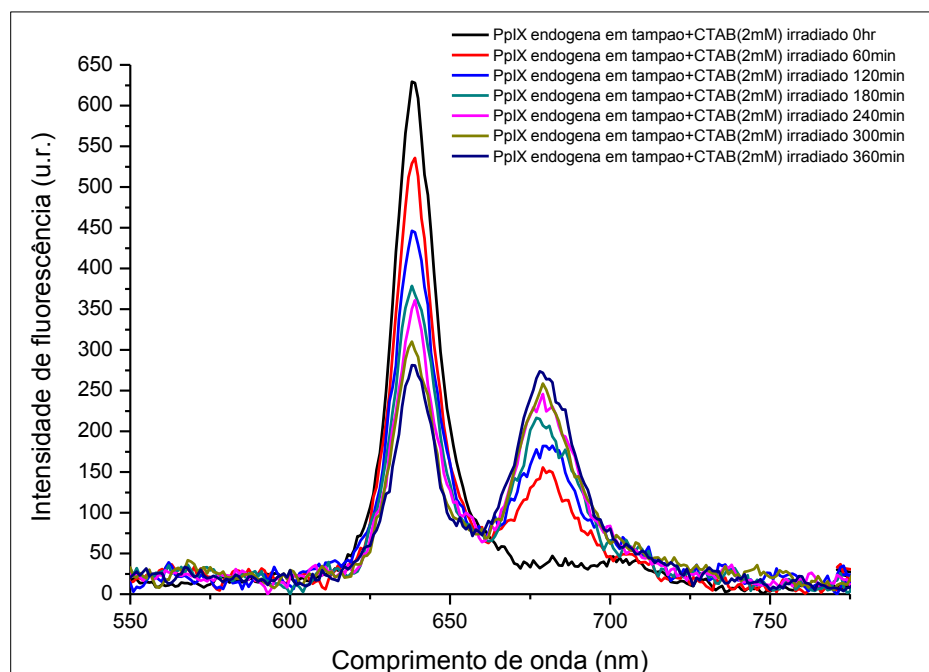


Figura 69. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de CTAB (2mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos.

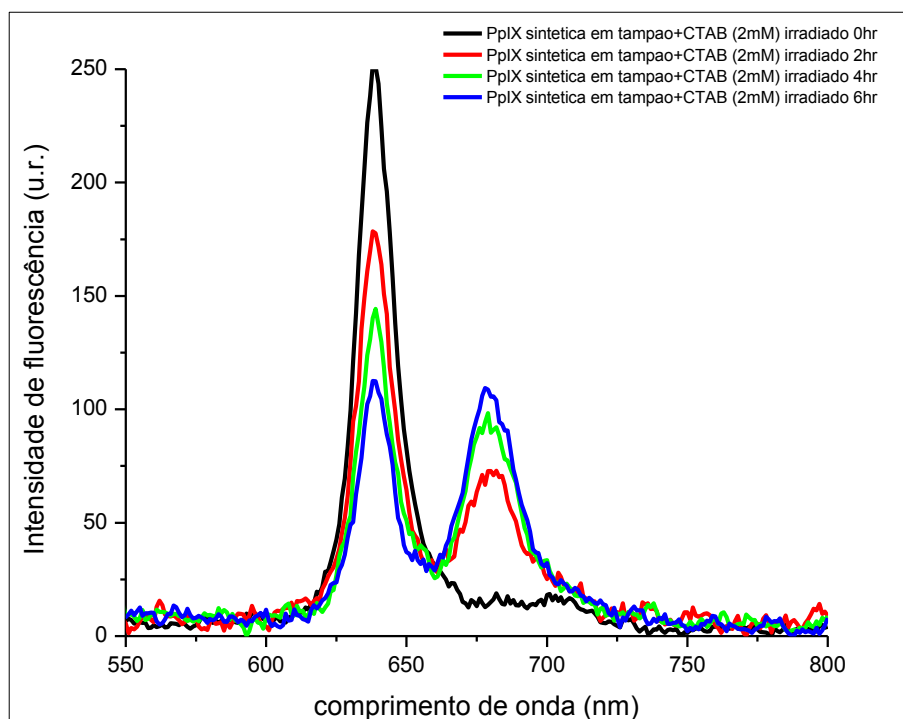


Figura 70. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de CTAB (2mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 120, 240, e 360 minutos.

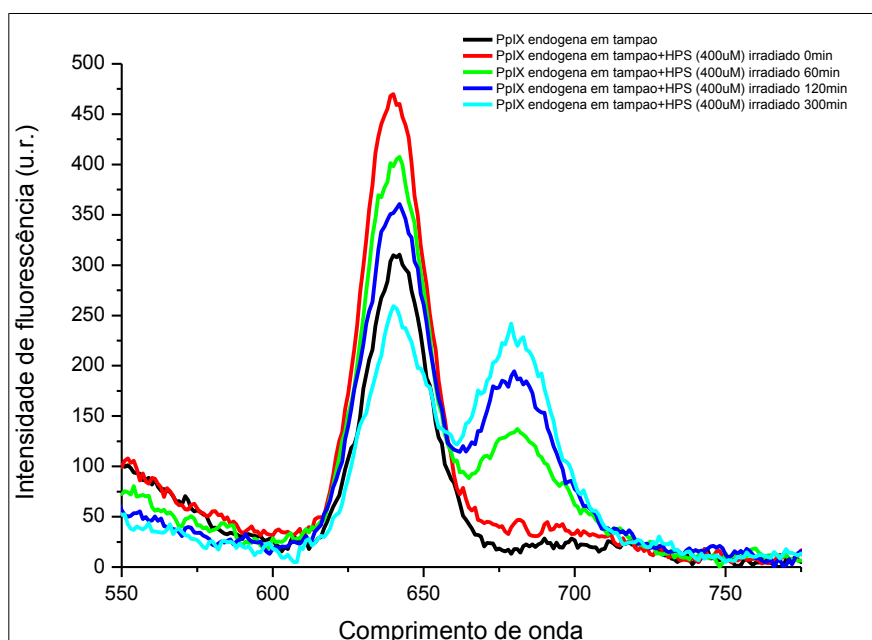


Figura 71. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de HPS (400uM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 60, 120 e 300 minutos.

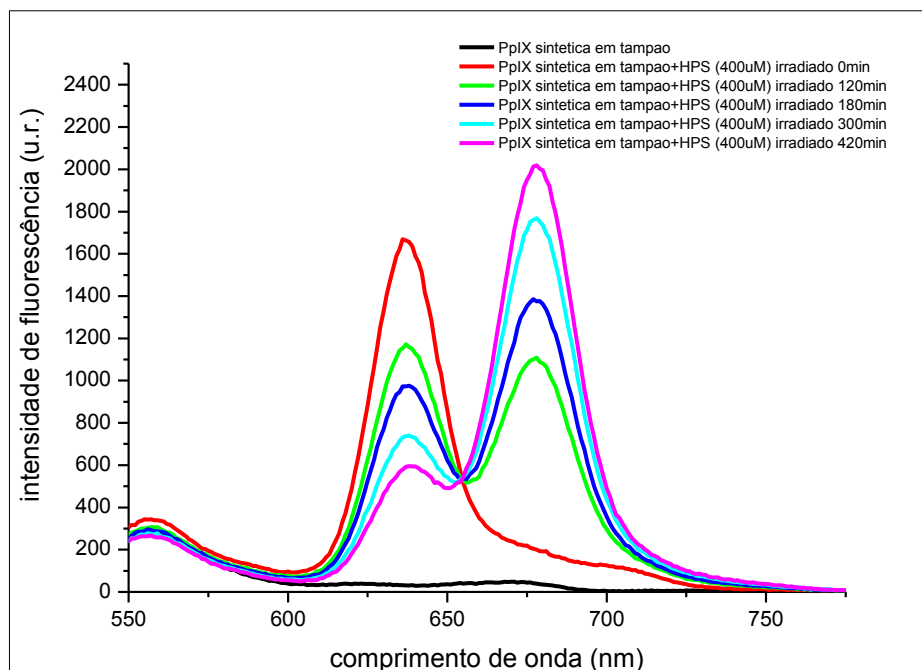


Figura 72. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução tampão na presença de micelas de HPS (400uM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 120, 180, 300 e 420 minutos.

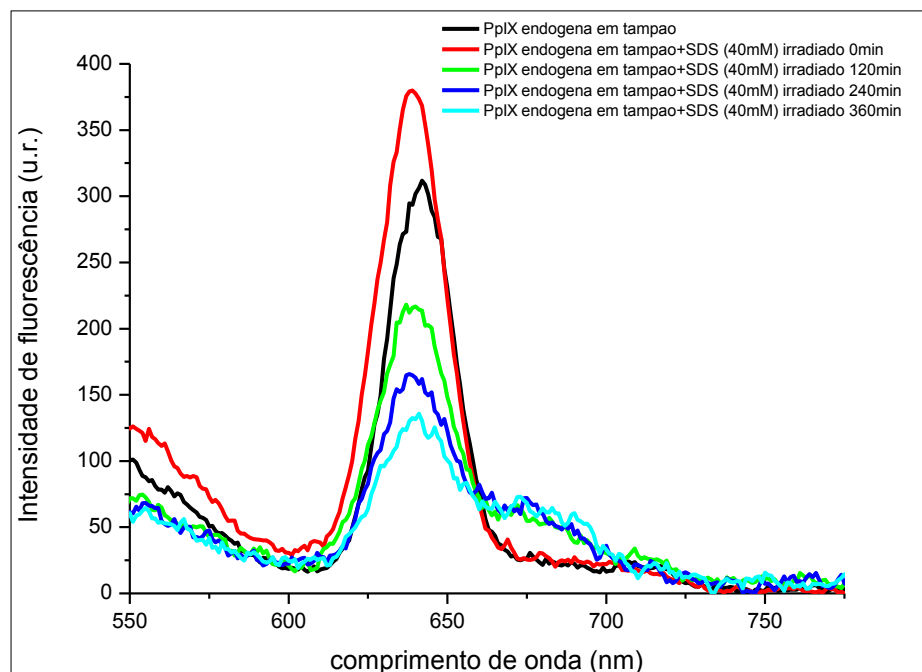


Figura 73. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de SDS (40mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 120, 240 e 360 minutos.

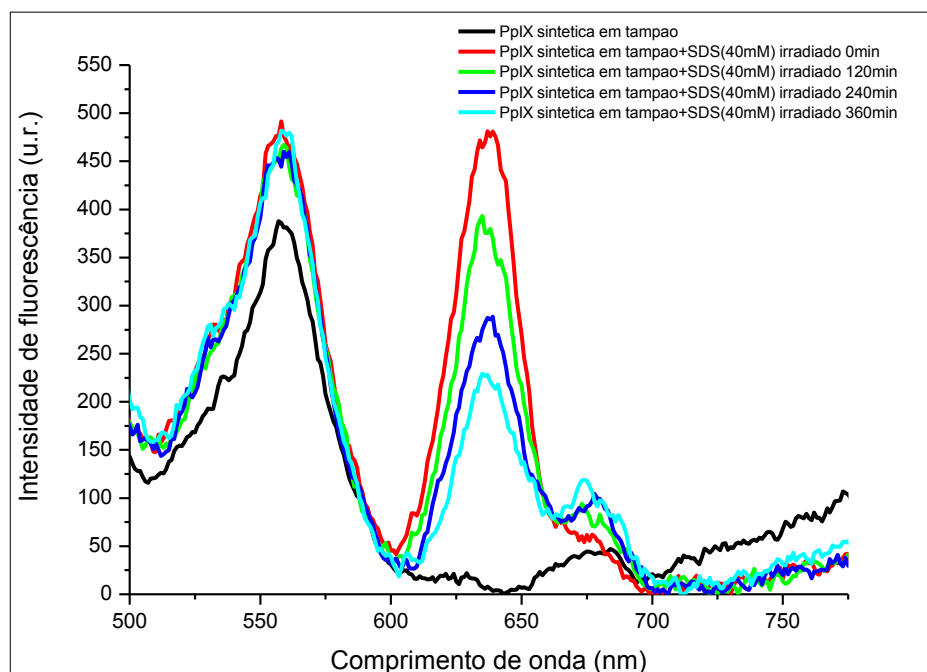


Figura 74. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução tampão na presença de micelas de SDS (40mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 120, 240 e 360 minutos.

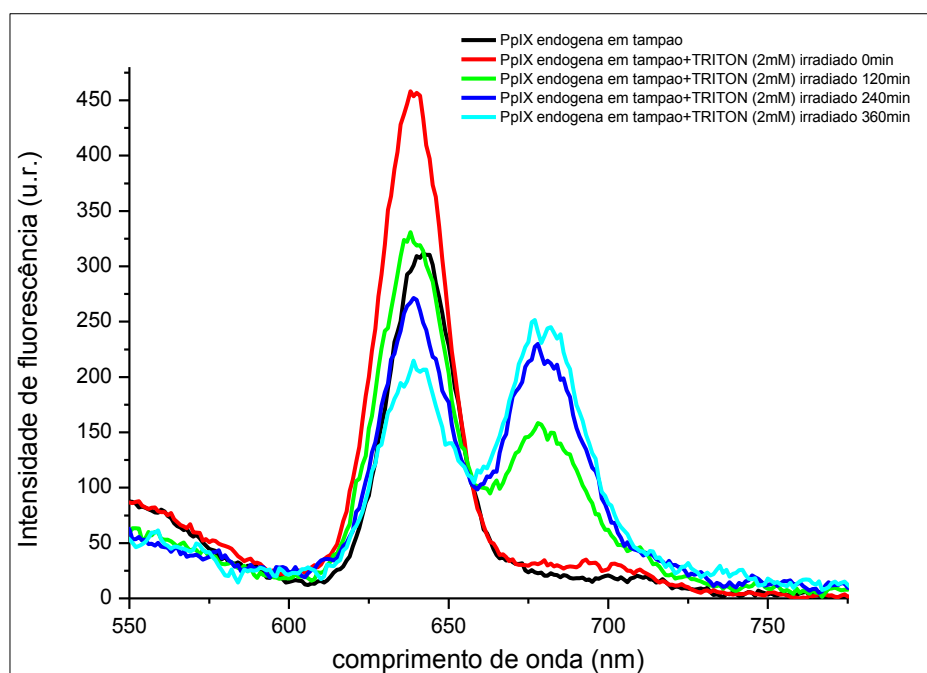


Figura 75. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de TRITON-X100 (2mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 120, 240 e 360 minutos.

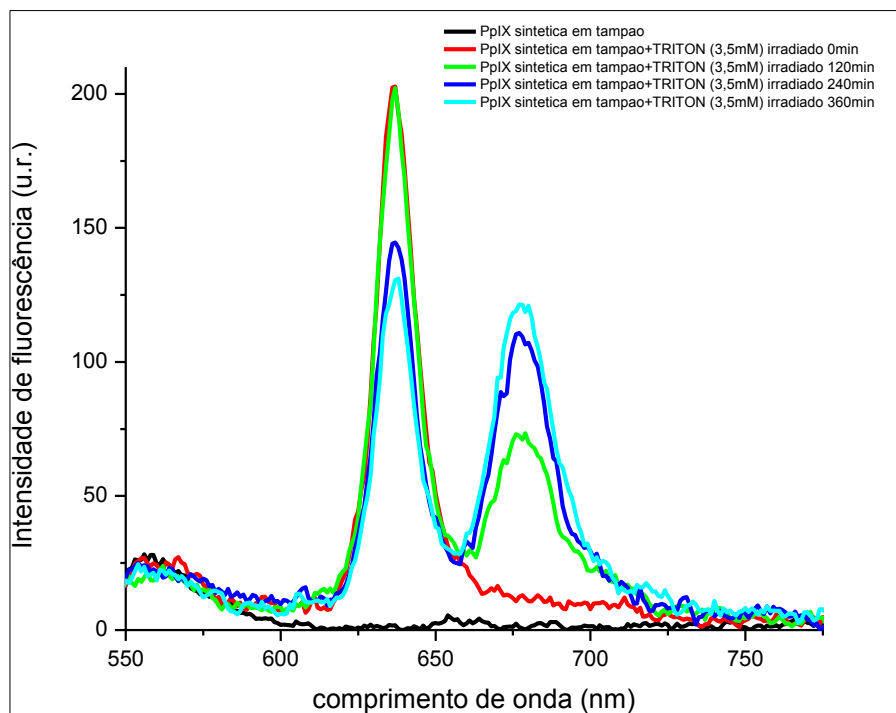


Figura 76. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução tampão na presença de micelas de TRITON-X100 (3,5mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 120, 240 e 360 minutos.

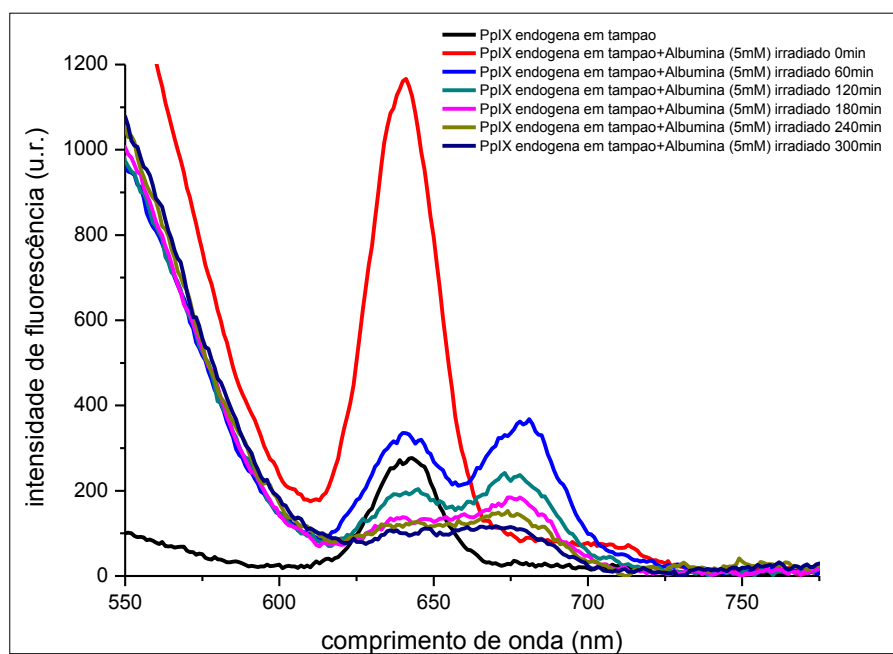


Figura 77. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução tampão na presença de micelas de ASB (5mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos.

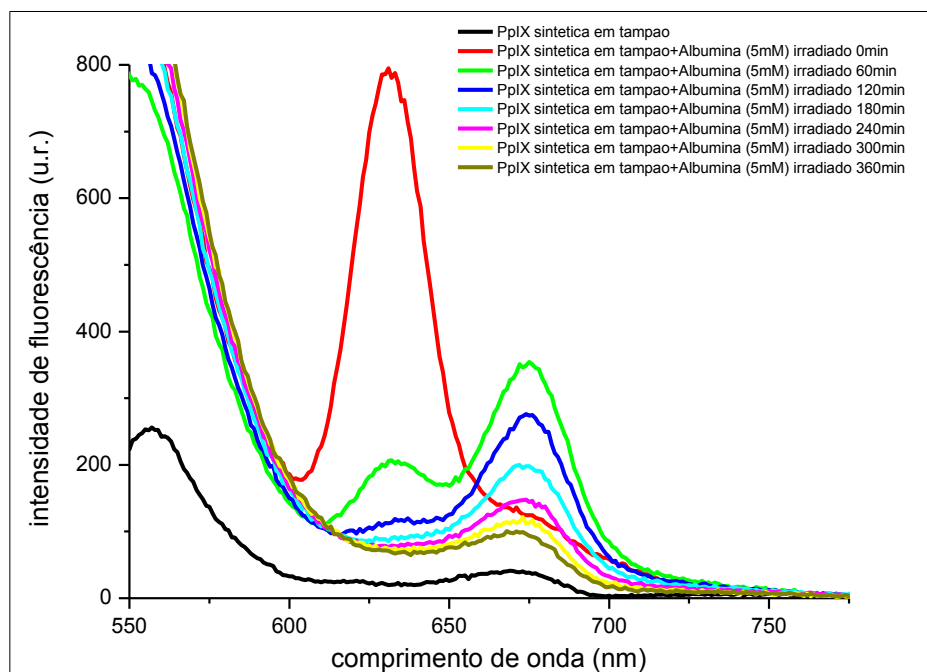


Figura 78. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução tampão na presença de micelas de ASB (5mM) com excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos.

Os espectros de emissão de fluorescência da PpIX endógena e sintética, na presença de micelas e ABS irradiadas, com excitação em $\lambda=445\text{nm}$, possuem mudanças no perfil de seu espectro de emissão semelhantes às observadas para os experimentos com PpIX sintética e endógena em solução não aquosa irradiadas ao longo do tempo, podendo ser observado a diminuição do pico principal de fluorescência e o crescimento do pico em $\lambda\sim 675\text{nm}$, relativo ao fotoproduto.

As diferenças ocorreram na irradiação da PpIX endógena e sintética na presença de micela de SDS e de ASB.

Na presença de SDS, temos a diminuição do pico principal de emissão de fluorescência, mas o crescimento do pico de emissão em $\lambda\sim 675\text{nm}$ é muito menor do que para outras micelas. Estes resultados estão em concordância da suposição

que em caso das micelas de SDS a PpIX continua em contato com o ambiente que contem água.

Já na presença de ASB, ao irradiar a PpIX endógena e sintética, temos o surgimento do pico em $\lambda \sim 675\text{nm}$ no espectro de emissão de fluorescência, porém, em vez de aumentar o tempo de irradiação observou-se uma diminuição da intensidade de emissão de fluorescência desse comprimento de onda ao continuar a irradiar a amostra no tempo. Esse fato se deve, provavelmente, à ligação do fotoproduto com a albumina e sua subsequente fototransformação.

5.5 Efeito do oxigênio na fototransformação das PpIX endógena e sintética em meio homogêneo.

É conhecido na literatura que a eficácia da TFD depende da produção de oxigênio singlete, gerado pela transferência de energia do FS no estado excitado tripleto para o oxigênio no estado fundamental tripleto (mecanismo Tipo II). O processo de fototransformação também possui dependência com o O_2 . Podemos ver essa dependência nas Figuras 79 até 83 onde são apresentados os espectros de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) irradiadas na presença de ar, com adição de O_2 pela técnica de borbulha, e na ausência de O_2 retirado da amostra pela técnica de borbulha de N_2 .

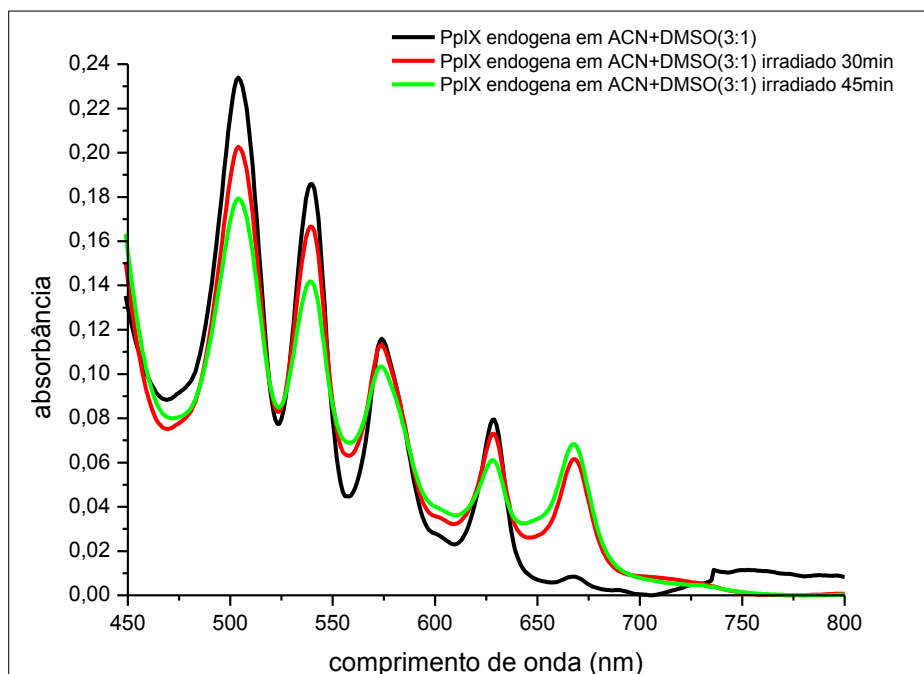


Figura 79. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de ar, irradiado por 0, 30 e 45 minutos.

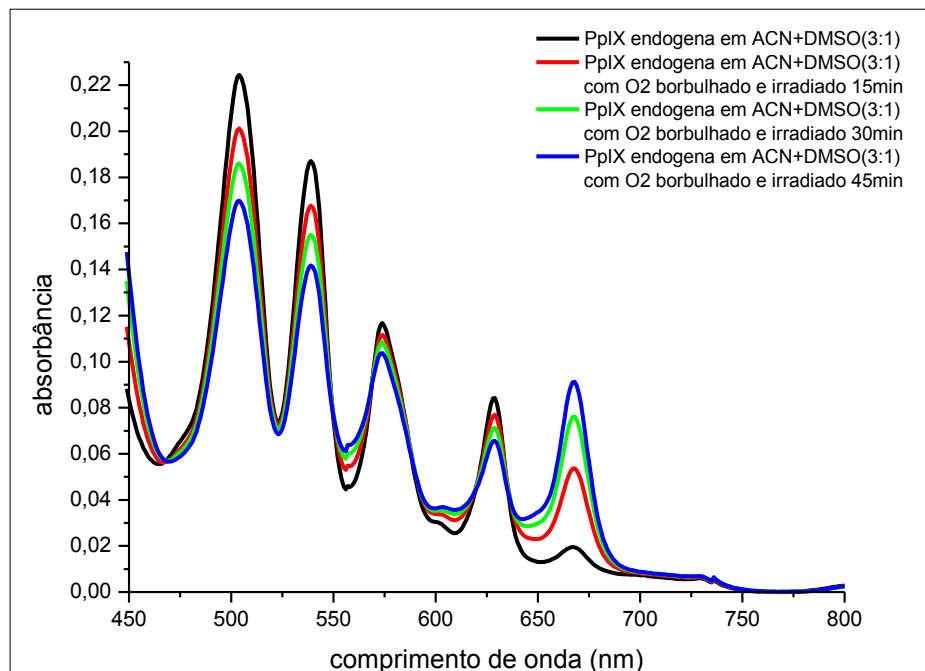


Figura 80. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de O_2 , irradiado por 0, 15, 30 e 45 minutos.

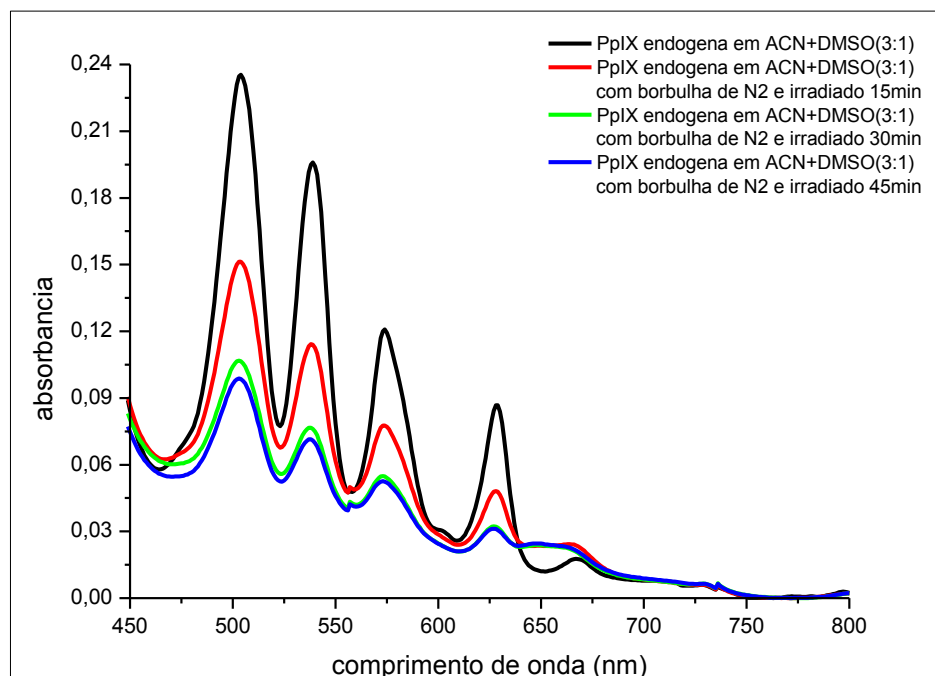


Figura 81. Espectro de absorção da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na ausência de O_2 , irradiado por 0, 15, 30 e 45 minutos.

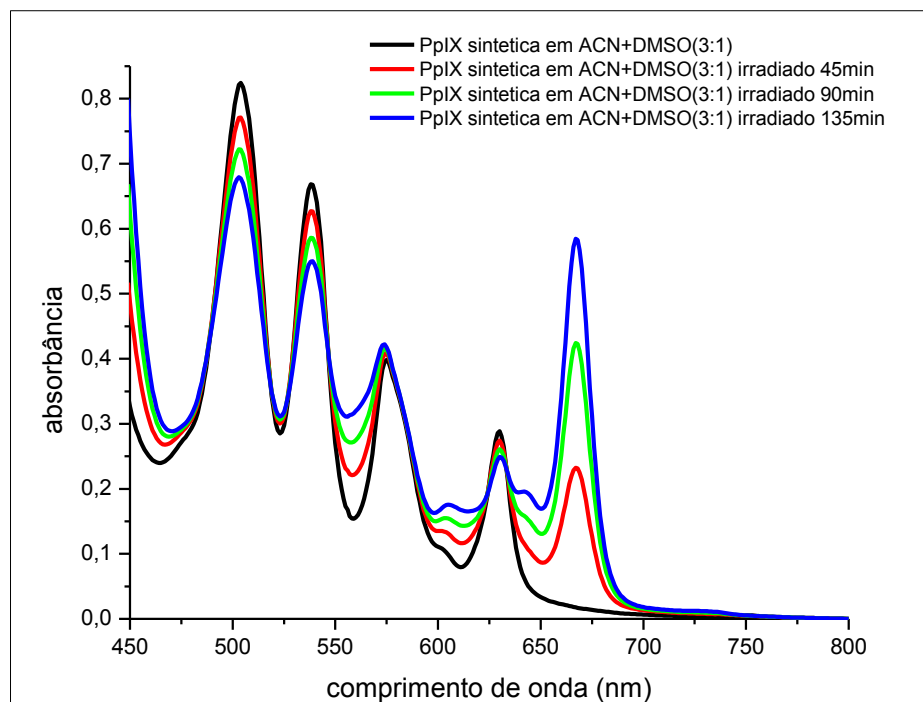


Figura 82. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de ar, irradiado por 0, 45, 90 e 135 minutos.

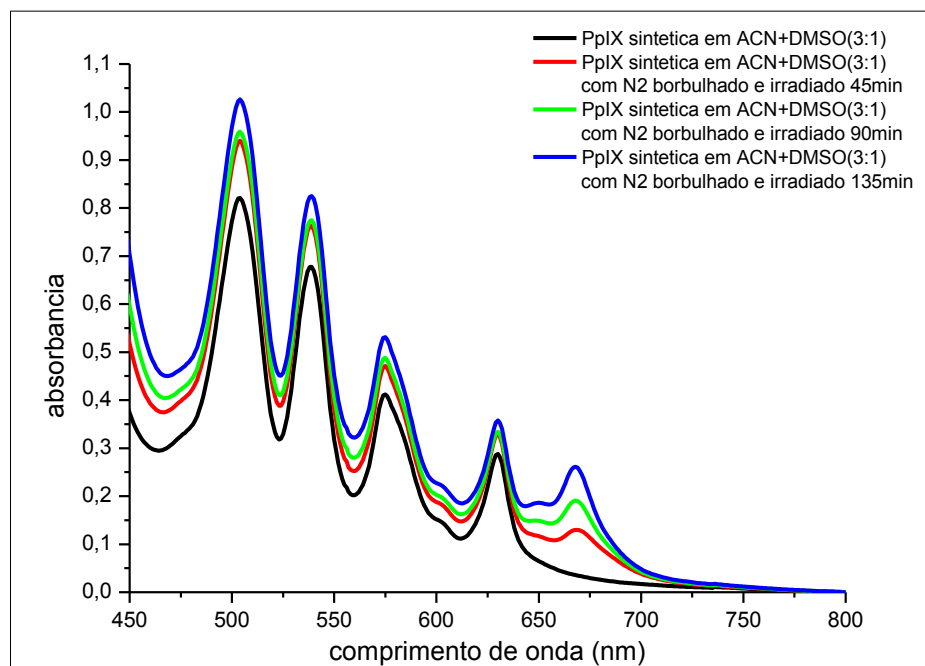


Figura 83. Espectro de absorção da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) na ausência de O₂, irradiado por 0, 45, 90 e 135 minutos.

Nas amostras de PpIX endógena e sintética em ACN+DMSO (3:1) na presença de ar, com adição de O₂ e na ausência de O₂, notou-se o processo de fototransformação confirmado pela mudança em seu espectro de absorção. Porém, quando adicionado O₂, temos um aumento da geração de fotoproduto (aumento do pico de absorção em $\lambda=670\text{nm}$) em relação à amostra na presença de ar; já ao ser retirado o O₂ percebemos a ausência da formação de fotoproduto (ausência ou quase ausência de pico de absorção em $\lambda=670\text{nm}$). O aparecimento de um pequeno pico de absorção em $\lambda=670\text{nm}$ quando retirado o O₂, se deve ao fato de a técnica de borbulha não ser totalmente eficiente, ficando alguns resquícios de O₂.

Entretanto, a diminuição dos picos de absorção da PpIX foi observada também na ausência do oxigênio, mostrando a fotodecomposição da PpIX pelo mecanismo que não inclui o oxigênio.

Nas Figuras 84 e 85 estão apresentados os espectros de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) irradiadas na presença de ar e na ausência de O₂, excitadas em $\lambda=570\text{nm}$. E nas Figuras 86 e 87 estão apresentados os espectros de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) irradiadas na presença de ar e na ausência de O₂ com excitação em $\lambda=445\text{nm}$.

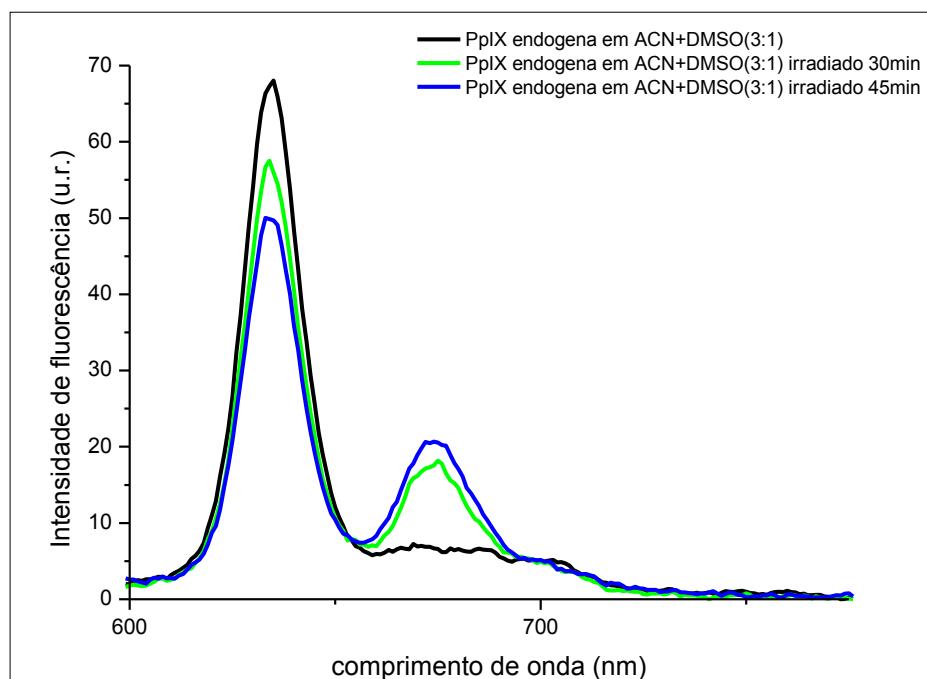


Figura 84. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de ar e excitação em $\lambda=570\text{nm}$ irradiado por 0, 30 e 45 minutos.

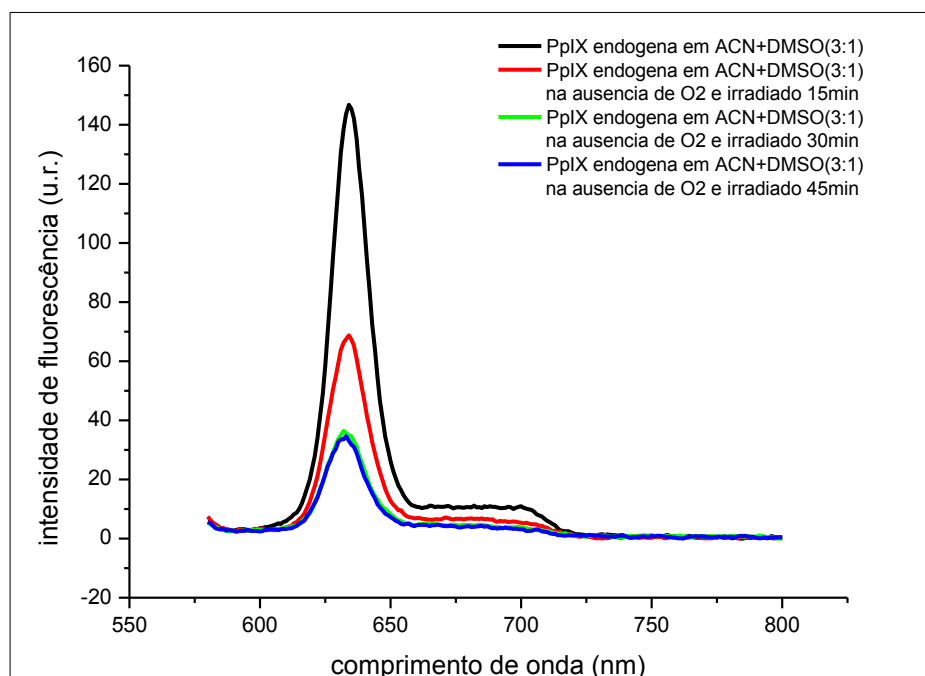


Figura 85. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na ausência de O_2 e excitação em $\lambda=570\text{nm}$ irradiado por 0, 15, 30 e 45 minutos.

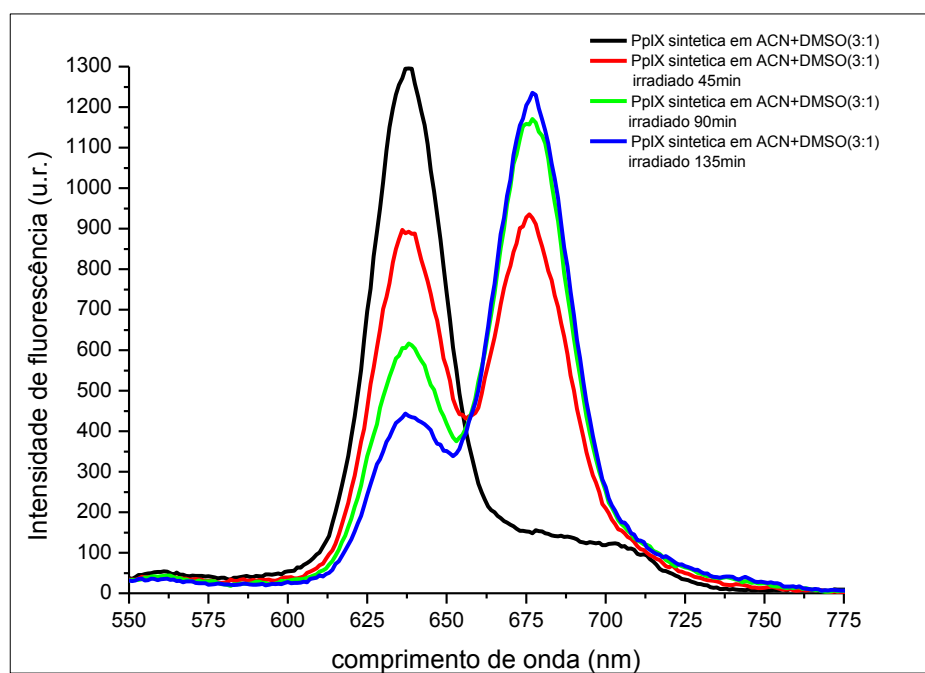


Figura 86. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença de ar e excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 45, 90 e 135 minutos.

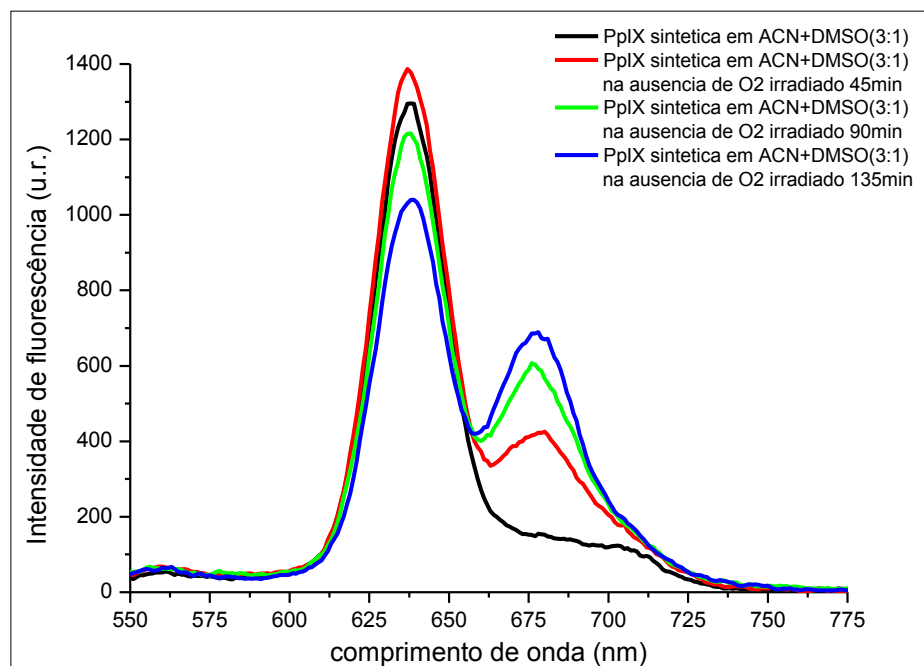


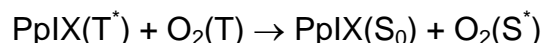
Figura 87. Espectro de emissão de fluorescência da PpIX sintética em solução de ACN+DMSO (3:1) na ausência de O_2 e excitação em $\lambda=445\text{nm}$ irradiado por 0, 45, 90 e 135 minutos.

Nos espectros de emissão de fluorescência da PpIX endógena, na presença de ar notamos a fototransformação, com o abaixamento da intensidade de emissão do pico principal e a criação do fotoproduto com o aumento da intensidade de emissão em $\lambda\sim 675\text{nm}$. Enquanto que, ao retirarmos o oxigênio da amostra notamos a fototransformação da PpIX, porém, não há o surgimento do pico de emissão de fluorescência referente ao fotoproduto.

Nos espectros de emissão da PpIX sintética, na presença e ausência de O_2 , temos tanto a fototransformação do FS quanto o surgimento do pico de emissão em $\lambda\sim 675\text{nm}$. Porém, na amostra com ausência de O_2 , a intensidade de emissão do fotoproduto é menor em comparação com a amostra na presença de ar. O surgimento desse fotoproduto, mesmo na ausência de O_2 , pode-se associar aos resquícios de O_2 na amostra.

Para confirmar o mecanismo do efeito do O₂ na fototransformação da PpIX, obtiveram-se as curvas de decaimento da absorção do FS no estado excitado tripleto, em função da concentração do oxigênio (Figura 88).

Devido à transferência da energia pela reação



o tempo de vida do estado tripleto de PpIX diminui de acordo com a equação

$$\frac{d[T]}{dt} = -(k_0 + k_q[\text{O}_2])[T] = -\frac{1}{\tau}[T]$$

em que [T] é a concentração do tripleto da PpIX, k₀ é a constante do seu decaimento na ausência do oxigênio, k_q é a constante bimolecular da transferência da energia do tripleto para oxigênio e $\tau = 1/(k_0 + k_q[\text{O}_2])$ é o tempo de vida do estado tripleto da PpIX em função da concentração do oxigênio [39].

Como pode ser visto nas Figuras 88-90 e na Tabela 3 a cinética de decaimento do estado tripleto se torna mais rápida quando a concentração do oxigênio aumenta.

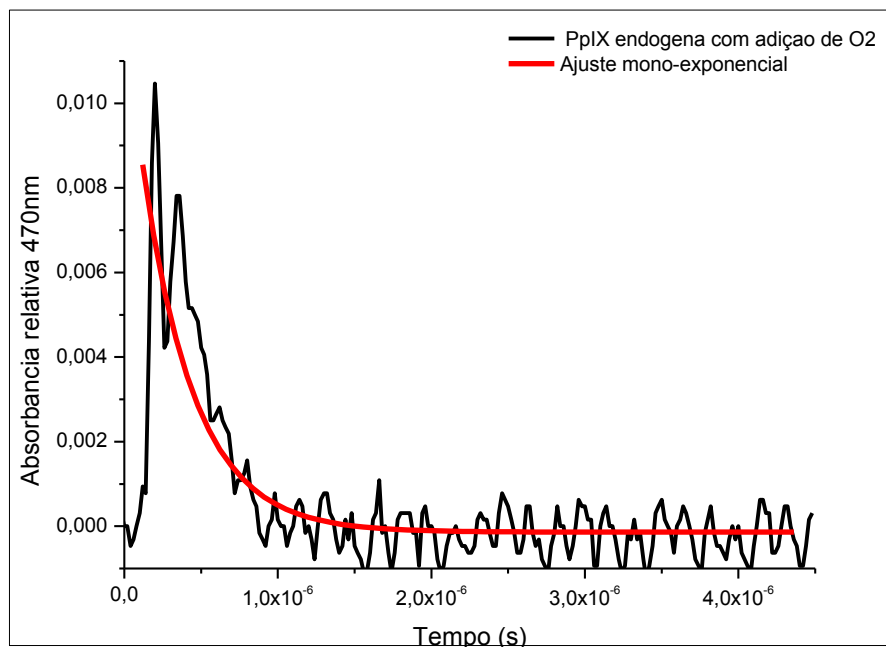


Figura 88. Curva de decaimento da absorção em $\lambda=470\text{nm}$ do tripleto da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) com adição de O₂ e seu respectivo ajuste mono-exponencial.

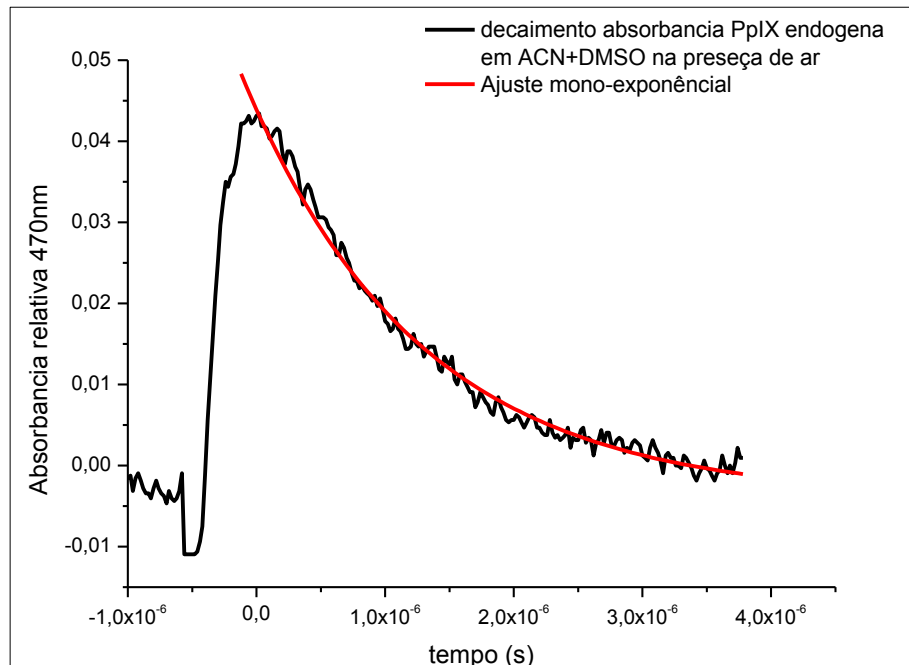


Figura 89. Curva de decaimento da absorção em $\lambda=470\text{nm}$ do tripleto da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na presença do ar e seu respectivo ajuste mono-exponencial.

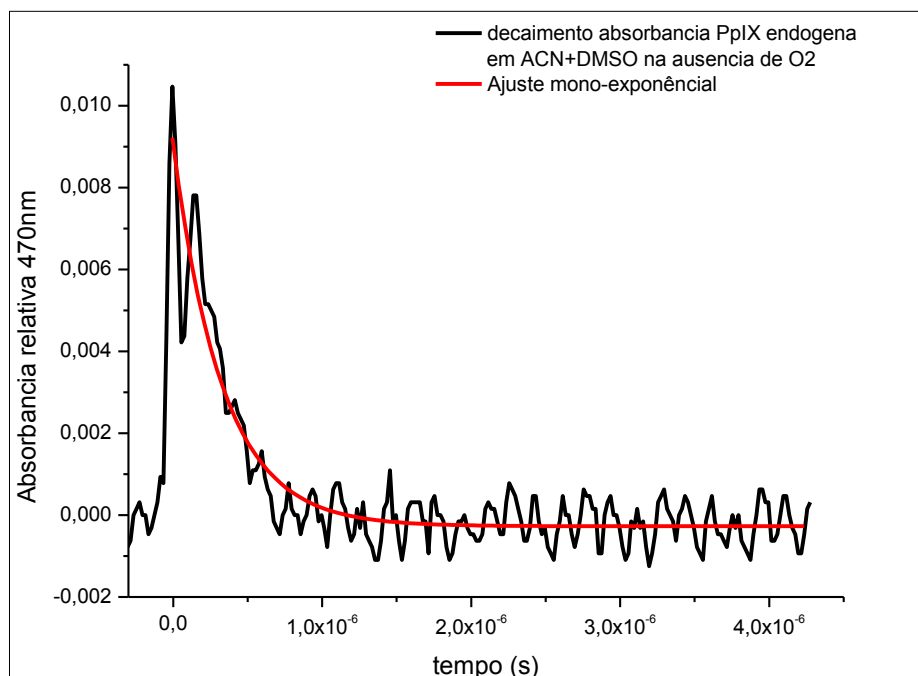


Figura 90. Curva de decaimento da absorção em $\lambda=470\text{nm}$ do tripleto da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1) na ausência de O_2 e seu respectivo ajuste mono-exponencial.

Tabela 3. Tempos de vida do estado excitado tripleto (t) da PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1), na presença de ar, adição de O_2 e na ausência de O_2 e seus respectivos erros experimentais.

amostra	t (us)
com O_2	$0,33 \pm 0,02$
com ar	$1,37 \pm 0,03$
sem O_2	$204,00 \pm 25,00$

Na Figura 91 está apresentada a curva cinética da formação e de decaimento do oxigênio singleto, medida através da sua fosforescência.

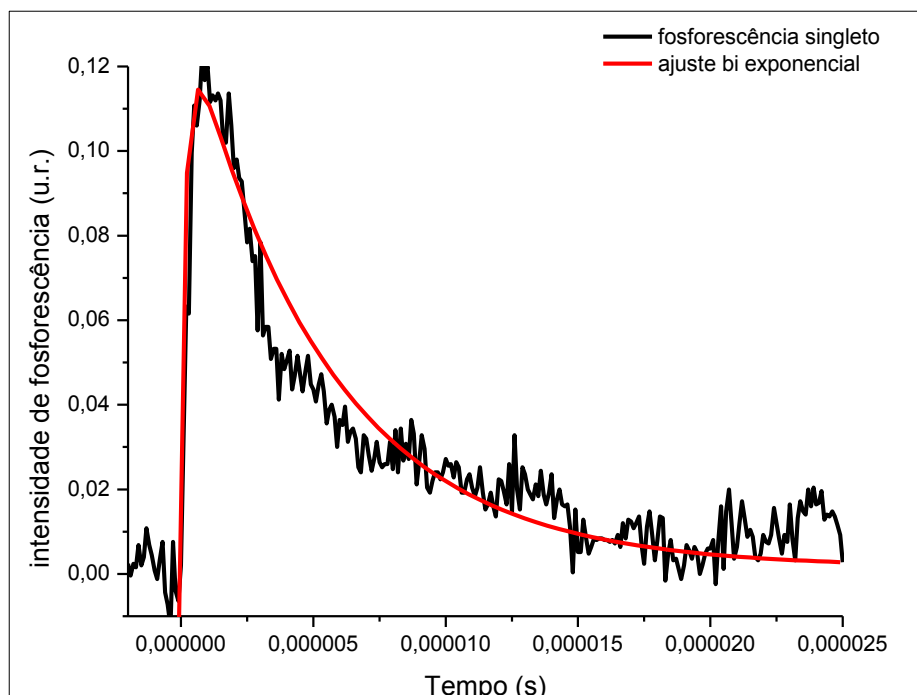


Figura 91. Curva cinética de formação e de decaimento do oxigênio singlete, em amostra de PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1), e seu respectivo ajuste.

Essa curva foi analisada em acordo com a equação [40]

$$[{}^1\text{O}_2] = A \left\{ \exp[-(k_0 + k_q[\text{O}_2])t] - \exp(-k_{1\text{O}_2} t) \right\}$$

Em que A é uma constante, o primeiro exponencial está associado com a formação do oxigênio singlete, devido à transferência da energia do estado tripleto da PpIX, e o segundo exponencial está associado com a dissipação da energia do oxigênio singlete, devido à interação com o ambiente e das reações com outras moléculas.

Tabela 4. Tempos de vida da formação (t_1) e do decaimento (t_2) do estado excitado singlete do oxigênio molecular na amostra de PpIX endógena em solução de ACN+DMSO (3:1).

O ₂ singlete	
t1 (us)	0,25±0,03
t2 (us)	5,3±0,2

Notou-se que o valor calculado para o tempo de formação do oxigênio singleto (figura 91 e tabela 4), possui a mesma ordem de grandeza do tempo de vida do tripleto da PpIX na presença de O₂, estando assim de acordo com o fato de que a produção do oxigênio singleto está relacionado com a transferência de energia do estado tripleto da PpIX (mecanismo de ação da TFD Tipo II), já que o tempo de decaimento do oxigênio singleto é característico para oxigênio singleto em ACN e DMSO [41].

6. Conclusão.

A partir da análise comparativa dos espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência da PpIX extraída de glândulas Harderianas (endógena) e sintética em meio aquoso e não aquoso, na presença e ausência de surfactantes e ASB irradiado e sem irradiar, podemos resumir que a PpIX tanto sintética como endógena sob ação de luz visível na presença do oxigênio sofrem uma fototransformação formando um pico característico de absorção em $\lambda=670$ nm e um da fluorescência em $\lambda\approx 675$ nm associados com a formação de um fotoproduto. Na ausência do oxigênio a PpIX também sofre a fototransformação mas sem produção dos picos característicos que mostra a existência de outro caminho de fototransformação. As características e as contribuições dos dois caminhos dependem tanto da natureza da PpIX quanto do ambiente onde esta se encontra assim que:

1. PpIX extraída de glândulas mostra as características espectrais semelhantes em solução aquosas e não aquosas e mostra a solubilidade em soluções aquosas maior do que PpIX sintética.
2. Em soluções não aquosas de ACN+DMSO (3:1) e de acetona durante a irradiação, a PpIX apresenta a diminuição das intensidades das bandas principais de absorção e da emissão e formação de novas bandas de

absorção e da fluorescência, associadas com a formação de seu fotoproduto.

3. Em solução tampão durante a irradiação, a PpIX endógena apresenta características semelhantes às obtidas em solução não aquosa.
4. Enquanto que a PpIX sintética em solução tampão, apresentou quase nenhuma diminuição das intensidades das bandas principais de absorção e da emissão e não foi observado a formação de novos picos associados aos fotoprodutos.
5. Além disso, foi observada a diminuição em uma ou duas ordens de grandeza dos coeficientes de absorção molar e da intensidade da fluorescência da PpIX sintética em solução tampão se comparada com a solução em meios não aquosos.
6. De acordo com as mudanças observadas nos espectros de absorção e nos espectros de emissão de fluorescência da PpIX na presença das estruturas biomiméticas estudadas, pode-se dizer que a PpIX sintética na presença de micelas zwitteriônica, catiônica e não-iônica se encontra em ambiente não aquoso.
7. Enquanto que sua afinidade com micelas aniônicas é mais fraca devido à repulsão eletrostática entre a PpIX e micela, por este motivo a influência da água continua sendo alta nas características da porfirina.
8. A dependência de valor da constante de ligação k da PpIX com micelas da carga da micela mostra papel importante dos efeitos eletrostáticos na nessa interação.
9. Entretanto, os valores altos de k para interação da PpIX com micelas de surfactantes zwitteriônicos e neutros mostra que outras interações também contribuem na ligação da PpIX com essas micelas.
10. Os efeitos da interação da PpIX com ASB são semelhantes àqueles na interação com as micelas.

Baseando-se nessas considerações podemos concluir:

1. As moléculas da PpIX possuem um caráter hidrofóbico. Este estimula a formação de agregados de PpIX sintética em soluções aquosas assim modificando seu espectro de absorção e diminuindo a probabilidade de emitir a fluorescência e fotodecompor.
2. A PpIX endógena ao ser extraída continua ligada à algumas estruturas biológicas, as quais adaptam ela com o ambiente aquoso e diminuem a probabilidade da sua agregação. Essas estruturas devem possuir um caráter anfifílico e são, provavelmente, um tipo de fosfolipídios ou de proteínas. Essas estruturas aumentam a afinidade da PpIX com as micelas.
3. No caso da ASB estas estruturas dificultam a ligação da PpIX com os sítios de ligação da ASB, já no caso da PpIX sintética não se tem esses obstáculos, o que explica o valor de k mais baixo para a PpIX endógena quando comparado com a PpIX sintética.
4. A semelhança entre os espectros, da fluorescência da PpIX e suas mudanças sob irradiação com a luz visível na sua interação com estruturas nano-organizados com aqueles, observados diretamente nos tecidos de glândulas em vivo, mostram que as estruturas nano-organizadas, tipo as de micelas ou proteínas, modelam com sucesso as características de fototransformação da PpIX dentro do organismo.
5. O aumento da taxa de fototransformação da PpIX, na presença de oxigênio juntos com o fato de formação do oxigênio singlete por transferência da energia do estado tripleto da PpIX para oxigênio molecular, mostra que o caminho da fototransformação da PpIX responsável pela formação do fotoproduto como observado nos espectros característicos da absorção e da fluorescência é do Tipo II.
6. Entretanto, existe outro caminho da fototransformação da PpIX que não possui a dependência do oxigênio e não forma esse fotoproduto.

6.1. Perspectivas futuras

Com base nos resultados dos estudos realizados neste projeto, e em outros projetos de nosso Grupo de Fotobiofísica, foi considerado que para melhor esclarecimento da ação da PpIX e melhores aplicações deste FS é necessário realizar alguns estudos adicionais. Entre eles:

- Realizar um estudo mais detalhado dos efeitos da estrutura de sistemas biomiméticos nas interações eletrostáticas com a PpIX.
- Estudar em detalhes a natureza de fotoprodutos da PpIX formados em diferentes tipos do ambiente, inclusive os tecidos biológicos, na presença e na ausência do oxigênio.
- Estudar a eficiência do FS em tumores artificiais em vivo, assim como uma dosimetria correta a ser utilizada em sua aplicação.

7. Referências Bibliográficas

- [1] Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br>>
Acesso em: 15 maio. 2013.
- [2] CALLIL B.F., Avaliação clínica dos efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana no tratamento não cirúrgico da periodontite crônica. 2009, dissertação (mestrado), Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro.
- [3] BEN-HUR E. , HOROWITS B. Photochem. Photobiol. 62 (1995) 383.
- [4] WEINSTEIN, G.D, MCCULLOUGH J.L., NELSON J.S., BERNS M.W. J. Invers . Dermatol. 96 (1991) 573.
- [5] TAKEMURA T., NAKAJIMA S., SAKATA I. Photochem. Photobiol. 58 (1994) 366.
- [6] BORISSEVITCHE I.E., GANDINI S.C.M. J. Photochem. Photob. B: Biol. 43 (1998) 112.
- [7] KONIG K., SCHMECKENBURGER H., RUCK A., STEINER R. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 18 (1993) 287-289.
- [8] REIS E.R., METZE K., NICOLA E.M.D, NICOLA J.H., BORISSEVITCH I.E. Journal of Luminescence 137 (2013) 32-36.
- [9] EDUARD C.H., DAVID E.W., CARLOS A.P., LUTHER W.B. Perez e Brady's Principles and Practices of Radiation Oncology. 27 (2014), 6 ed., Halperin et al.
- [10] CYRIL P. B. traduzido do Alemão por; The Papyrus Eber. University College, London.
- [11] Center of Laser Medicine, lectures, L3 Historical Aspects of Photodynamic Therapy Development: <http://www.magicray.ru/ENG/lecture/L2/2.html>
- [12] RAAB, O., Z. Biol. 39 (1900) 524.
- [13] POLICARD A., C.R. Soc. Biol. Paris 91 (1924) 1423.
- [14] DOUGHERTY T.J., KAUFMAN J.E., GOLDFARB A., WEISHAUP T.K.R., BOYLE D., MITTLEMAN A., Câncer Res. 38 (1978) 2628.

- [15] OCHSNER M. Photobiol. Photochem. B: Biology 39 (1997) 1.
- [16] TANELIAN C., MECHIN R., SEGHTROUCHNI R., SCHWEITZER C. Photochem. Photobiol. 71 (2020) 12.
- [17] WILSON, B.C., PATTERSON, M.S The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. Physics in medicine and Biology, v,53,n.9,p. R61-R109, May 7 2008.
- [18] GONÇALVES, P. J. Estudos das características fotofísicas da porfirina mesotetrassulfonatofenil (TPPS4): efeitos da protonação e interação com micelas de CTAB. Tese de Doutorado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (2006).
- [19] TYRREL J., CAPBELL S., CURNOW A. Photodiagnosis and photodynamic therapy (2010), 7, 232-238.
- [20] MENEZES, P. F. C.. Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser. 2006. 182f. Tese (Doutorado em Ciências: Química Analítica) - Instituto de Química da Universidade de São Carlos. São Carlos, 2006.
- [21] BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. .Effects of photoproducts on the binding properties of protoporphyrin IX to proteins. Biophysical Chemistry, 96: 77 – 87, 2002.
- [22] DYSART, J. S.; PATTERSON, M. S.. Characterization of photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. Physics in Medicine and Biology, 50: 2597 – 2616, 2005.
- [23] REIS, E. R. Glândula harderiana de ratos wistar como modelo para o estudo de efeitos fotodinâmicos. 2004. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. Campinas SP, 2004.
- [24] AGGARWAL, Lucimara Perpétua Ferreira. Interações das porfirinas aquo-solúveis TPPS4 e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos do pH e da força iônica. 2005. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

- [25] BORISSEVITCHE I.E., TOMINAGA T.T., IMASATO H., TABAK M. J. Luminescence, 69 (1996) 65-76.
- [26] BORISSEVITCHE I.E., TOMINAGA T.T., SCHIMITT C. C. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 114 (1998) 201.
- [27] ZANA R. Surfactant Solutions: New methods of investigation, Marcel Dekker, New Yourk (1986).
- [28] GONÇALVES, P.J., Estudos das características fotobiofísicas da porfirina mesotetrasulfonatofenil (TPPS4): efeitos da protonação e interação com micelas de CTAB, 2006. Tese (Doutorado em física aplicada a medicina e biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão preto - Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto SP, 2006.
- [29] SINGER S. J., NICOLSON G. L., The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175:720-31, 1972.
- [30] PETERS T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Academic Press 1 edition (December 22, 1995), Cooperstown, New York USA.
- [31] FERREIRA E. S. Interção da albumina do soro bovino (BSA) com substratos sintéticos. Tese (Doutorado em física aplicada à medicina e biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão preto - Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto SP, 2009.
- [32] ATVARS, D. Z., espectroscopia eletrônica de absorção, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, site: [www. Chemkeys.com](http://www.Chemkeys.com).
- [33] MENDES F. de A., MARCUS; UFRGS, espectrofotometria, site http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/componentes.html.
- [34] CUSTODIO, R.; KUBOTA, T. L.; ANDRADE, C. J; Lei dos Processos de Absorção da Radiação, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, site: [www. Chemkeys.com](http://www.Chemkeys.com).
- [35] BORISSEVITCH, I. E. ; apresentação de Power point; técnicas de flash fotólise: princípios e aplicações; grupo de fotobiofísica; Universidade de São Paulo.
- [36] TABAK, M.; BORISSEVITCH, I. E.; Interactinon of dipyridamole with micelles of lysiphosphatylcholine and with bovine serum albumin: fluorescence study.; Biochimica et Biophysica Acta 116 (1992) 241-249.

- [37] ALMEIDA, A. A., Estudo comparativo da fototoxicidade das protoporfirinas IX endógena e sintética e seus fotoprodutos contra células malignas. Dissertação (Mestrado em física aplicada à medicina e biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão preto - Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto SP, 2011.
- [38] PEREZ, K. R. D., Sistemas carregadores de proteínas antigênicas da membrana de *Pasteurella multocida* para a prevenção da pasteurelose. Tese (Doutorado em física aplicada à medicina e biologia) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão preto - Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto SP, 2004.
- [39] Krasnovsky Jr., A.A.. Quantum yield of photosensitized luminescence and radiative lifetime of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen in solutions, Chem. Phys. Lett., 81 (1981) 443–445.