

Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

"Estudo da associação de complexos nitrosilos de rutênio liberadores de NO com o agente fotossensibilizador Zinco ftalocianina ZnPC em sistemas de liberação utilizados na Terapia Fotodinâmica"

Daniela Silva Maranho

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: **Química** 

# **RIBEIRÃO PRETO -SP**



Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química

"Estudo da associação de complexos nitrosilos de rutênio liberadores de NO com o agente fotossensibilizador Zinco ftalocianina ZnPC em sistemas de liberação utilizados na Terapia Fotodinâmica"

Daniela Silva Maranho

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco** 

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: **Química** 

# **RIBEIRÃO PRETO -SP**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo

de Ribeirão Preto / USP

Maranho, Daniela Silva Estudo da associação de complexos nitrosilos de rutênio liberadores de NO com o agente fotossensibilizador Zinco ftalocianina ZnPC em sistemas de liberação utilizados na Terapia Fotodinâmica. 96 p. : il. ; 30cm
Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química. Orientador: Tedesco, Antônio Cláudio.
1. Terapia Fotodinâmica. 2. óxido nítrico. 3. complexo nitrosilo de rutênio. 4. neoplasias.

### Universidade de São Paulo Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

### Folha de Aprovação

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Daniela Silva Maranho, apresentada ao Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, \_\_/\_/\_\_.

Comissão Julgadora:

(Nome/Instituição)

(Nome/Instituição)

(Nome/Instituição)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família.

Primeiramente à Deisy Silva Maranho, minha mãe, grande mulher que com seu amor e alegria sempre me motivou. Seu apoio incondicional e imensurável me deu a força necessária para encarar todos os desafios, para assim, conseguir alcançar tudo que desejei.

Ao meu pai querido, Alcides Maranho, com seu carinho e amor sempre me guiou pelo caminho do bem. Homem sereno, exemplo de honestidade, seu caráter singular foi a base da minha formação moral.

Aos meus irmãos queridos:

Dinho, uma pessoa muito especial que com toda sua sensibilidade me mostrou que o que importa nessa vida é ser feliz! Um cuidado único comigo, meu ídolo! Ana Deisy com sua ternura sempre foi a certeza de encontrar em casa o carinho mais sincero. Du, através de sua escolha, me mostrou que não há barreiras para alcançarmos nossos sonhos, tudo é possível!

À minha querida avó Zica, com seus 98 anos, ainda reza por mim e confia nas minhas conquistas.

Obrigada pela confiança e por tanto amor...

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus,

por tudo que tenho, por ser meu descanso e a certeza da minha felicidade. Com a ajuda dos

anjos e santos, consigo me manter firme e confiante.

"Tudo posso naquele que me fortalece!"(Fl 4,13)

#### **AGRADECIMENTOS**

Principalmente ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, por ter confiado no meu crescimento na pesquisa. Obrigada pela paciência, pelo apoio, carinho, pelos momentos de descontração, mas principalmente pelos grandes ensinamentos.

Ao professor Prof. Dr. Roberto Santana da Silva, pelo fármaco cedido, pelas sugestões, pelo apoio e principalmente pela forma carinhosa que sempre me recebeu.

À professora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lusiane Maria Bendhack, pelo apoio e pela grande disponibilidade em todos os momentos em que precisei.

À professora Dr<sup>a</sup>. Renata Galvão de Lima, pela enorme ajuda, amizade e pelas horas de alegria.

A José Honorato Ferreira Neto, uma pessoa essencial para minha felicidade. Obrigada por confiar em mim e por resgatar em mim a vontade de conquistar meu espaço. Ao seu lado sou muito feliz porque o amo e por causa do seu amor sou completa. Obrigada por tudo! Que o nosso amor sempre contribua para nosso crescimento profissional e para nossa vida juntos. Amo você!

Graças a este trabalho, conquistei amigas valiosas e eternas:

À minha amiga tão querida Paty, a melhor pessoa desse mundo. Não tenho palavras para dizer tudo que já fez por mim, serei eternamente grata por tê-la como companheira. A certeza de ter seu ombro amigo, me ajudou a enfrentar os mais diversos problemas. Valeu doida!

À minha amiga Alessandra, a alegria em pessoa, obrigada por tantos conselhos, cafés terapias e festas. É um exemplo de vida para mim!

A todo o grupo de Fotoquímica e Fotobiologia, por sempre me ajudarem. À Dani Manfrim, pelos ensinamentos e pela amizade. A Fernando Lucas Primo pela enorme disponibilidade em me socorrer e, nesta última etapa do trabalho, tive a oportunidade de reconhecê-lo como um grande amigo. Ângelo, Gilson, e Paula, obrigada pela amizade e pela ótima convivência. Marcilene, Paloma, Gisele, Andreza, Carol, Dani Zancanela, Nathália, todos os alunos da iniciação, obrigada pelo apoio e amizade.

À minha querida Olímpica, o socorro imediato! Não apenas como técnica do laboratório, mas uma amiga única. Obrigada pelos conselhos e por sempre estar ao meu lado.

Às minhas amigonas Nati, Tati, Carol, Carolzinha, Cíntia, Flavitcha e Fernandinha que sempre estão a postos para o que der e vier, adoro vocês! Ao povo do "saia justa", aos que faltaram citar, Val, os Jotas, obrigada por este instante particular do nosso dia!

Às minhas grandes amigas Ana Lúcia e Alessandra pelo carinho e amizade desde a infância.

À Djuly (in memorian) pela fidelidade e pelo amor. A saudade é infinita!

Às minhas cunhadas e sobrinhos, tios e tias, principalmente meus padrinhos Néia e Délio e também minha madrinha Mai por sempre torcerem pelas minhas conquistas.

À Bernadete e ao Major pelo carinho com que me acolhem em sua casa todos os dias.

Ao meu primeiro professor de Química, José Dirceu, pela consideração que sempre demonstrou por mim.

Às minhas companheiras de casa, Jordana e Cássia, pela ajuda diária e amizade.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento, da Secretaria de Pós-Graduação, em especial a Lâmia, pela enorme paciência e cooperação.

À Capes, CNPq, pelos auxílios financeiros, sem os quais o trabalho não seria realizado.

# SUMÁRIO

RESUMOx	
ABSTRACTxi	
I. INTRODUÇÃO1	
I.1 Câncer	
I.2. Terapia Fotodinâmica	
I.3. Mecanismos Fotoquímicos e Fotofísicos da TFD5	
I.4. Os fotossensibilizadores utilizados na Terapia Fotodinâmica9	
I.5. Compostos nitrosilos de rutênio12	
I.6. Sistemas de liberação de fármacos15	
II. OBJETIVOS18	
III. PARTE EXPERIMENTAL19	
III.1 Materiais	
III.2 Preparações	
III.3 Aparelhagem	
III.4 Métodos	
III.4.1. Estudos espectroscópicos no estado estacionário da Zinco ftalocianina e do	
complexo Ru-tpy em meio homogêneo25	
III.4.2 Preparação da ZnPC, do complexo de rutênio e da associação dos dois	
fármacos em meio lipossomal26	
III.4.3 Caracterização do sistema lipossomal misto por medidas de tamanho de	
partículas27	
III.4.4 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da Zinco ftalocianina, do	
complexo Ru-tpy e da associação dos dois fármacos em meio lipossomal28	
III.4.5 Estudos de supressão de fluorescência da Zinco ftalocianina pelo complexo R	lu-
tpy no sistema lipossomal	

III.4.6 Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) da Zinco ftalocianina
e de sua associação ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal
III.4.7 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ZnPC em meio lipossomal e
para o sistema misto
III.4.8 Estudos dos estados excitados tripletes por fotólise por pulso de laser
III.4.9 Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Lambda}$ )
III 4 10 Estudos de deteccão de NO gerado por fotólise de pulso a laser em
675 nm
UI 4 11 Estudos in vitro
III.4.11.1 Crescimento e manutenção da cultura de células da linhagem neoplásica de
melanoma de rato (B-16 F10)
III.4.11.2 Controle da integridade da membrana celular
III.4.11.3 Determinação da Toxicidade da ZnPC, do complexo Ru-tpy e do sistema
lipossomal misto na ausência de luz
II.4.11.4 Estudo da fototoxicidade do sistema lipossomal da ZnPC e do sistema
lipossomal misto
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO
IV.1 Estudos Fotofísicos
IV. 1.1 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da Zinco ftalocianina (ZnPC) e
do complexo Ru-tpy em meio homogêneo e lipossomal43
IV.1.2 Caracterização do sistema lipossomal misto por medida do tamanho de partículas
IV. 1.3 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ZnPC associada ao complexo
Ru-tpy em meio lipossomal

IV.1.4 Estudos de supressão de fluorescência da Zinco ftalocianina pelo complexo Ru-
tpy em meio lipossomal
IV.1.5 Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) da ZnPC e de sua
associação ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal56
IV.1.6 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ZnPC em meio lipossomal e
da sua associação ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal60
IV.1.7 Estudos dos estados tripletes por fotólise por pulso de laser
IV.1.8 Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete
$(\Phi_{\Delta})$
IV. 1.9 Estudos de detecção de NO gerado por fotólise de pulso a laser em
675 nm
III.2 Estudos in vitro75
III.2.1 Determinação da Toxicidade da ZnPC, do complexo Ru-tpy e do sistema
lipossomal misto na ausência de luz75
IV.2.2 Estudo da fototoxicidade do sistema lipossomal da ZnPC e do sistema lipossomal
misto77
V. CONCLUSÕES
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

# LISTA DE FIGURAS

Figura 2			
0	Digrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização		
Figura 3	Estrutura química das metalo ftalocianinas		
Figura 4	Fórmula estrutural do complexo [Ru(NH.NH)(tpy)NO] <sup>3+</sup> (Ru-		
	tpy)		
Figura 5	Representação esquemática de uma vesícula unilamelar		
	mostrando interações com diferentes substâncias		
Figura 6	Figura esquemática da preparação dos lipossomas		
Figura 7	Aparato montado em capela para geração de óxido nítrico		
	gasoso		
Figura 8	Medida do NO liberado através do NO-meter (acima) e da		
	fibra do Laser (abaixo)		
Figura 9	Espectro de absorção da ZnPC (5,0 µmol.L <sup>-1</sup> ) em etanol		
Figura 10	Espectro de absorção do complexo Ru-tpy 50 µmolL <sup>-1</sup> em		
	tampão fosfato, pH= 7,4		
Figura 11	Espectro de emissão de fluorescência (excitação fixa em 610		
	nm) da ZnPC (5,0 $\mu$ molL <sup>-1</sup> ) em etanol		
Figura 12	Espectro de absorção em meio lipossomal da ZnPC (		
	complexo Ru-tpy (		
Figura 13	Espectro de emissão de fluorescência da ZnPC () e associada		
	ao complexo Ru-tpy (		
Figura 14	Efeitos da supressão na emissão de fluorescência da ZnPC		
	$(5,0 \ \mu molL^{-1})$ conforme adição do complexo Ru-tpy em meio		
	lipossomal, na faixa de concentração crescente (0 a 50,0		
	$\mu$ molL <sup>-1</sup> )		
Figura 15	Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da		
0	ZnPC conforme adição do complexo Ru-tpy		
	$(R^2 = 0.982964, Y = 1.0448 + 5793, 4X)$		
Figura 16	Voltanograma cíclico do complexo Ru-tpy (1,0 mmolL <sup>-1</sup> ) em		
C	10 molL <sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 7.4). (As setas indicam o		
	começo e a direção). O inserto é o cronoamperograma de		
	liberação do NO controlada pelo potencial de eletrólise em -0.2		
	V vs Ag/AgCl da solução do complexo Ru-tpy		

Dissertação de Mestrado – D.S. Maranho

Figura 17	Curva de decaimento e ajuste exponencial para o	
	fotossensibilizador ZnPC (5,0 µmolL <sup>-1</sup> ) associado ao complexo	
	Ru-tpy (50,0 µmolL <sup>-1</sup> ) em lipossoma. O Inserto abaixo da	
	figura representa o resíduo médio	61
Figura 18	Espectro de absorção do transiente obtido através do método	
	de fotólise por pulso de laser da ZnPC (5,0 µmolL <sup>-1</sup> ) associada	
	ao complexo Ru-tpy (50,0 µmolL <sup>-1</sup> ) em meio lipossomal após	
	excitação por pulso de laser em 355 nm, mostrando a absorção	
	máxima do triplete centrada no comprimento de onda de 480	
	nm e o fotobranqueamento do estado fundamental centrado a	
	aproximadamente 380 nm e 580 nm. A curva de decaimento	
	dos transientes no máximo da absorção triplete em 480 está	
	mostrada no inserto	66
Figura 19	Espectro de absorção da ZnPC 5,0 µmolL <sup>-1</sup> incorporadas em	
	lipossomas sob irradiação do laser em 675 nm, na faixa total de	
	energia de 0 J a 60 J num intervalo de tempo de 0 s a 150 s	71
Figura 20	Espectro de absorção da ZnPC 5,0 µmolL <sup>-1</sup> e do complexo Ru-	
	tpy (50,0 µmol.L <sup>-1</sup> ) incorporados em lipossomas sob irradiação	
	do laser em 675 nm, na faixa total de energia de 0 J a 60 J num	
	intervalo de tempo de 0 s a 150 s	72
Figura 21	Cronoamperograma para o lipossoma contendo a ZnPC e o	
	complexo Ru-tpy sob irradiação do laser em 675 nm	73
Figura 22	Porcentagem de células B16-F10 vivas após 3 horas de	
	incubação com as formulações lipossomais estudadas. 1=	
	lipossoma vazio, $2 = \text{Ru-tpy } 0,5 \text{ mmolL}^{-1} \text{ em lipossoma, } 3 =$	
	ZnPC 5,0 $\mu$ molL <sup>-1</sup> em lipossoma e 4 = ZnPC /Ru-tpy (5,0	
	$\mu$ molL <sup>-1</sup> /0,5 mmolL <sup>-1</sup> ) no sistema lipossomal	76
Figura 23	Toxicidade no excuro (A) e fototoxicidade (B) para células	
	B16-F10. 1 = ZnPC 1 $\mu$ molL <sup>-1</sup> em lipossoma; 2 = ZnPC/Ru-	
	tpy $(1\mu mol L^{-1} / 50 \mu mol L^{-1})$ no sistema lipossomal; 3 =	
	ZnPC/Ru-tpy (5 $\mu$ molL <sup>-1</sup> /50 $\mu$ molL <sup>-1</sup> ) no sistema lipossomal	
		78

# LISTA DE TABELAS

Tabela I	Tamanho das partículas	50
Tabela II	Rendimentos Quânticos de Fluorescência ( $\Phi_f$ )	59
Tabela III	Tempos de vida de fluorescência ( $\tau_s$ ), Amplitude	
	relativa (A) para o fotossensibilizador ZnPC em meio	
	homogêneo, meio lipossomal e associado ao complexo	
	Ru-tpy	62
Tabela IV	Tempos de vida dos estados excitados tripletes	
	$(\tau_t)$ , Amplitude relativa (A) para o fotossensibilizador	
	ZnPC em meio lipossomal e associado ao complexo Ru-	
	tpy	67
Tabela V	Valores de rendimento quântico de produção do	
	oxigênio singlete	69
Tabela VI	Viabilidade celular após a incubação por 3 horas	
	com as formulações lipossomais estudadas	77

# LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ZnPC	Zinco ftalocianina
Ru-tpy	Complexo nitrosilo de rutênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERONs	Espécies reativas de nitrogênio
NO	Óxido nítrico
TFD	Terapia fotodinâmica
HpD	Hematoporfirina
FS	Fotossensibilizador
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio singlete
•ОН	Radical hidroxila
•O <sub>2</sub> -	Ânion radical superóxido
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
S <sub>0</sub>	Estado fundamental
S <sub>n</sub>	Estado excitado singlete superior
<b>S</b> <sub>1</sub>	Estado excitado singlete
<b>T</b> <sub>1</sub>	Estado excitado triplete
<sup>0</sup> F	Fotossensibilizador no estado fundamental
<sup>1</sup> F	Fotossensibilizador no estado singlete
<sup>3</sup> F	Fotossensibilizador no estado triplete
S	Substrato biológico
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
S-OOH	Peróxidos
NO <sup>+</sup>	Íon nitrosônio
NO	Ânion nitróxido

O <sub>2</sub>	Gás oxigênio
СО	Monóxido de carbono
[Ru(NH.NH)(tpy)NO] <sup>3+</sup>	Complexo nitrosilo de rutênio
DPPC	DL-α-dopalmitoil fosfatidilcolina
SRE	Sistema do retículo endotelial
LLC	Lipossomas de longo tempo de circulação
PEG	Polietileno glicol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ε	Coeficiente de absortividade molar
$I_{f0}$	Intensidade de fluorescência na ausência do supressor
$I_{f}$	Intensidade de fluorescência na presença do supressor
kq	Constante de supressão
$ au_0$	Tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor
[Q]	Concentração do supressor
Ksv	Constante de Stern-Volmer
$\Phi_{ m f}$	Rendimento quântico de fluorescência
$\Phi_{\Delta}$	Rendimento quântico de oxigênio singlete
$ au_\Delta$	Tempo de vida de oxigênio singlete
$\Phi_{ m NO}$	Rendimento quântico de liberação de NO
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium
$\tau_{\rm s}$	Tempo de vida de fluorescência
А	Amplitude relativa
${T_1}^*$	Estado triplete excitado

$ au_t$	Tempo de vida dos estados tripletes
<sup>1</sup> ZnPC	Zinco ftalocianina no estado singlete
<sup>0</sup> ZnPC	Zinco ftalocianina no estado fundamental
<sup>3</sup> ZnPC	Zinco ftalocianina no estado triplete
ISC	Cruzamento intersistema

#### RESUMO

Neste trabalho, propusemos a utilização do fotossensibilizador Zinco ftalocianina (ZnPC) associado ao complexo nitrosilo de rutênio (Ru-tpy) por meio de lipossomas de longo tempo de circulação (LLC), com o objetivo de analisar o efeito sinérgico das espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERONs) geradas, respectivamente pelos mesmos, atuando sobre uma linhagem celular neoplásica.

Foram estudadas as propriedades fotofísicas e fotoquímicas do sistema misto ZnPC/Ru-tpy, empregando-se técnicas de espectroscopia no estado estacionário e resolvido no tempo. Com isto, foi possível determinar importantes parâmetros que elucidaram seu perfil fotodinâmico, confirmando sua viabilidade para aplicação em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Estes estudos também indicaram uma possível interação entre a ZnPC e o complexo Ru-tpy, através do mecanismo de transferência de elétron do fotossensibilizador para o complexo de rutênio, desta forma liberando o óxido nítrico (NO).

Realizamos os estudos em meio biológico, utilizando a linhagem neoplásica B16-F10, avaliando a toxicidade dos sistemas lipossomais na ausência e na presença de luz.

Os nossos resultados demonstraram que o sistema misto ZnPC/Ru-tpy em meio lipossomal, apresenta propriedades fotofísicas e fotobiológicas úteis, gerando as espécies reativas (EROs e ERONs), atuando sinergicamente pela Terapia Fotodinâmica (TFD).

#### ABSTRACT

We proposed in this work the use of photosensitizer Zinc phthalocyanine (ZnPC) associated with the nitrosyl ruthenium complex (Ru-tpy) in long circulation liposomes ("stealth liposome"), with the aim of analyzing the synergistic effects of the reactive of oxygen species (EROs) and reactive of nitrogen species (ERONs) generated, acting on the neoplastic cell line.

The photophysical and photochemical properties of the mix system ZnPC/Ru-tpy were studied being used spectroscopic techniques in the stationary state and resolved in the time. With these studies were possible to determine important parameters that elucidated its photodynamic profile, confirming the viability for application in studies *in vitro* and *in vivo*.

These studies also indicated the possible interaction between ZnPC and the complex Ru-tpy through the electron transfer process from the photosensitizer to the nitrosyl ruthenium complex which leads to release nitric oxide (NO).

We accomplished the biological studies using the neoplastic cell line B16-F10, evaluating the toxicity of the liposomes in the absence and presence of light.

Our results demonstrated that the system ZnPC/Ru-tpy in the "stealth liposome" presents useful photophysical and photobiological properties, generating the species reactives (EROs and ERONs) to work synergically for the Photodynamic Therapy (PDT).

### I. INTRODUÇÃO

#### I.1 Câncer

"Câncer" é o termo comum dado a qualquer tumor maligno ou neoplasia. É uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células, que sofreram mutações genéticas, invadindo e destruindo os tecidos adjacentes, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Quase todos os tumores são causados por anomalias no material genético das células normais. Estas anomalias podem ser causadas por fatores desencadeantes, como a exposição excessiva à radiação ultravioleta (câncer de pele), a infecção por certos vírus (câncer no colo do útero, alguns linfomas), tabagismo (câncer no pulmão, na laringe), o alcoolismo (câncer no estômago, no pâncreas), entre outros.

A Organização Mundial de Saúde apontou em 2005, a morte de 35 milhões de pessoas por doenças crônicas no mundo, sendo que aproximadamente 7,6 milhões ou 21,7% correspondam às neoplasias. No Brasil, as estimativas segundo o Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009 apontam que ocorrerão 467 mil casos novos de cânceres. O câncer de pele do tipo não-melanoma será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores na próstata e no pulmão para o sexo masculino e o câncer de mama e de colo de útero para o sexo feminino.

Diante deste cenário, fica clara a necessidade de investimentos no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do câncer bem como na pesquisa de sistemas, que permitam a detecção precoce e assistência aos pacientes.

Os tratamentos clássicos adotados contra o câncer são realizados através da cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea, sendo em muitos casos, necessário combinar essas modalidades. No entanto, esses tratamentos convencionais apresentam inúmeras desvantagens, como por exemplo, a desfiguração do paciente, resultando em prejuízos à sua auto-estima, inúmeros efeitos colaterais (quimioterapia e

radioterapia), além de uma perspectiva de cura nem sempre eficaz (Sharman, Allen e Van Lier, 1999)

Em virtude disso, tratamentos alternativos têm sido desenvolvidos, dentre os quais se destaca a Terapia Fotodinâmica (TFD), que por sua vez é uma técnica pouco invasiva e que pode ser aplicada repetidamente no mesmo local, além de apresentar mínimos efeitos colaterais (Pandey, 1992; Kübler, 2005).Assim, o FDA (U.S. Food and Drug Administration) a reconheceu como uma terapia eficaz para o tratamento de várias doenças, em especial o câncer.

#### I.2. Terapia Fotodinâmica

A utilização da luz como agente modulador da resposta biológica dos organismos vivos é conhecida há muito tempo. Seu uso como agente terapêutico remonta a 3000 AC, quando os egípcios usaram-na para tratar vitiligo através de uma combinação de plantas ingeridas pelo paciente e sua exposição à luz solar. O sucesso do tratamento baseava-se no desenvolvimento, no organismo, de uma reação fotoquímica mediada pelos psoralenos presentes nas plantas (Spikes e Bommer, 1993).

No entanto, foi somente em meados de 1900 que Oscar Raab relatou que a combinação de baixas concentrações de certos compostos coloridos (usualmente chamados de corantes, ex. eosina e acridina), na presença de luz, poderia rapidamente induzir a destruição de protozoários e paramécios.

Após Raab, as primeiras experiências visando a aplicação dos efeitos fotodinâmicos no tratamento de tumores em humanos foram realizadas em 1903 por Tappeiner e Jesionek, que empregaram uma solução aquosa de eosina como um fotossensibilizador para tratar o câncer de pele, observando-se uma redução na massa tumoral após o tratamento.

No período de 1960 a 1967, Lipson e colaboradores (Lipson e Baldes, 1960), investigaram o acúmulo preferencial de um derivado hematoporfirínico (Photofrin<sup>®</sup> I, HpD) em tumores, utilizando camundongos e ratos e observaram que a incidência da luz proporcionou a regressão da doença. Subseqüentemente, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma mulher que possuía câncer de mama usando HpD e irradiação seletiva do tumor com luz visível, marcando assim o início da TFD como terapia clínica para câncer (Simplício , Maionchi e Hioka, 2002).

Nos anos 70, Dougherty et al (Dougherty, 1978; Dougherty, 1984; Dougherty, 1985) demonstraram que o HpD, em combinação com luz vermelha, poderia erradicar completamente o crescimento de tumores de mama em ratos. Diante deste resultado, a purificação do HpD realizado por Dougherty levou à produção do Photofrin II<sup>®</sup>, que foi aplicado em vários testes de cânceres de bexiga e pele, sendo a primeira droga aprovada pelo FDA para uso em humano, conduzindo às pesquisas modernas de TFD.

No Brasil, a técnica da TFD vem sendo estudada desde 1995 pelo grupo de Pesquisa em Fotobiologia e Fotomedicina da FFCLRP-USP, no estudo de novos sistemas de liberação de fármacos e fotossensibilizadores aplicados à TFD (Macaroff et al., 2005; Primo, Bentley e Tedesco, 2008; Rotta , Lunardi e Tedesco, 2003; Simioni et al., 2008). O procedimento da TFD vem sendo aplicado em estudos clínicos desde 1999 pela equipe do Dr. Guilherme Cestari Filho, com a implementação desta técnica no Hospital Amaral de Carvalho em Jaú-SP, onde pacientes com câncer nas cordas vocais, estômago, garganta e pulmão vêm sendo tratados. Além das aplicações clínicas, têm sido realizadas pesquisas científicas para o desenvolvimento de novas fontes de luz laser.

Em 2000, no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, foram iniciados tratamentos de doenças de pele utilizando TFD, com a participação de um grupo composto por farmacêuticos, químicos, médicos e físicos (Souza et al., 2005; Tedesco, Rotta e Lunardi, 2003; Turchiello et al., 2003). A Terapia Fotodinâmica (TFD) consiste na administração sistêmica ou tópica de certos agentes fotossensibilizadores, que após se localizarem preferencialmente nos tecidos neoplásicos são ativados pela luz (em comprimento de onda apropriado) e na presença de oxigênio molecular, levam a produção de oxigênio singlete ( $^{1}O_{2}$ ) e radicais livres (ex. espécies reativas de oxigênio  $^{\circ}O_{2}^{-}$  e  $^{\circ}OH$ , denominadas EROs) que são tóxicos para as células (Figura 1).



Figura 1 - Princípio básico da terapia fotodinâmica (TFD).

O fármaco fotossensibilizador ou a luz, isolados, não apresentam toxicidade para o organismo. Entretanto, a combinação dos dois agentes em presença de oxigênio induz a morte das células tumorais (Mironov et al., 2003).

#### I.3. Mecanismos Fotoquímicos e Fotofísicos da TFD

A luz utilizada na TFD deve ser de um comprimento de onda adequado, capaz de ser absorvida pelo fármaco fotossensibilizador (FS). A faixa espectral em que esta absorção ocorre, deve estar situada preferencialmente na região entre 600 e 850 nm, conhecida como "janela terapêutica", onde a transparência do tecido biológico é elevada, e a absorção desta irradiação por moléculas endógenas do sistema biológico é praticamente nula. A penetração da luz nos tecidos é mais efetiva na região de 630 nm (cerca de 2-3 mm) e na região de 700-800 nm (cerca de 5-6 mm) (Dougherty e Macdonald, 2001; Bonett e Martinez, 2001).

Desta maneira, a irradiação do tumor leva a absorção da luz pelo fármaco fotossensibilizador previamente incorporado, levando as moléculas a um estado eletrônico de maior energia e, na presença de oxigênio molecular (presente no meio), desencadeia vários processos fotofísicos, levando a produção de espécies reativas excitadas que acabam por induzir a produção de espécies reativas de oxigênio ( ${}^{1}O_{2}$ ,  ${}^{\bullet}O_{2}^{-}$ ,  ${}^{\bullet}OH$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) definidas como EROs. Estas espécies atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares, desencadeando assim a morte de tais tecidos por um processo de apoptose ou necrose celular (De Rosa e Crutchley, 2002; Bonnett e Berenbaum, 1989).

No diagrama de Jablonski (Figura 2), estão representados os processos fotofísicos e fotoquímicos, que um fotossensibilizador pode sofrer após a absorção de radiação visível.

O fármaco fotossensibilizador no estado fundamental  $(S_0)$ , após absorver um fóton de luz, é excitado a um estado eletrônico de maior energia  $(S_n)$ , decaindo rapidamente por processos não radiativos ao mais baixo estado singlete  $(S_1)$ . A seguir, dá origem ao estado excitado triplete de menor energia  $(T_1)$  por um processo de interconversão, o mesmo via cruzamento intersistema (Sharman, Allen e Van Lier, 1999; Foote, 1991a; De Rosa e Crutchley, 2002). Este decaimento energético é fundamental para a terapia fotodinâmica. A substância fotossensível localizada no estado triplete excitado, apresenta um tempo de vida maior do que no estado singlete excitado (Sharman, Allen e van Lier, 2000). Dessa forma o fotossensibilizador no estado  $T_1$  pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, ou biomoléculas localizadas próximas a região irradiada, gerando espécies citotóxicas produzidas durante a TFD (Van Nostrum, 2004; Oleinick, Morris e Belichenko, 2002; Gorman et al., 2004).



Figura 2: Digrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização

Os processos de fotossensibilização podem ser explicados através de dois mecanismos distintos (Sharman, Allen e Van Lier, 1999; Foote, 1991a):

- Mecanismo Tipo I: envolve a abstração de um átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no estado excitado triplete e diferentes macromoléculas biológicas, levando à formação de radicais livres e/ou íons radicais. Poucos materiais biológicos apresentam facilidade de fotorredução (por exemplo, quinonas e citoquinas) em processos nos quais temos a oxidação do fotossensibilizador a cátion radical- $\pi$  e o substrato é reduzido. A espécie reduzida pode transferir um elétron ao oxigênio molecular presente no meio formando espécies reativas de oxigênio como peróxidos, ânion superóxido, etc. Este mecanismo de fotossensibilização é esquematizado abaixo:

- Reação redox com biomoléculas, produção de superóxido, etc.

 ${}^{0}F \rightarrow {}^{1}F \rightarrow {}^{3}F$ 

 ${}^{3}F + S \rightarrow F^{+ \bullet} + S^{- \bullet}$  (transferência de elétrons)  $S^{- \bullet} + {}^{3}O_{2} \rightarrow S + O_{2}^{- \bullet} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{\bullet}$ 

Onde  ${}^{0}F$ ,  ${}^{1}F$ ,  ${}^{3}F$  é o FS no estado fundamental, singlete e triplete, respectivamente e S é o substrato.

- Mecanismo Tipo II: ocorre a transferência de energia para o oxigênio molecular com formação do oxigênio singlete ( $^{1}O_{2}$ ). O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa que oxida vários substratos biológicos. Acredita-se que o oxigênio singlete seja o principal mediador dos danos fotodinâmicos nos sistemas biológicos, pois reage rapidamente e indiscriminadamente com os mais variados materiais biológicos eletrofílicos, como lipídios insaturados, proteínas, ácidos nucléicos, etc, sendo apontado como o principal responsável pela inativação da célula tumoral. Este mecanismo é esquematizado abaixo:

- Mediado por oxigênio singlete. Por exemplo, a peroxidação lipídica.

 ${}^{0}F \rightarrow {}^{1}F \rightarrow {}^{3}F$   ${}^{3}F + {}^{3}O_{2} \rightarrow {}^{0}F + {}^{1}O_{2}$  (transferência de energia)  ${}^{1}O_{2} + S \rightarrow S$ -OOH (peróxidos, etc)

Onde <sup>0</sup>F, <sup>1</sup>F, <sup>3</sup>F é o FS no estado fundamental, singlete e triplete, respectivamente e S é o substrato.

Embora boa parte dos estudos envolvendo a TFD se basearem na utilização do oxigênio singlete como espécie reativa (Yamamoto, Nagano e Okura, 2003; Kochevar, Lambert e Lynch, 1996; DePaoli, DePaoli e Borissevitch, 2002), tem sido grande a procura por outras espécies úteis, como radicais livres derivados dos corantes utilizados, outras espécies radicalares independentes de oxigênio (Niziolek, Korytowski e Girotti, 2003), como por exemplo as espécies reativas de nitrogênio (Rotta, Lunardi e Tedesco, 2003; Oliveira et al., 2007; de Lima, R. G., 2006).

#### I.4. Os fotossensibilizadores utilizados na Terapia Fotodinâmica

Os fotossensibilizadores podem ser definidos como substâncias capazes de absorverem a luz e transferirem esta energia absorvida para moléculas de oxigênio molecular gerando EROs, bem como causarem danos biológicos. Estes compostos devem possuir certas características, bem como possuir propriedades fotofísicas favoráveis como: baixa toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada, alta afinidade e penetração preferencial nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais (o que, em geral, acontece com o aumento de hidrofobicidade do FS). Além destas características, é interessante que o FS seja anfifílico, ou seja, solúvel em meio fisiológico, mas que contenha também uma matriz hidrofóbica, permitindo a sua permeação na membrana celular.

O grande avanço da TFD teve início com a descoberta da primeira geração de fotossensibilizadores derivados de hematoporfirina (HpD). O primeiro composto aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizado clinicamente foi o Photofrin<sup>®</sup>, um derivado da hematoporfirina que apresenta outros variantes comerciais (Photosan<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup>, Photocarcinorin<sup>®</sup> e Haematodrex<sup>®</sup>) (Nyman e Hynninen, 2004; Brown , Brown e Walker, 2004). Estes FS de primeira geração são eficientes, entretanto não absorvem bem a luz na região do vermelho do espectro eletromagnético (acima de 650 nm), dentro da "janela terapêutica" e os mesmos ainda possuem baixa seletividade na sua incorporação e retenção pelos tecidos tumorais

Dentro da segunda geração de moléculas fotossensibilizadoras merecem destaque alguns compostos potencialmente ativos, como as clorinas e as ftalocianinas que têm sido muito estudados nos últimos anos (Oliveira et al., 2005; Nunes, S. M., 1999). Comparados com os derivados de hematoporfirina (HpD) e sua versão comercial Fotofrin <sup>®</sup>, esta segunda geração de fotossensibilizadores realmente exibe uma melhor atividade fotodinâmica. As ftalocianinas foram consideradas como ótimos agentes fotossensibilizadores para a TFD

devido a sua baixa toxicidade, uma alta capacidade de se acumular seletivamente no tecido tumoral e um alto coeficiente de absortividade molar na região do vermelho do espectro (comprimento de ondas maiores que 650 nm) (Sibata, Tedesco e Marchetti, 2004; Oliveira et al., 2005; Nunes, Sguilla e Tedesco, 2004).

A estrutura das ftalocianinas (Owens et al., 1998) mimetizam as porfirinas em seu macrociclo central, que consiste de uma unidade cíclica tetrapirrólica (Figura 3). Contudo, nas ftalocianinas, as subunidades pirrólicas são unidas por átomos de nitrogênio, enquanto nas porfirinas as subunidades são unidas através de pontes de metileno. Além disso, nas ftalocianinas, a conjugação do macrociclo é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas, resultando em uma forte banda de absorção na região de 650 a 670 nm.



Figura 3: Estrutura química das metalo ftalocianinas.

A complexação das ftalocianinas com íons metálicos diamagnéticos, tais como  $Zn^{2+}$ , Al<sup>3+</sup> e Ga<sup>3+</sup> dão origem a complexos de ftalocianinas com alto rendimento quântico do estado excitado triplete ( $\phi_T > 0,4$ ) e com tempos de vida longos (Darwent et al., 1982). Conseqüentemente, pode-se esperar que estes complexos exibam atividades fotoquímicas e fotodinâmicas. Entre as metalo ftalocianinas, o complexo de Zn (II) apresenta as propriedades fotofísicas mais favoráveis para a aplicação na TFD (Oliveira, D. M., 2006; Nunes, S. M., 1999; Allen, Sharman e Van Lier, 2001).

Além disso, a Zinco ftalocianina (ZnPC) é promissora para uso na TFD, devido a sua elevada seletividade pelo alvo tumoral e sua geração eficiente de oxigênio singlete altamente citotóxico ao alvo biológico (Rotta, Lunardi e Tedesco, 2003; Oliveira, D. M., 2006; Lunardi , Rotta e Tedesco, 2003).

O interesse pela combinação de diferentes espécies reativas, de fotossensibilizadores ou até mesmo a combinação de terapias tem sido crescente. Este conceito de sinergismo na TDF já vem sendo trabalhado, por exemplo, na utilização de terapias conjuntas, como a Hipertermia e a TFD (Oliveira et al., 2006), a Eletroquimioterapia e TFD (Sersa et al., 2008) ou através do uso combinado de fármacos fotossensibilizadores, que atuam por diferentes mecanismos, com localização biológica diferentes, como por exemplo as porfirinas e ftalocianinas com propriedades quelantes (Lunardi e Tedesco, 2005).

Podemos também combinar diferentes moléculas de fotossensibilizadores em uma mesma estrutura que podem agir como fotossensibilizadores clássicos e ao mesmo tempo induzir mudanças na homeostase iônica celular usando, por exemplo, a ZnPC associada ao quelante Ca<sup>2+</sup> (Lunardi, Rotta e Tedesco, 2007). Além disso, há porfirinas e ftalocianinas associadas a moléculas de éteres de coroa que podem atuar diretamente na homeostase de Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>, induzindo mudanças diretas no potencial de membrana, que promovem a morte celular (Pelegrino et al., 2005).

Dentro deste contexto de sinergismo, a proposta apresentada neste trabalho foi a de associar o fotossensibilizador ZnPC, ao complexo nitrosilo de rutênio [Ru(NH.NH)(tpy)NO]<sup>3+</sup>, doador de NO, através do uso de um sistema de liberação de fármaco adequado, com o objetivo de analisar o efeito conjunto das espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio, (ERONs) atuando sobre a linhagem de célula neoplásica (Barbugli, P. A., 2007; de Lima, R. G., 2006; Oliveira, D. M., 2006).

#### I.5 Compostos nitrosilos de rutênio

O óxido nítrico, NO, é a única molécula endógena conhecida, que reúne as propriedades de neurotransmissor, de mediador constitutivo e indutível e de agente citotóxico. Possui ação reguladora da pressão sangüínea, atua no sistema imunológico e nas atividades do cérebro, fígado, pâncreas, útero e pulmões (Cullota e Koshland Junior, 1992; Feldman, Griffith e Stuehr, 1993; Ignarro, 2000; Richter-Addo e Legzdins, 1992; Wink et al., 1993).

A molécula de NO é uma das moléculas classificadas como mensageiro em vários processos biológicos. Nessa função, o NO não depende de transportadores específicos, nem de canais de passagem intracelulares. Ele se difunde pela célula, com facilidade, tanto em meio hidrofílico como em meio lipofílico. Sua ação fisiológica depende muito mais de suas propriedades físico-químicas do que de sua conformação espacial (Feldman, Griffith e Stuehr, 1993).

Atribuem-se as ações bioquímicas do óxido nítrico à diversidade de suas espécies, ou seja, a espécie NO<sup>+</sup> (íon nitrosônio), que é formada pela retirada do elétron desemparelhado no orbital  $\pi^*$ , e a espécie NO<sup>-</sup> (ânion nitróxido), que é formada pela adição de um elétron ao orbital. O ânion nitróxido é isoeletrônico ao gás oxigênio (O<sub>2</sub>) e pode existir no estado singlete de maior energia ou no estado triplete, de menor energia. O íon nitrosônio é isoeletrônico ao monóxido de carbono (CO) e reage rapidamente com água e outros nucleófilos (Wink et al., 1993).

Diante da variedade de condições no meio intracelular, como tipo de célula alvo, concentração de NO e a presença de outras espécies radicalar, o NO atua em carcinogênese, progressão tumoral e na terapia do câncer (Chiang et al., 2005; Weller, 2003). Sabe-se que a apoptose ou morte celular programada é caracterizada por uma série de alterações celulares morfológicas e bioquímicas. Um mau funcionamento deste processo contribui para a

patogênese de diversas doenças (Miller e Marx, 1998). O NO é um potente modulador da homeostase operacional de célula, prevenindo ou induzindo a apoptose. Esta ação é modulada por interações diretas e indiretas sendo dose-dependentes e tipo celular específicas. Em algumas células o NO pode promover a apoptose, enquanto que em outras o NO pode inibir o processo de morte celular programada (Chung et al., 2001).

Devido à extrema instabilidade das moléculas de NO em meio biológico e seu curto tempo de meia vida (aproximadamente 5s), torna-se difícil o estudo de seus efeitos fisiológicos. Assim, existe um grande interesse em compostos químicos que possam servir de pró-drogas para a liberação controlada do NO nos sistemas biológicos (Works et al., 2002; Ignarro, 2000).

É de interesse para os ensaios clínicos, o estudo envolvendo complexos metálicos que possam agir como doadores de NO em um organismo biológico, haja vista a possibilidade de se controlar a liberação do óxido nítrico por reações fotoquímicas e/ou redutimétricas. Metalo-drogas, cujo centro metálico é o rutênio, possuem boa aplicação clínica, principalmente pela baixa toxicidade apresentada pelo metal. Isto se deve, em parte, à semelhança das propriedades físico-químicas deste metal com as do ferro. O organismo consegue proteger-se dos efeitos causados por um excesso de ferro através do aumento da produção de proteínas captadoras de íons ferro, como a transferrina e a albumina. Alguns autores acreditam que o mecanismo de proteção contra a toxicidade do rutênio seria igual ao do ferro (Allardyce e Dyson, 2001).

O complexo metálico doador de NO utilizado nesse projeto foi o  $[Ru(NH.NH)(tpy)NO]^{3+}$ , designado ao longo do trabalho por <u>Ru-tpy</u>. Sua estrutura está apresentada na figura 4. Este complexo foi sintetizado pelo grupo do Prof. Roberto Santana da Silva, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), com o qual desenvolvemos trabalhos de colaboração.



 $[Ru(terpy)(L)NO^+]^{3+}$ 

**Figura 4:** Fórmula estrutural do complexo [Ru(NH.NH)(tpy)NO]<sup>3+</sup> (Ru-tpy).

#### I.6 Sistemas de liberação de fármacos

A solubilidade dos fotossensibilizadores é um fator essencial para seu uso no tratamento de neoplasias utilizando a TFD. Um dos desafios dos nossos estudos é vencer a baixa seletividade do tumor e a baixa solubilidade em água de muitos compostos, determinada quase sempre pela sua natureza hidrofóbica. Portanto sua administração intravenosa torna-se uma tarefa difícil.

Dessa forma, vários sistemas de liberação de fármacos têm sido desenvolvidos para modificar as propriedades fisico-químicas, farmacocinéticas e biológicas dos fotossensibilizadores (Konan, Gurny e Allémann, 2002; Primo, Bentley e Tedesco, 2008; Renno e Miller, 2001). Além disso, esta estratégia viabiliza a associação dos fotossensibilizadores com outros compostos úteis para TFD, tornando possível a utilização de sistemas sinérgicos (Primo et al., 2008; Pelegrino et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Macaroff et al., 2005).

Dentre os sistemas de liberação em estudo, destacam-se os lipossomas, os eritrócitos resselados isolados do sangue, as nanopartículas biodegradáveis, as microesferas protéicas e poliméricas entre outros sistemas (Chen, Pogue e Hasan, 2005; Lovcinsky et al., 1999; Primo , Bentley e Tedesco, 2008; Simioni et al., 2007).

Os lipossomas são estruturas vesiculares coloidais formados por bicamadas fosfolipídicas. São formadas em água pela agregação de moléculas anfifílicas (como por exemplo, as molécula de DL- $\alpha$ -dipalmitoil fosfatidilcolina – DPPC) e o Colesterol em bicamadas que se fecham, resultando em um compartimento interno aquoso) conforme mostrado na figura 5.



**Figura 5:** Representação esquemática de uma vesícula unilamelar mostrando interações com diferentes substâncias.

Estes sistemas podem solubilizar fármacos lipofílicos (na bicamada lipídica), que de outra forma seriam difíceis de serem administrados intravenosamente, podem prolongar o tempo de ação do fármaco, liberando este lentamente no corpo. Deste modo são endocitados ou fagocitados por células, abrindo novas oportunidades para fármacos que dependem da administração lipossomal (Hoebeke, 1995). Podem também incorporar substâncias hidrofílicas (dentro do compartimento interno aquoso).

Os lipossomas e outros veículos de liberação de fármacos, quando são administrados via intravenosa, tendem a ser rapidamente fagocitados por macrófagos em vários tecidos do sistema do retículo endotelial (SRE), com acúmulo preferencial no fígado e no baço. Este processo de remoção pode ocorrer, primeiramente pela opsonização dos lipossomas, realizado

pelas opsoninas, que são elementos do soro sanguíneo que se ligam às partículas estranhas e promovem a fagocitose, seguida da endocitose do lipossoma marcado pelo macrófago (Woodle e Lasic, 1992).

Com base nas considerações apresentadas, existe a necessidade de que o sistema de liberação, contendo o fármaco, circule na corrente sanguínea por um tempo mais longo visando uma seletividade deste fármaco em um tecido alvo específico. Surgiram então os chamados lipossomas de longo tempo de circulação (LLC) ou lipossomas furtivos (*stealth*) (Allen, Hansen e Rutledge, 1989), nos quais a bicamada lipídica contém glicolipídios ou, mais recentemente, lipídios conjugados como polietilenoglicol (PEG) (Nunes, Sguilla e Tedesco, 2004). Desta forma, estes sistemas são capazes de escapar do sistema imunológico e permanecer estável por um tempo mais prolongado na corrente sangüínea, dirigindo-os assim a outros sítios no organismo.

Portanto, a idéia de utilizar compostos fotossensíveis que são capazes de liberar diferentes espécies reativas, associados em um mesmo sistema de liberação, abre um amplo campo de ação dentro da TFD, tornando a idéia da TFD sinérgica cada vez mais promissora.

# **II. OBJETIVOS**

O objetivo principal deste trabalho foi analisar do ponto de vista fotofísico, fotoquímico e fotobiológico os efeitos da associação de dois compostos fotoativos (ZnPC e Ru-tpy), em sistemas de veiculação do tipo lipossomas de longo tempo de circulação (LLC) de modo que esta ação sinérgica viesse a maximizar a ação fotodinâmica dos mesmos.

#### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **III.1 Materiais**

Os materiais comerciais listados a seguir foram utilizados sem tratamento prévio: DLα-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), (Sigma Chemical Company), Colesterol (Avanti Polar Lipids), polietilenoglicol (PEG) (Avanti Polar Lipids), Zinco ftalocianina (Aldrich). O complexo Ru-tpy utilizado neste trabalho foi sintetizado e gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Roberto Santana da Silva (FCFRP-USP) com o qual desenvolvemos trabalhos de colaboração.

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura, obtida através de filtragem sequencial com colunas de troca iônica em um sistemas E-Pure da Barnestead D 3750, com filtragem final em membrana de 0,2  $\mu$ m de diâmetro, pressão máxima de operação em 50 % psi (3,4 Kg/cm<sup>2</sup>) e resistividade de 18 m $\Omega$ .

As soluções tampão fosfato (pH 7,4) 10 mmolL<sup>-1</sup>, utilizadas nas preparações lipossomais e nos demais experimentos, foram preparadas pela mistura de diferentes volumes de soluções de fosfato monobásico de sódio 0,01 molL<sup>-1</sup> (Sigma) e fosfato dibásico de sódio 0,01 molL<sup>-1</sup> (Sigma) preparados em água ultrapura.

Os solventes de grau analítico relacionados a seguir foram utilizados sem tratamento prévio: dimetilformamida-DMF (Sigma), dimetilsulfóxido-DMSO (Sigma), etanol (Merck), isopropanol (Merck).

Os estudos envolvendo cultura de células utilizaram os seguintes materiais: meio de cultura RPMI 1640 (Gibco BRL), antibiótico (Penicilina/Streptomicina-Gibco BRL), glicose (Sigma), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>, Nuclear), soro fetal bovino (Gibco BRL), tampão Hank´s (Gibco BRL), 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium (MTT, Sigma), corante azul de tripan (Gibco BRL), tripsina-EDTA (Gibco BRL).
Estes estudos foram realizados com a linhagem neoplásica de melanoma de rato B-16 F10, adquirida junto a American Type Culture Colletion (ATCC). Esse tipo de célula neoplásica, é obtido originalmente de ratos C57BL/6JD/D. A indução deste tipo de neoplasma (melanoma cutâneo) é feita pela injeção de metilcolantreno na cavidade toráxica de ratos. A remoção do fluido presente nesta cavidade é feita após dois dias, e a subseqüente transfusão para outros animais garante a proliferação deste tipo de células.

A solução de soro bovino fetal foi pré-aquecida a 56°C, para inativação das enzimas. Em seguida, foi estocada em frascos de 150 mL e conservados no freezer a -20°C. O soro bovino fetal apresenta em sua composição básica: insulina, hormônios e vários outros fatores, indispensáveis ao crescimento celular.

Além destes materiais encontram-se à disposição, diferentes solventes orgânicos, bem como outros sais inorgânicos, comumente utilizados em laboratório.

#### **III.2 Preparações**

As soluções de tampão fosfato (pH 7,4) 10 mmol $L^{-1}$  foram rotineiramente preparadas pela mistura de diferentes volumes de soluções de fosfato de sódio monobásico 10 mmol $L^{-1}$  e fosfato de sódio dibásico 10 mmol $L^{-1}$  em água ultrapura.

As soluções estoques de ZnPC foram preparadas em uma mistura de DMSO/DMF (1:1) e as soluções estoques do complexo Ru-tpy foram preparadas em tampão fosfato pH 7,4, as duas soluções foram armazenadas por um período não superior a duas semanas, na ausência de luz a - 20 °C.

As concentrações foram determinadas espectrofotométricamente, utilizando-se os coeficientes de extinção molar em 670 nm:  $\varepsilon = 2,3 \times 10^5 \text{ molL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  em DMSO/DMF para a Zinco ftalocianina (ZnPC) e em 358 nm  $\varepsilon = 2,45 \times 10^4 \text{ molL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o complexo Ru-tpy.

Todas as formulações lipossomais de DPPC foram preparadas pelo método de injeção, conforme descritos na seção Métodos III.4.2 e armazenadas na ausência total de luz a temperatura ambiente, por até 10 dias.

As soluções de tampão Hank's (contendo antibiótico, sem bicarbonato de sódio e fenol) foram rotineiramente preparadas pela diluição 10 vezes em água ultrapura, seguida de filtração com membrana estéril de poro de 0,22 µm.

A solução de azul de tripan utilizada para determinar a viabilidade celular através da contagem de células foi preparada na concentração de 0,4%, utilizando-se tampão Hank's como solvente (pH 7,2). Posteriormente, a solução final foi filtrada, através de uma membrana de poro de 0,22 µm, e em seguida, aliquotada.

A solução de tripsina 0,25% utilizada no processo de replicagem celular para desprender as células aderidas do tipo B-16 F10 das placas de cultura foi preparada diluindo a solução estoque 10 vezes concentrada em tampão fosfato estéril com pH=7,4.

O meio de cultura RPMI 1640, utilizado no crescimento e manutenção das culturas neoplásicas de melanoma de rato B-16 F10, contém 2,0 mmolL<sup>-1</sup> de L-glutamina e adicionamos 2,0 g de bicarbonato de sódio e 2,4 g de Hepes para sua preparação.

Após a preparação de cada meio, antes da adição da solução de soro bovino fetal, o pH foi ajustado para 7,4, sendo a mistura filtrada para sua esterelização com filtro estéril de 0,22 μm, em capela de fluxo laminar e recolhido em frasco estéril.

Antes da sua utilização, este meio foi enriquecido com 10 % de solução de soro bovino fetal, 1 mL de antibiótico/antimicótico, denominado meio completo.

#### **III.3** Aparelhagem

Nas preparações lipossomais feitas pelo método de injeção em meio orgânico utilizam uma bomba de injeção peristáltica da World Precision Instruments (WPI) (modelo SP 100i). Nos estudos espectrofotométricos, foram realizadas as medidas de intensidade de absorção em um espectrofotômetro de absorção modelos U-3000 da Hitachi; e os espectros de emissão de fluorescência foram registrados em dois espectrofluorímetros, Jobin Yvon/ Fluorolog 3 da Spex, modelo FL3 e F-4500 da Hitachi, usando celas de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Para as medidas de decaimento de fluorescência foi utilizado o método de contagem simples de fótons. O sistema utilizado para excitação consiste de um conjunto de lasers. No início do processo, um laser de diodos, com dois feixes emitindo em 809 nm, cada qual com 24 W de potência, bombeia um laser de estado sólido (Nd:YVO<sub>4</sub> - Millenia Xs - Spectra Physics) que emite em 1064 nm. O feixe passa então, por um cristal dobrador de freqüências e o feixe final, com potência podendo chegar a 10 W e comprimento de onda igual a 532 nm, bombeia um laser de titânio-safira (Tsunami - Spectra Physics); o cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com freqüência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Um filtro bi-refringente seleciona o comprimento de onda desejado. Após o selecionador de pulsos, o feixe passa por um gerador de segundos e terceiros harmônicos, cujos comprimentos de onda do feixe na saída estão na faixa utilizada para excitação de nossas amostras, que vai de 280 até 330 nm. O sinal detectado como pulso de excitação, chamado IRF (instrument response function), tem largura total a meia altura de 60 ps. Este estudo foi realizado com o auxílio do Laboratório de Biofísica Molecular da FFCLRP/USP, o qual é coordenado pelo Prof<sup>o</sup> Dr. Amando Siuiti Ito.

A fonte de irradiação utilizada nos experimentos de determinação do espectro de absorção do transiente e do tempo de vida do triplete dos fármacos estudados, foi um sistema laser Nd-YAG da Continuum, modelo SURELITE I-10. Para o agente fotossensibilizador ZnPC e para o complexo de rutênio em estudo, foi utilizado como fonte de excitação, o terceiro harmônico do laser Nd-YAG (355 nm). A energia média utilizada foi da ordem de 30 mJ/cm<sup>2</sup>, através de uma fenda de 8,0 mm de diâmetro. A uma distância de 10,0 cm da fenda

do laser, foi posicionado um suporte termostatizável para celas com agitação magnética (Hellmam CUV-O-Stir).

A intensidade de luz foi determinada e o conjunto de pulsos por um "Power meter" Field Master da Coherent (Santa Clara, CA), usando-se uma cabeça de detecção LM-30 V.

Nos estudos envolvendo a detecção do espectro de absorção de transiente, na faixa de 300 a 800 nm, adotou-se como procedimento o registro ponto a ponto, em intervalos de 10 nm após a excitação ( $\lambda_{exc}$ =355 nm) com laser de Nd-YAG. Os sinais dos transientes gerados foram detectados por fotomultiplicadora da Hamamatsu modelo R928P e transferidos para um osciloscópio digital da Tektronix modelo TDS 340A, sendo consecutivamente transferidos para um microcomputador e analisados com o auxílio do *software* Gem fornecido pela Edinburgh Analytical Instruments (Livingston, UK). Para a obtenção do tempo de vida do estado excitado triplete no comprimento de onda máximo de absorção do triplete foi feita uma média de 10 pulsos de laser.

O terceiro harmônico do laser Nd-YAG também foi utilizado como fonte de excitação nos estudos de produção de oxigênio singlete pela ZnPC. O sinal de emissão de fosforescência do oxigênio singlete foi identificado em 1270 nm, utilizando-se um fotodetector de germânio da North Coast Scientific Corporation, modelo 823A

Nos experimentos de fotólise e ensaios biológicos de fototoxicidade em célula, utilizou-se o sistema laser de diodo *Eagle* da Quantum Tech, no comprimento de onda de emissão em 675 nm acoplado a uma fibra óptica operando no máximo de potência de 200 mJ.

A liberação fotoinduzida de NO gasoso foi detectada diretamente por um sensor amperométrico amiNO-700, desenvolvido pela Innovative Intruments, Inc. (NOmeter). Este sensor é formado por um eletrodo envolto por uma membrana semipermeável e tem sensibilidade na faixa de 50 nAmpére a 50 µAmpére, com tempo de resposta relativamente curto, compatível com o sistema pulsado de irradiação proposto.

Nos estudos do tamanho das partículas foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano system ZS da Malvern-UK, o qual possui um laser de He-Ne de 4 mW que opera no comprimento de onda de 633 nm, permitindo realizar medidas não invasivas por "backscatter optics" (NIBS), e possui a capacidade de determinar tamanho de partículas no intervalo de 2 nm a 3 µm. As medidas foram realizadas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medida na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise.

Os trabalhos em cultura de células da linhagem B-16 F10 foram realizados em capela de fluxo laminar, modelo A152 da Veco, esterilizada com luz germicida e fluxo contínuo de ar. Foram também utilizados os seguintes aparelhos nos estudos de cultura e crescimento celular: microscópio invertido Axiovert 40 CFL da Zeiss (para análise de forma, tamanho e crescimento de cultura), centrífuga da CentriBio, autoclave modelo AB-42 da Phoenix, banhos termostatizáveis Fischer Scientific, modelo 801 e espectrofotômetro para leitura de microplacas (ELISA) modelo Versa Max da Molecular Device.

Além destes equipamentos foram utilizados: balança eletrônica Libror (modelo AEL 200), sistema vortex Genie 2, ultrason Branson (modelo 2210), pH-metro (modelo accument<sup>®</sup> 50 da Fisher Scientific).

#### **III.4 Métodos**

## III.4.1. Estudos espectroscópicos no estado estacionário da Zinco ftalocianina e do complexo Ru-tpy em meio homogêneo

A investigação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário da ZnPC e do complexo Ru-tpy em meio homogêneo foi baseada em medidas diretas dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência.

Os estudos espectroscópicos no estado estacionário da ZnPC foram realizados em meio orgânico (etanol) e, do complexo de rutênio foram realizados em tampão fosfato pH 7,4.

Os espectros de absorção foram registrados em uma cela de absorção de 1 cm de caminho óptico, utilizando como referência os meios em estudo na ausência dos fármacos. Os espectros de absorção foram então registrados de maneira a cobrir uma faixa espectral de 300 a 800 nm.

Com base na análise dos dados espectrais de absorção, foi determinado a seguir, o espectro de emissão de fluorescência da ZnPC, utilizando-se os comprimentos de onda de excitação máxima deste para excitação das amostras. Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados dentro da faixa específica 630 a 750 nm, com excitação fixa em 610 nm.

## III.4.2 Preparação Zinco ftalocianina, do complexo Ru-tpy e da associação dos dois fármacos em meio lipossomal

Os compostos em estudo foram incorporados aos lipossomas de longo tempo de circulação (LLC) de DL-α-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), preparados pelo método pelo método de injeção conforme descrito por Nunes e colaboradores (Nunes, Sguilla e Tedesco, 2004).

Uma solução etanólica de 0,360 mL contendo 2,07 mg de DPPC (0,525 mmolL<sup>-1</sup>), 0,27 mg de colesterol (0,14 mmolL<sup>-1</sup>) e um volume adequado de corante para se obter uma concentração final 5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> da ZnPC. Foram injetadas por uma bomba peristáltica com velocidade de adição controlada sobre uma solução 35  $\mu$ molL<sup>-1</sup> de PEG 2000 em tampão fosfato pH 7,4 armazenada em uma jaqueta termostatizada (volume final de 5,0 mL). A solução tampão estava contida em um recipiente cilíndrico de 2,0 cm de diâmetro e a injeção foi realizada à aproximadamente 2,5 cm abaixo da superfície líquida, a uma temperatura de 57°C sob agitação magnética na ausência de luz e com uma velocidade de 1,0  $\mu$ L/s (360  $\mu$ L/h).

Os lipossomas contendo o complexo Ry-tpy foram preparados pelo mesmo procedimento descrito acima, sendo o complexo de rutênio adicionado junto a solução tampão nas concentrações de 50 x  $10^{-6}$  molL<sup>-1</sup> e 5 x  $10^{-3}$  molL<sup>-1</sup>, antes da adição do lipídeo.

Após cada preparação lipossomal foi registrado o espectro de absorção dos fármacos associados ao sistema lipossomal, a fim de se verificar a eficiência da incorporação e a ausência de formação de agregados superiores. A concentração da ZnPC e do complexo de rutênio foram calculadas a partir de seus coeficientes de absortividade molar.



Figura 6: Figura esquemática da preparação dos lipossomas.

## III.4.3 Caracterização do sistema lipossomal misto por medidas de tamanho de partículas.

Realizamos o estudo do tamanho das partículas lipossomais formadas com o intuito de averiguar a viabilidade destas preparações quanto a homogeneidade no tamanho das partículas formadas e influências de agentes formadores deste sistema (ZnPC, complexo Ru-tpy, DPPC, colesterol e PEG) em suas propriedades físico-químicas.

Utilizamos como ferramenta de análise as técnicas de espalhamento de luz, para determinação do tamanho das partículas coloidais, e medidas de intensidade de emissão de fluorescência, para os sistemas com presença do agente fotossensibilizador Zinco ftalocianina (ZnPC) e do complexo Ru-tpy.

As amostras foram diluídas em água mili-Q (proporção 1:10) e submetidas a medidas de espalhamento dinâmico de luz, utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano System ZS (Malvern-UK). Estas amostras foram colocadas em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram feitas à temperatura ambiente (25°C). O equipamento possui um laser de He-Ne de 4 mW, operando num comprimento de onda de 633 nm e realiza as medições não invasivas por "backscatter optics" (NIBS). As medições foram feitas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medição na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise. Neste experimento, o equipamento utiliza um laser modulado e mede o deslocamento Doppler na luz espalhada pelas partículas e realiza em média vinte e duas medidas para cada amostra analisada.

## III.4.4 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da Zinco ftalocianina, do complexo Ru-tpy e da associação dos dois fármacos em meio lipossomal

As propriedades espectroscópicas no estado estacionário da ZnPC, do complexo Rutpy e da associação dos dois fármacos em meio lipossomal foram estudadas baseadas em medidas diretas dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência. Os espectros de absoção foram registrados de 200 a 800 nm e os espectros de emissão de fluorescência fotoestacionária, foram registrados na faixa de 630 a 750 nm, com excitação fixa em 610 nm, em cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico. III.4.5 Estudos de supressão de fluorescência da Zinco ftalocianina pelo complexo Rutpy no sistema lipossomal.

A supressão da fluorescência emitida pela ZnPC incorporada aos lipossomas foi estudada usando o complexo Ry-tpy como agente supressor.

O estudo espectroscópico de supressão de fluorescência no estado estacionário do fotossensibilizador ZnPC foi realizado na concentração fixa de 5,0 μmolL<sup>-1</sup>. Para o complexo Ru-tpy a concentração final foi definida até 50 μmolL<sup>-1</sup>.

A emissão de fluorescência foi obtida por excitação da amostra em comprimento de onda fixo de 610 nm.

Em celas de fluorescência de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm foram colocados 2,0 mL do lipossoma de ZnPC. Após termostatizar à 37°C foram feitas as medidas de intensidade de emissão de fluorescência inicial na ausência do supressor. A cada medida foram adicionadas alíquotas crescentes de uma solução estoque do supressor (Ru-tpy), tomando o cuidado de manter o volume constante e a concentração máxima de 50 µmolL<sup>-1</sup>. Estas soluções foram agitadas e termostatizadas à 37°C e em seguida foram realizadas as medidas de intensidade de emissão de fluorescênca na presença do supressor.

Os dados obtidos a partir dos experimentos no estado estacionário foram analisados inicialmente pela equação 1 de Stern-Volmer:

$$I_{f0}/I_f = 1 + kq \tau_0 = 1 + Ksv [Q]$$
 (equação 1)

Onde: I<sub>f0</sub> e I<sub>f</sub> são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor respectivamente, kq é a constante de velocidade de supressão,  $\tau_0$  é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor, [Q] é a concentração do supressor e Ksv = kq  $\tau_0$  é a constante de supressão de Stern-Volmer (Lehrer, 1971). Os gráficos de Stern-Volmer foram construídos a partir das intensidades de fluorescência relativas, e os valores das constantes de supressão de Stern-Volmer, Ksv, foram obtidos utilizando-se o método de ajuste linear de acordo com a equação 1.

III.4.6 Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) da Zinco ftalocianina e de sua associação ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal.

A determinação do rendimento quântico de fluorescência para o FS estudado neste trabalho nos diferentes meios e na ausência e na presença do complexo Ru-tpy, foi realizada através do método relativo, utilizando-se a ZnPC, em etanol, como padrão, conforme formalismo descrito por Demas e Crosby, 1971 (Demas e Crosby, 1971). em que  $\phi$  é rendimento quântico, Área é a integral sobre a banda de emissão e n é o índice de

em que  $\varphi$  e rendimento quantico, Area e a integral sobre a banda de emissão e n e o indice de refração do solvente.

Uma solução de ZnPC em meio orgânico, utilizada como padrão ( $\Phi_f = 0,28$ ) foi inicialmente preparada de modo a obter uma absorbância constante na faixa de 0,1 (no comprimento de onda de excitação). As soluções contendo a ZnPC em etanol, incorporada aos lipossomas de longo tempo de circulação (LLC) e associada ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal também foram preparadas por diluições infinitas, para obter absorbâncias da ordem de 0,1 (no comprimento de onda de excitação), de modo a minimizar o efeito de filtro interno. A seguir, foi traçado o espectro de emissão de fluorescência corrigido em cada ambiente estudado, sendo determinada a área sob as curvas no intervalo de 630 a 750 nm.

## III.4.7 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ZnPC em meio lipossomal e para o sistema misto

Os tempos de vida de fluorescência da ZnPC (5,0 µmolL<sup>-1</sup>) incorporada aos lipossomas e da sua associação com o complexo de rutênio em meio lipossomal, foram

obtidas pela técnica de contagem simples de fótons. O comprimento de onda de excitação e de emissão utilizado para a ZnPC foi de 633 nm e 680 nm, respectivamente. Para cada medida de decaimento foram coletadas em média 10.000 contagens. As curvas de decaimento de fluorescência foram analisadas, utilizando-se o software operacional do próprio instrumento, com ajuste exponencial, os quais foram validados através do valor mínimo na função chiquadrado ( $\chi^2$ ).

#### III.4.8 Estudos dos estados excitados tripletes por fotólise por pulso de laser

Os estados excitados tripletes do fotossensibilizador ZnPC em meio lipossomal e da associação dos dois fármacos em meio lipossomal foram estudados e gerados por fotólise por pulso de laser. As soluções de trabalho foram preparadas de maneira semelhante àquelas descritas anteriormente na concentração fixa de 5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> para o fotossensibilizador ZnPC e 50,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> para o complexo Ru-tpy .

Utilizou-se como fonte de excitação o terceiro harmônico (355 nm) do laser pulsado de Nd-YAG, como descrito anteriormente na seção III.3.

O comprimento de onda utilizado para monitoramento da absorção máxima do transiente gerado e para a determinação do tempo de vida do estado excitado triplete do mesmo foi de 480 nm.

O espectro de absorção do transiente foi registrado ponto a ponto, em intervalos de 10,0 nm na faixa de comprimento de onda de 300 a 800 nm, onde se utilizaram disparos ajustados na razão de 3 disparos seqüenciais para cada intervalo de 10 nm, com excitação do laser em 355 nm.

### III.4.9 Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete $(\Phi_{\Delta})$

Inicialmente, analisou-se a eficiência quântica de geração de  ${}^{1}O_{2}$  para a Zinco ftalocianina em meio orgânico (etanol). As soluções possuíam a mesma intensidade de absorção em 355 nm (Abs = 0,3), sendo as mesmas saturadas por degaseamento com oxigênio por 30 minutos. Uma solução de feoforbide-a, com as mesmas características das soluções que continham as amostras, foi utilizada como amostra padrão ( $\Phi_{\Delta}$ = 0,59) (Arbogast et al., 1991). Na detecção do  $\phi_{\Delta}$  utilizou-se o método fotofísico, que consiste no monitoramento da intensidade de emissão de fosforescência do  ${}^{1}O_{2}$  em 1270 nm , empregando-se o sistema resolvido no tempo (E.A.I. – LP 900, pulsado com um laser Nd:YAG a 355 nm, com um detector de germânio da North Coast Scientific Corporation, modelo 823 A), item III.3. A potência do laser de Nd:YAG utilizado na detecção do  $\phi_{\Delta}$  produzido pelo fotossensibilizador ZnPC e da associação dos dois fármacos em meio lipossomal foi de 30 mJ por pulso. A intensidade máxima de fosforescência no tempo t = 0 foi determinada pelo método relativo com base na equação 2, conforme descrito por Arbogast 1991 (Arbogast et al., 1991).

$$\Phi_{\Delta} = \frac{I}{I_{Ref}} * \Phi_{\Delta_{Ref}} * \frac{\tau_{\Delta_{Ref}}}{\tau_{\Delta}}$$
(Equação 2)

na qual I<sub>ref</sub> é a intensidade de emissão de fosforescência do  ${}^{1}O_{2}$  produzido pelo composto padrão, I é a intensidade de emissão de fosforescência do  ${}^{1}O_{2}$  produzido pela amostra,  $\Phi_{\Delta ref}$  é o rendimento quântico de produção de  ${}^{1}O_{2}$  produzido pela referência,  $\tau_{\Delta ref}$  é o tempo de vida do  ${}^{1}O_{2}$  produzido pela referência e  $\tau_{\Delta}$  é o tempo de vida do  ${}^{1}O_{2}$  produzido pela amostra.

#### III.4.10 Estudos de detecção de NO gerado por fotólise de pulso a laser em 675 nm.

A liberação fotoinduzida de NO gasoso foi detectada pelo sensor amperométrico amiNO – 700, o NOmeter. Sua calibração foi realizada através de uma solução aquosa padrão de NO gasoso (Kudo et al., 1997). Em uma quantidade de 10 mL de tampão, borbulhou-se argônio por 30 min a fim de remover todo o oxigênio presente no meio. O gás NO foi gerado por uma solução de ácido nítrico 50%, na qual mergulharam-se pedaços de cobre metálico (Cu<sup>0</sup>) (Equação 3). Antes de borbulhar a solução padrão, o gás passou por uma solução de KOH, para remover possíveis traços de NO<sub>2</sub> presentes na mistura gasosa. Esse aparato foi construído em uma capela (Figura 7).

 $3Cu_{(s)} + 8H^{+}_{(aq.)} + 8NO_{3}^{-}_{(aq.)} \rightarrow 2NO_{(g)} + 3Cu^{2+}_{(aq.)} + 6NO_{3}^{-}_{(aq.)} + 4H_{2}O_{(l)}$  (Equação 3)



Figura 7: Aparato montado em capela para geração de óxido nítrico gasoso.

O óxido nítrico gasoso foi borbulhado por 1 hora. Tempo suficiente para saturar a solução aquosa. A concentração da solução aquosa de NO foi determinada por titulometria, conforme Mori e Bertotti 2000 (Mori e Bertotti, 2000), para o qual encontrou-se um valor 2,1  $\times 10^{-3}$  molL<sup>-1</sup>. Assim, a partir dessa solução padrão de concentração conhecida de NO gasoso, calibrou-se o aparelho. Acoplou-se o NOmeter a um frasco lavador contendo 10 mL de tampão, após borbulhar argônio por 30 min, ajustou-se o aparelho para o zero. Este tampão deve apresentar o mesmo pH do tampão que será utilizado para dissolver o composto no momento da fotólise. A seguir gerou-se uma concentração conhecida de NO na solução de análise pela adição de um volume específico da solução padrão de NO. Após alguns segundos, quando o valor da corrente de NO na solução permaneceu constante, adicionou-se uma nova quantidade da mesma solução padrão. O aumento observado de corrente mostrou-se proporcional à concentração de NO adicionado.

Com relação à utilização do NOmeter, alguns cuidados devem ser considerados, pois a membrana do eletrodo tem um certo tempo de vida e deve ser trocada periodicamente. Para

cada membrana é necessária uma nova calibração. É importante que a calibração seja feita no mesmo pH em que será realizado o experimento de fotólise. A resposta amperométrica do eletrodo depende da concentração hidrogeniônica do meio.

Nos experimentos de fotólise, houve um acompanhamento da variação espectroscópica na região UV-visível e outro com registro amperométrico *in situ* da liberação de NO gasoso (NOmeter). Para os dois tipos, os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a realização do experimento de fotólise com acompanhamento da variação do espectro na região do UV-visível, preparou-se a amostra do complexo Ru-tpy associado a Zinco ftalocianina em meio lipossomal. Foi obtido um espectro UV-visível inicial, antes da irradiação. A seguir a amostra foi irradiada durante certo tempo e foi realizado um novo espectro na região do UV-visível. Esse procedimento foi repetido até que não houvesse mais variação no espectro da amostra.

A fotólise com acompanhamento *in situ* da liberação de NO gasoso foi realizada pelo acoplamento do NOmeter na cubeta a ser irradiada. Como ilustra a figura 8 abaixo.



Figura 8: Medida do NO liberado através do NO-meter (acima) e da fibra do Laser (abaixo).

O cálculo de rendimento quântico de NO ( $\phi_{NO}$ ) foi realizado com base nos resultados obtidos em cada pico do cronoamperograma, no qual foi calculado um valor de concentração de NO liberado. Com o valor da intensidade da luz incidente (I<sub>s</sub>) fornecida, calculou-se pela Equação 4 o rendimento quântico  $\phi_t$  para cada irradiação. Esses valores foram plotados em um gráfico em função do tempo. O valor extrapolado para tempo zero por regressão linear foi admitido como sendo o do rendimento quântico de liberação de NO ( $\phi_{NO}$ ). Isso foi feito com o intuito de minimizar o efeito de fotólises secundárias. Ou seja, a partir de certo tempo de irradiação pode ocorrer fotodegradação dos produtos, e o rendimento quântico calculado passa a não corresponder à reação de interesse.

$$\phi_{t} = \frac{n_{L}}{I_{s} \times t \times (1 - 10^{-abs})}$$
(Equação 4)

n<sub>L</sub> = número de moles de NO liberados pela reação fotoquímica;

 $I_s$  = intensidade da luz incidente;

t = tempo de fotólise (s);

 $1 - 10^{-abs}$  = quantidade de luz absorvida pela amostra, onde abs é o valor da absorbância da amostra no comprimento de onda de irradiação.

#### **III.4.11 Estudos in vitro**

## III.4.11.1 Crescimento e manutenção da cultura de células da linhagem neoplásica de melanoma de rato (B-16 F10)

Para a manutenção e crescimento das células B-16 F10 são necessários vários cuidados, como o descongelamento e a preparação do meio de cultura das mesmas.

As matrizes de células B-16 F10 (0,5 x  $10^6$  células/mL) estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas a 37°C e adicionadas a um frasco de cultura (Corning, estéril, de 75 cm<sup>2</sup>) contendo 10,0 mL do meio completo (RPMI 1640). O frasco de cultura foi colocado em uma incubadora a 37°C com 5,0 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas.

Após este período, realizou-se a primeira repicagem de células. Como as células crescem aderidas no frasco celular, foi necessária a utilização de uma solução de tripsina 0,05% para soltá-las, sendo necessário o contato com esta solução por aproximadamente 60 segundos. Assim, o meio contendo as células foi adicionado em um tubo cônico do tipo Falcon e centrifugado a 25 °C com rotação constante de 5000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso com 10 mL de meio completo; as células foram, então, distribuídas em dois frascos de culturas celulares novos de 75 cm<sup>2</sup>.

A troca de meio destas células foi realizada sempre que necessário, em média a cada dois dias. Quando o número médio de células atingiu 1,5 x  $10^6$  células/mL, ou uma nova subcultura de células (0,5 x  $10^6$  células/mL) foi preparada ou as mesmas foram isoladas e congeladas.

No processo de congelamento, as células foram lavadas com o meio RPMI e posteriormente congeladas em tubos criogênicos, contendo uma solução composta de soro fetal bovino e DMSO (90/10) numa proporção final de 4:1.

#### III.4.11.2 Controle da integridade da membrana celular

Quando se trabalha com cultura de células, costuma-se analisar a integridade da membrana celular como controle de viabilidade em função do crescimento. Este controle foi feito também para avaliar o número médio de células presente na cultura bem como, para avaliar o número de células com rompimento de membrana plasmática. Este teste utiliza o corante azul de tripan e é chamado teste de exclusão do azul de tripan.

Assim, com base no número total de células contadas tem-se uma amostragem estatística de toda a cultura celular. Este teste foi aplicado rotineiramente para controle do crescimento e viabilidade das culturas celulares (Gareth, 1996; Freshney, 1986).

Sendo assim, em um tubo de 1,5 mL foram colocados 180  $\mu$ L de tampão Hank's, 180  $\mu$ L de solução de azul de tripan (0,4 % m/v) e 20  $\mu$ L da suspensão de células. A mistura foi agitada, e após dois minutos com a ajuda da câmara de Neubauer, fez-se a contagem das mesmas e calculou-se a viabilidade celular.

Um outro método para avaliar a atividade celular, é o método que se baseia no uso do corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium), conhecido como teste do MTT. Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

54

O método do MTT é simples, confiável e reprodutível. Soluções de MTT dissolvidas em meio de cultura ou em soluções salinas, balanceadas na ausência de indicador vermelho de fenol, são de cor amarelada. A dehidrogenase mitocondrial das células viáveis atuam sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa. Os cristais são então dissolvidos em isopropanol acidificado. O produto obtido é monitorado espectrofotometricamente em 560 e 690 nm. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazan formado, indicando assim o grau de citotoxicidade (Vistica et al., 1991; Mosmann, 1983).

O método do MTT de monitoramento da citotoxicidade *in vitro* é bem estabelecido para o uso com placas de poços múltiplos. Para melhores resultados, devem ser empregadas sempre as células na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não deve exceder  $1,0 \ge 10^6$  células/mL. Cada teste deve incluir um controle contendo meio completo na ausência do fármaco em estudo.

Inicialmente, as células B-16 F10 foram removidas da incubadora, sendo levadas à capela de fluxo laminar e distribuídas nas placas de poços múltiplos (96 poços). A estas células foi adicionada uma solução de MTT 1,0 mg/mL. A cultura foi conduzida à incubadora por 4 horas. Após o período de incubação, as células foram removidas da estufa de CO<sub>2</sub> e os cristais de formazan resultantes foram dissolvidos pela adição de isopropanol.

O teste é finalizado através de medidas espectrofotométricas da absorbância no comprimento de onda de 560 nm, descontando-se a absorbância de fundo a 690 nm (Freshney, 1986). Estas medidas foram obtidas por um sistema de leitura de microplacas (ELISA) da Molecular Device modelo Versa Max.

## III.4.11.3 Determinação da Toxicidade da ZnPC, do complexo Ru-tpy e do sistema lipossomal misto na ausência de luz.

Uma suspensão de 0,5 x  $10^6$  células/mL da linhagem B-16 F10 foi preparada inicialmente. As células foram então incubadas em placas de petri (60 mm x 15 mm), com meio completo. Após as células atingirem confluência (de 24 a 48 horas), o meio foi retirado e as células foram lavadas com 5 mL de tampão Hank's. Logo em seguida a retirada do tampão foram adicionadas as soluções em estudo para serem testadas em um meio específico contendo 3% de soro fetal bovino no volume final de 3mL. Depois de 3 horas de incubação das células, as soluções foram retiradas, lavadas novamente com tampão Hank's e soltas com a solução de tripsina 0,25%. Estas suspensões de células foram, então, transferidas para um tubo falcon e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e as células foram suspensas com os seus respectivos meios. As suspensões foram, em seguida, transferidas para as placas de poços múltiplos (96 poços) com 200  $\mu$ L por poço de meio completo. Depois de 24 horas o meio foi retirado, as células foram lavadas com 200  $\mu$ L de tampão Hank's e foram adicionados 50  $\mu$ L da solução de MTT 1 mg/mL. As células foram incubadas por mais 4 horas e 150  $\mu$ L de isopropanol foram acrescentados para completa solubilização do formazan.

### II.4.11.4 Estudo da fototoxicidade do sistema lipossomal da ZnPC e do sistema lipossomal misto

Nos estudos de fototoxicidade, foi avaliado o efeito da luz sobre as culturas celulares (células B-16 F10) incubadas com o sistema lipossomal, variando a concentração da Zinco ftalocianina de 1 e 5  $\mu$ molL<sup>-1</sup> e a concentração fixa de 50  $\mu$ molL<sup>-1</sup> para o complexo de rutênio. Então analisamos o efeito da concentração da ZnPC sob a concentração fixa do complexo de rutênio. Neste experimento, as células com aproximadamente 1 x 10<sup>6</sup> células/mL

foram incubadas por um intervalo de tempo de 3 horas a  $37^{\circ}$  C em uma estufa de CO<sub>2</sub>. Os sistemas lipossomais foram retirados e adicionou-se tampão Hank´s nas placas de Petri.

A cultura celular foi submetida à intensidade de irradiação de 0,5 J/cm<sup>2</sup> obtido do sistema laser de diodo *Eagle* da Quantum Tech, no comprimento de onda de emissão em 675 nm acoplado a uma fibra óptica, operando no máximo de 300 mW de potência.

Após a irradiação, tampão Hank´s foi removido, as células foram transferidas para as placas de multipoços com meio RPMI completo e levadas à estufa de CO<sub>2</sub> por um período de 24 horas. Após este intervalo, foi realizado o ensaio de viabilidade com MTT para a avaliação da viabilidade celular.

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando o programa *Excel Microsoft 2003* e as análises estatísticas foram realizadas no programa *Prism 3.0*, através dos testes de análise de variância (*One-way Anova*) sendo aplicado o pós-teste *Newman-Keuls*.

### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho se baseia nos estudos para a utilização sinérgica das espécies reativas de oxigênio (EROs) e das espécies reativas de nitrogênio (ERONs) geradas pelo emprego de um agente fotossensibilizador clássico (a ZnPC) e de um complexo nitrosilo de rutênio Ru-tpy capaz de potencializar a ação da Terapia Fotodinâmica no tratamento de células neoplásicas.

Realizamos o estudo destes fármacos associados à veículos de liberação de origem lipídica como os lipossomas. Neste trabalho, escolheu-se os lipossomas de longo tempo de circulação (LLC), a base de DL- $\alpha$ -dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) 0,525 mmolL<sup>-1</sup> e polietileno glicol (PEG) preparados pelo método de injeção etanólica, conforme descrito na seção III.4.2.

Sendo assim, foi realizada inicialmente, a caracterização espectroscópica do sistema lipossomal da ZnPC associada ao complexo Ru-tpy. Além deste estudo, foi realizada a caracterização espectroscópica da ZnPC em meio orgânico (etanol) e do complexo Ru-tpy em tampão fosfato, para efeito de comparação.

#### **IV.1 Estudos Fotofísicos**

### IV. 1.1 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da Zinco ftalocianina (ZnPC) e do complexo Ru-tpy em meio homogêneo e lipossomal

A escolha do fármaco fotossensibilizador adequado deve ser baseada sempre na investigação preliminar dos parâmetros fotofísicos em solução homogênea e nos sistemas micro-heterogêneos a serem utilizados em sua veiculação *in vitro* e *in vivo*. Tais sistemas são importantes, pois aumentam a seletividade dos mesmos pelos tecidos tumorais, sendo este um dos principais objetivos a serem atingidos nos estudos envolvendo a TFD. Estes estudos mimetizam ao máximo os sistemas biológicos reais, oferecendo assim a possibilidade de se controlar a biodistribuição e farmacocinética dos sistemas, quando administrados nos tecidos tumorais.

Com base nas considerações apresentadas, na primeira etapa do trabalho, foram realizados estudos espectroscópicos no estado fundamental (espectroscopia de absorção e de emissão de fluorescência no estado estacionário) da ZnPC em etanol, do complexo Ru-tpy em tampão fosfato e dos fármacos associados em meio lipossomal.

Nas Figuras 9 e 10, respectivamente estão apresentados os espectros de absorção para a ZnPC (5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup>) em etanol e do complexo Ru-tpy em tampão fosfato (50,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup>).



**Figura 9:** Espectro de absorção da ZnPC (5,0 µmolL<sup>-1</sup>) em etanol.

O espectro de absorção da ZnPC (5,0 µmolL<sup>-1</sup>) em etanol revelou um máximo de absorção na banda-Q do espectro em 666 nm. Esta banda está localizada dentro da janela terapêutica (600-800 nm), região máxima de penetração tecidual, reforçando desta forma a idéia de que este fármaco pode ser muito útil para os estudos *in vivo* futuros (Nunes, S. M. T., 2003; Oliveira, D. M., 2006).



**Figura 10:** Espectro de absorção do complexo Ru-tpy 50 μmolL<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH= 7,4.

Já o perfil do espectro de absorção para o complexo Ru-tpy apresentou como esperado, uma banda em 356 nm atribuída como sendo uma banda Transferência de Carga Metal Ligante (TCML) do tipo  $d_{\pi}(Ru^{II}) \rightarrow \pi^{*}(bdqi\text{-COOH},NO^{+})$ . Observou também a banda de TCML na região do visível (500 nm), devido à transição  $d_{\pi}(Ru^{II}) \rightarrow \pi^{*}(bdqi\text{-COOH})$ . Este comportamento para o complexo nitrosilo de rutênio foi muito estudado (Oliveira et al., 2004; de Lima et al., 2005), e está de acordo com a literatura (de Lima, R. G., 2006).

Utilizamos também a espectroscopia de fluorescência para a caracterização das propriedades fotofísicas da Zinco ftalocianina (5,0 µmolL<sup>-1</sup>).



**Figura 11:** Espectro de emissão de fluorescência (excitação fixa em 610 nm) da ZnPC (5,0 µmolL<sup>-1</sup>) em etanol.

O espectro para a ZnPC sob excitação de 610 nm demonstra o máximo de emissão de fluorescência 682 nm, coerente com dados já relatados na literatura (Tedesco, Rotta e Lunardi, 2003; Oliveira et al., 2006).

No entanto, ao excitarmos o complexo Ru-tpy em dois comprimentos de onda distintos, 355nm e 532 nm, não observamos uma emissão de fluorescência. Este comportamento foi observado também para outros nitrosilos de rutênio como discutido por Sauaia et al 2005 (Sauaia et al., 2005b) e Oliveira et al 2004 (Oliveira et al., 2004).

Os perfis espectrocópicos de absorbância e emissão de fluorescência para a associação lipossomal da ZnPC com o complexo Ru-tpy foram também avaliados e discutidos a seguir.

Os sistemas lipossomais estudados são compostos de DPPC/ col/ PEG na concentração de 11:6:0,7 (onde DPPC = dipalmitoil fosfatidilcolina, col = colesterol e PEG = polietileno glicol).

A figura 12 mostra os espectros de absorção da ZnPC, do complexo Ru-tpy e da associação dos dois compostos em meio lipossomal.



**Figura 12:** Espectro de absorção em meio lipossomal da ZnPC (), do complexo Ru-tpy () e dos dois compostos associados ().

Podemos observar que após a associação dos fármacos no sistema lipossomal, não houve mudanças na posição dos comprimentos de onda de absorção e emissão máxima dos fármacos estudados, nem tão pouco mudanças em seus perfis espectrais.

A espectroscopia de absorção dos fármacos associados no sistema lipossomal também não revela a presença de dímeros ou agregados superiores para a faixa das concentrações estudadas (para ZnPC 5,0 μmolL<sup>-1</sup> e para o complexo 50,0 μmolL<sup>-1</sup>). Um perfil espectral, com bandas finas de absorção centradas em 670 nm para a Zinco ftalocianina e a banda pequena em 356 nm e a banda larga em 500 nm para o complexo Ru-tpy, idêntico ao observado em solução homogênea, confirma que não houve mudanças nas propriedades espectrais dos mesmos após sua incorporação nesse sistema de liberação.

#### IV.1.2 Caracterização do sistema lipossomal misto por medida do tamanho de partículas

Este estudo é realizado apenas para analisar o tamanho das partículas formadas, determinando uma característica particular do sistema de veiculação preparado. A análise da distribuição do tamanho da ZnPC, do complexo Ru-tpy e da associação dos dois compostos em meio lipossomal, foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP/USP da Prof<sup>a</sup> D<sup>a</sup>. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, em um equipamento adquirido junto ao grupo Multiusuário do qual fazemos parte.

A técnica do espalhamento de luz tem como objetivo auxiliar na caracterização dos lipossomos, os quais devem apresentar dimensões nanométricas.

As amostras foram diluídas em água mili-Q (proporção 1:10) e submetidas a medidas de espalhamento dinâmico de luz, utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano System ZS (Malvern-UK). Estas amostras foram colocadas em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram feitas à temperatura ambiente (25°C). O equipamento possui um laser de He-Ne de 4 mW operando num comprimento de onda de 633 nm e realiza as medições não invasivas por "backscatter optics" (NIBS). As medições foram feitas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medição na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise.

O tamanho das partículas foi medido pelo mesmo equipamento de espalhamento dinâmico da luz. Neste experimento, o equipamento utiliza um laser modulado e mede o deslocamento Doppler na luz espalhada pelas partículas e realiza em média vinte e duas medidas para cada amostra analisada.

A técnica de determinação do tamanho a partir do diâmetro hidrodinâmico de partículas por espalhamento de luz se baseia na análise do movimento Browniano de partículas que é representado por uma função de correlação (G) com decaimento exponencial, conforme descrito pela equação 5.

64

$$G(\tau) = A[1 + B \exp(-2\Gamma\tau)]$$
 (Equação 5)

Onde A, é a linha de base, B, é o intercepto para a função de correlação,  $\Gamma = \mathbf{Dq}^2$ , sendo D, o coeficiente de difusão translacional,  $\mathbf{q} = (4 \pi n / \lambda_0) \sin (\theta / 2)$ , sendo n, o índice de refração da solução,  $\lambda_0$ , o comprimento de onda do laser,  $\theta$ , o ângulo da luz espalhada e  $\tau$ , é o tempo em segundos gasto para se determinar a curva de correlação.

O tamanho médio é então calculado a partir da função de correlação, utilizando-se vários algoritmos presentes no software do equipamento. Em nosso trabalho utilizamos o algoritmo CONTIN, mais satisfatório para distribuições dentro do intervalo de tamanho esperado.

A Tabela I sumariza os valores de tamanho das partículas encontrado nas amostras analisadas.

#### Tabela I - Tamanho das partículas

\_

Lipossoma	Tamanho de partícula (nm)
Vazio	66
ZnPC	78
Ru-tpy	72
ZnPC/Ru-tpy	82

Os resultados obtidos demonstram um diâmetro médio de 74,5 nm para os lipossomas. Entretanto, ocorre um aumento de tamanho no sistema lipossomal misto ZnPC/Ru-tpy. Este efeito é esperado uma vez que deve se considerar a associação de duas moléculas no mesmo sistema de liberação. Apesar disto, este sistema ainda apresenta um tamanho dentro da faixa que permite uma interação celular e sua interiorização.

### IV. 1.3 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ZnPC associada ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal

Nos estudos de emissão de fluorescência apresentados na figura 13, observa-se somente uma diminuição da intensidade de emissão de fluorescência da ZnPC após sua associação ao complexo.



**Figura 13:** Espectro de emissão de fluorescência da ZnPC () e associada ao complexo Rutpy () em meio lipossomal.

Diante destes resultados, achamos interessante observar qual a interferência do complexo de rutênio na emissão de fluorescência da ZnPC, analisando também o valor do rendimento quântico de fluorescência do sistema lipossomal misto (ZnPC/Ru-tpy).

A redução na intensidade de fluorescência da ZnPC em meio lipossomal após a associação com complexo Ru-tpy foi discutida considerando o efeito de supressão induzida pelo complexo de rutênio.

Este comportamento obervado nos leva a pensar que embora a interação da ZnPC com o complexo Ru-tpy não leve a mudanças drásticas no perfil e comportamento de absorção, o mesmo afeta as propriedades do primeiro estado excitado da ZnPC, levando a uma redução do tempo de vida da mesma.

### IV.1.4 Estudos de supressão de fluorescência da Zinco ftalocianina pelo complexo Rutpy em meio lipossomal

A supressão da intensidade de fluorescência da ZnPC pelo complexo Ru-tpy foi monitorada pela medida da intensidade de fluorescência com excitação fixa em 610 nm em função do aumento de concentração do complexo de rutênio na faixa de concentração (0 a 50,0 µmolL<sup>-1</sup>) (Figura 14).



**Figura 14:** Efeitos da supressão na emissão de fluorescência da ZnPC  $(5,0 \ \mu molL^{-1})$  conforme adição do complexo Ru-tpy em meio lipossomal, na faixa de concentração crescente (0 a 50,0  $\mu molL^{-1}$ ).

Os dados obtidos à partir dos experimentos no estado estacionário foram analisados inicialmente pela equação 1 de Stern-Volmer:

$$I_{f0}/I_f = 1 + kq \tau_0 = 1 + Ksv [Q]$$
 (equação 1)

Onde:  $I_{f0} e I_f$  são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor respectivamente, kq é a constante de velocidade de supressão,  $\tau_0$  é o tempo de vida do

fluoróforo ZnPC na ausência do supressor, [Q] é a concentração do supressor e Ksv = kq  $\tau_0$  é a constante de supressão de Stern-Volmer (Lehrer, 1971).

Os gráficos de Stern-Volmer foram construídos a partir das intensidades de fluorescência relativas, e os valores das constantes de supressão de Stern-Volmer, Ksv, foram obtidos utilizando-se o método de ajuste linear de acordo com a equação 1.



**Figura 15:** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da ZnPC conforme adição do complexo Ru-tpy ( $R^2 = 0.982964$ ).

A constante de Stern-Volmer obtida foi  $Ksv = 5793.4 \text{ mol}^{-1}L$  de acordo com ajuste linear mostrado na figura 15. Com este valor conseguimos calcular a constante de supressão kq deste sistema pela equação 1 mostrada acima.

O kq obtido foi de  $1,9 \ge 10^{12} \mod^{-1} \text{L s}^{-1}$  sugerindo uma grande capacidade de supressão da fluorescência da ZnPC pelo complexo de rutênio. Para efeito de comparação, calculamos o kq do supressor AQS<sup>-</sup> (9,10-antraquinona-2-sulfonatada) utilizado nos experimentos de

supressão de fluorescência da ZnPC em suspensão lipossomal realizado anteriormente (Nunes, S. M., 1999). O kq obtido por este supressor AQS<sup>-</sup> foi de 3,67 x 10<sup>10</sup> mol<sup>-1</sup>Ls<sup>-1</sup>.

Pela análise dos espectros de emissão de fluorescência da ZnPC no sistema lipossomal misto mostrado acima e comparando os valores de kq calculados, observamos que o complexo Ru-tpy possui uma elevada capacidade supressora sendo maior que o AQS<sup>-</sup>, confirmando portanto, este efeito no sistema lipossomal proposto (ZnPC/Ru-tpy).

Este resultado pode ser melhor explicado considerando estudos eletroquímicos que sugerem um possível processo de transferência de elétron da interação da ZnPC com o complexo Ru-tpy. A Figura 16 apresenta um voltamograma cíclico do complexo Ru-tpy (1,0 mmolL<sup>-1</sup>) em tampão fosfato (10,0 mmolL<sup>-1</sup>) usando NaBF<sub>4</sub> (0,1 molL<sup>-1</sup>) como eletrólito suporte. Podemos observar duas curvas catódicas reversíveis em -0.13 V e -0.60 V (vs Ag/AgCl) atribuídas à redução do NO<sup>0</sup>/NO<sup>+</sup> e NO<sup>0</sup>/NO<sup>-</sup> respectivamente, estando de acordo com a literatura (Sauaia et al., 2005a). A liberação de NO pelo complexo Ru-tpy foi também comprovada pela detecção de NO *in situ*, quando uma solução aquosa do complexo Ru-tpy foi submetida a um potencial de eletrólise de -0,20 V vs Ag/AgCl. O experimento foi realizado sob atmosfera de argônio para minimizar reações secundárias, envolvendo o consumo de NO livre. O sinal obtido pelo sensor foi observado quando a eletrólise foi iniciada e está apresentado no inserto da Figura 16, indicando a presença de NO livre.



**Figura 16:** Voltanograma cíclico do complexo Ru-tpy  $(1,0 \text{ mmolL}^{-1})$  em 10 molL<sup>-1</sup> de tampão fosfato (pH 7.4). (As setas indicam o começo e a direção). O inserto é o cronoamperograma de liberação do NO controlada pelo potencial de eletrólise em -0.2 V vs Ag/AgCl da solução do complexo Ru-tpy.

Desta forma, o mecanismo de supressão do complexo Ru-tpy pode ter envolvido o estado singlete excitado da ZnPC. Estima-se que energia da banda Q da ZnPC é de 1,81 eV. Levando em consideração que o estado fundamental da ZnPC/ZnPC<sup>+</sup> tem um potencial de oxidação de +0,80 V vs Ag/AgCl (Ma et al., 2007), foi estimado que a variação de potencial para <sup>1</sup>ZnPC\* foi -1,00 eV para o estado singlete. Para o complexo de rutênio  $[Ru(NHNHq)(tpy)NO^+]^{3+}/[Ru(NHNHq)(tpy)NO^0]^{2+}$  seu potencial de redução é -0.13 V vs Ag/AgCl. Desta forma a ZnPC \* deve reduzir facilmente o NO, como descrito na equação 6.

 ${}^{1}ZnPC^{*} + [Ru(NH.NHq)(tpy)NO]^{3+} \rightarrow ZnPC + [Ru(H_{2}O)(NH.NHq)(tpy)]^{2+} + NO^{0}$ 

(Equação 6)

Portanto, o mecanismo descrito de transferência de elétron é o principal responsável pela interação do estado singlete excitado da ZnPC com o complexo Ru-tpy. Sabemos ainda que a ZnPC pode atuar pelo mecanismo Tipo I e Tipo II e que a quantificação de oxigênio singlete deste sistema reforça a idéia de que algum processo de energia está ocorrendo entre  ${}^{3}$ ZnPC\* e o oxigênio molecular do meio, liberando  ${}^{1}$ O<sub>2</sub>.

# IV.1.5 Determinação do rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) da ZnPC e de sua associação ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal

As medidas das propriedades de fluorescência de uma molécula (espectro de fluorescência, espectro de excitação, rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência) são importantes para o entendimento da fotoquímica e fotofísica das espécies no estado excitado singlete.

A absorção de um fóton de luz por uma molécula no estado fundamental (So) promove seus elétrons aos estados excitados singletes mais energéticos (Sn), de onde os mesmos podem retornar para o estado fundamental por vários processos radiativos e não radiativos. A razão entre os números de fótons emitidos a partir do estado excitado singlete por processo radiativo (denominado fluorescência) e o número total de fótons absorvidos define um parâmetro fotofísico denominado rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) (Turro, 1978).

O rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_f$ ) pode ser definido como (Lakowicz, 1999):
$\Phi_f = \frac{n^{\circ} \text{ de moléculas fluorescentes por unidade de tempo por unidade de volume}}{n^{\circ} \text{ de quanta absorvidos por unidade de tempo por unidade de volume}}$ 

Esse parâmetro fotofísico nos fornece a relação entre a quantidade de moléculas que efetivamente fluorescem  $(n_F)$  em relação ao número total de moléculas que foram eletronicamente excitadas  $(N_{exc})$ ,

$$\Phi_f = \frac{n_F}{N_{exc}}$$
 (Equação 8)

O número de moléculas excitadas é, em princípio, equivalente ao número de fótons incidentes e absorvidos.

Nas medidas experimentais de  $\Phi_f$  é necessário que haja uma correção prévia do espectro de emissão do material ou o uso de um padrão que apresente propriedades semelhantes às da espécie em análise (o espectro de emissão da amostra deve apresentar a mesma faixa do de emissão do padrão) (Demas;Crosby, 1971).

Os  $\Phi_f$  geralmente são determinados de forma relativa às propriedades previamente definidas para um composto padrão (Demas;Crosby, 1971), conforme descrito na parte experimental (seção III.4.6).

Uma vez que a TFD é altamente dependente da produção de oxigênio singlete ( ${}^{1}O_{2}$ ), o  $\Phi_{f}$  é uma propriedade fotofísica de grande importância para os FSs, uma vez que interfere diretamente na desativação deste estado. Compostos altamente fluorescentes, usualmente são pouco eficientes como agentes fotodinâmicos, uma vez que a desativação do estado singlete excitado leva a baixa a produção de estados excitados tripletes formados pelo processo de cruzamento intersistemas, o que resulta em baixos processos de transferência de energia entre o estado excitado triplete e o oxigênio, produzindo  ${}^{1}O_{2}$ . Assim, os baixos valores de  $\Phi_{f}$  encontrados contribuem para a formação dos estados excitados tripletes e, portanto, a produção o  ${}^{1}O_{2}$ .

Utilizamos como padrão uma solução de ZnPC em etanol ( $\Phi_f = 0,28$ ) conforme descrito por Oliveira, 2006 (Oliveira et al., 2006).

O método utilizado foi baseado no formalismo descrito por Eaton (Eaton, 1988b; Eaton, 1988a), onde o rendimento quântico de uma amostra desconhecida é dado em relação a um padrão, como demonstrado na Equação 9.

$$\phi_{amostra} = \frac{Area_{amostra}}{Area_{padrão}} x \frac{Absorbância_{padrão}}{Absorbância_{amostra}} x \frac{n_{padrão}}{n_{amostra}} x \phi_{padrão}$$

## (Equação 9)

em que  $\phi$  é rendimento quântico, Área é a integral sobre a banda de emissão e n é o índice de refração do solvente (Demas;Crosby, 1971).

As absorbâncias no comprimento de onda de excitação foram mantidas em aproximadamente 0,01, minimizando a influência da concentração que pode atuar como um filtro interno. Todas as áreas sob os espectros de emissão foram determinadas a partir dos espectros de fluorescência corrigidos. Houve o cuidado para que todas as condições experimentais fossem idênticas como temperatura, equipamento, caminho óptico, etc.

A Tabela II a seguir demonstra os resultados:

**Tabela II -** Rendimentos Quânticos de Fluorescência  $(\Phi_f)$ 

Amostra	$\Phi_{\mathrm{f}}$
ZnPC em etanol <sup>a</sup>	0,28
ZnPC em lipossoma <sup>a</sup>	0,13
ZnPC/Ru-tpy em	0,05
lipossoma	

a: (Oliveira et al., 2006)

Pode-se observar que o rendimento quântico de fluorescência do fotossensibilizador ZnPC diminui após sua incorporação no sistema lipossomal, comparando esse resultado com meio orgânico homogêneo (Oliveira et al., 2006). Esta diminuição se torna ainda maior, quando a ZnPC está associada ao complexo Ru-tpy em lipossoma, observando-se uma diminuição do rendimento quântico de fluorescência da ZnPC de 40% comparado com o valor sem a associação. Este comportamento é confirmado no estudo de supressão da fluorescência da ZnPC pelo complexo realizado anteriormente.

Um menor rendimento quântico de fluorescência pode implicar em um maior rendimento quântico de produção de estado excitado triplete, de onde se originam os processos de fotossensibilização responsáveis pela morte das células malignas.

No entanto, embora ainda mais baixos, os valores do  $\Phi_f$  encontrados permitem que o sistema apresente fluorescência útil para fotodiagnóstico.

IV.1.6 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ZnPC em meio lipossomal e da sua associação ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal.

O tempo de vida de uma substância fluorescente representa o tempo médio que esta molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. A natureza precisa do decaimento de fluorescência pode revelar detalhes sobre as interações do fluoróforo com o meio em que se encontra numa escala de tempo da ordem de nanosegundos. Esta informação está contida no espectro de emissão resolvido no tempo. Estes estudos complementam a caracterização do estado excitado singlete do fotossensibilizador associado ao complexo de rutênio.

Dentre os métodos disponíveis para se medir os decaimentos de fluorescência, um dos mais usados é o método de contagem simples de fótons. Neste método, a amostra é excitada por um flash de luz e, em seguida, um sistema de detecção mede o tempo entre este pulso e a chegada do primeiro fóton à fotomultiplicadora (Phillips e O'Connor, 1984).

O tempo de vida do estado excitado é derivado das curvas de decaimento que mostram os decaimentos de fluorescência ajustados, bem como os desvios e resíduos médios. Nas curvas de decaimento de fluorescência, a intensidade de luz decresce com o tempo após a remoção da luz de excitação. Para a ZnPC associada ao complexo de rutênio em meio lipossomal foi obtida a curva de decaimento apresentadas na figura 17.

O comprimento de onda de excitação utilizado para a ZnPC nos meios estudados foi de 633 nm, enquanto a emissão de fluorescência foi monitorada a 680 nm. Para cada medida de decaimento foram coletadas em média 10.000 contagens.

O tempo de vida do estado excitado é derivado das curvas de decaimento que mostram os decaimentos de fluorescência ajustados, bem como os desvios e resíduos médios. Nas curvas de decaimento de fluorescência, a intensidade de luz decresce com o tempo após a remoção da luz de excitação. A curva de decaimento obtida está apresentada na Figura 17.



**Figura 17:** Curva de decaimento e ajuste exponencial para o fotossensibilizador ZnPC (5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup>) associado ao complexo Ru-tpy (50,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup>) em lipossoma. O Inserto abaixo da figura representa o resíduo médio.

Os tempos de vida dos decaimentos estão sumarizados na Tabela III.

	Sistemas	$\tau_1$ (ns)	A <sub>1</sub>	$\tau_2(ns)$	$\mathbf{A}_{2}$
Ru-tpy.					
otossensibi	lizador ZnPC em meio	o homogêneo, mei	o lipossoi	mal e associado	ao complexe

f F

**Tabela III** - Tempos de vida de fluorescência ( $\tau_s$ ), Amplitude relativa (A) para o

Sistemas	$\tau_1$ (ns)	$\mathbf{A}_1$	$\tau_2$ (ns)	$A_2$	
ZnPC em etanol <sup>a</sup>	$4,\!00\pm0,\!02$	100	-	-	
ZnPC em lipossoma <sup>a</sup>	$3,09 \pm 0,06$	47,2	$0,94 \pm 0,03$	52,8	
ZnPC/ Ru-tpy	$3,19 \pm 0,04$	72,0	$0,\!91\pm0,\!02$	28,0	

a: (Oliveira et al., 2006)

Quando incorporado ao lipossoma, o decaimento cinético de fluorescência da ZnPC apresenta uma cinética biexponencial. O decaimento biexponencial observado está relacionado com a heterogeneidade do sistema lipossomal. Assim, os dois tempos de vida encontrados para a ZnPC em meio lipossomal, são atribuídas as moléculas de ZnPC localizadas em diferentes ambientes químicos, de acordo com Oliveira, 2006 (Oliveira et al., 2006). Resultados similares têm sido relatados para muitos outros fotossensibilizadores, tais como os derivados de fenotiazinas em diferentes meios microheterogêneos (Balasubramaniam e Natarajan, 1997; Viswanathan e Natarajan, 1996). A presença do complexo Ru-tpy não provocou alteração significativa no tempo de vida para a ZnPC em meio lipossomal, apresentou também um segundo tempo de vida, permanecendo a cinética de decaimento do tipo biexponencial. Houve mudança na população relativa de cada estado excitado, o que está de acordo com o esperado considerando uma redistribuição do fotossensibilizador com a adição de mais uma espécie.

Pode-se assim concluir que os decaimentos obtidos para a ZnPC dependem do meio em que a mesma se encontra. Isto é confirmado pela diferença entre os tempos de vida obtidos para o meio homogêneo (etanol).

Na seqüência dos estudos de caracterização dos estados excitados está o estudo do comportamento do estado excitado triplete.

# IV.1.7 Estudos dos estados tripletes por fotólise por pulso de laser

A ação fotodinâmica dos fotossensibilizadores (FS) nos sistemas biológicos envolve, principalmente o primeiro estado excitado triplete (T<sub>1</sub>) do FS, que é formado pelo cruzamento intersistema do estado excitado singlete de vida curta, inicialmente produzido pela absorção da energia radiante. A fotossensibilização celular ocorre devido a reação desta espécie excitada (T<sub>1</sub><sup>\*</sup>) com o oxigênio molecular, usualmente presente no meio, gerando oxigênio singlete (Spikes, 1986).

Entretanto, cabe ressaltar que a fototoxicidade das ftalocianinas não se limita apenas à produção de oxigênio singlete ( $^{1}O_{2}$ ) como espécies reativas de oxigênio. A absorção de elétrons fotoinduzida por biomoléculas apropriadas levam a reações de transferência de elétrons, ou abstração de hidrogênio de moléculas biológicas que resultam na produção de radicais livres que podem atuar, simultaneamente com a produção de oxigênio singlete (processo do Tipo II) (Viola et al., 1998)e também com a produção de outras espécies reativas de oxigênio (EROs , processos do Tipo I). Isto faz deste fotossensibilizador especial atuando na produção de mais de um tipo de espécies excitadas.

Segundo Rotta et al 2003 (Rotta, Lunardi e Tedesco, 2003),após a irradiação, a ZnPC está no seu estado triplete e pelo processo de transferência de elétrons pode formar o ânion radical  $ZnPC^{-}$  que pode sua vez doa seu elétron para o dióxido de hidrogênio produzindo ânion radical superóxido ( $O_2^{-}$ ). A fotossensibilização também pode gerar a formação radical hidroxila (OH) pela redução do peróxido de hidrogênio (Equações 10-14).

$ZnPC + h\nu \rightarrow {}^{1}ZnPC \rightarrow {}^{3}ZnPC$	Equação (10)
$^{3}$ ZnPC + ZnPC $\rightarrow$ ZnPC <sup>•-</sup> + ZnPC <sup>•+</sup>	Equação (11)
$ZnPC^{\bullet-} + O_2 \rightarrow ZnPC^{\bullet+} + O_2^{\bullet-}$	Equação (12)
$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Equação (13)
$ZnPC^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow ZnPC + {}^{\bullet}OH + OH^{-}$	Equação (14)

Dentre as técnicas resolvidas no tempo baseadas no monitoramento direto da absorção ou emissão de um intermediário reacional de vida curta, a técnica de fotólise por pulso de laser é uma das mais utilizadas (Oliveira et al., 2006; Pelegrino et al., 2005; Simioni et al., 2008). Esta técnica é usada para gerar e estudar a reatividade dos mais diversos tipos de transientes, oriundos de estados eletronicamente excitados.

Nesta técnica uma grande população de moléculas do estado fundamental é promovida para os estados excitados singletes superiores por um pulso rápido de luz de alta intensidade. Após o disparo do laser, as moléculas que se encontram no estado excitado singlete sofrem cruzamento intersistema gerando o estado excitado triplete  $(T_1^*)$ .

A diferença básica entre os processos-envolvendo o estado excitado singlete e o estado excitado triplete - é que no estado excitado triplete, as moléculas apresentam uma vida média mais longa (da ordem de µs a ms), podendo interagir com outras espécies, ou retornar ao estado fundamental por emissão de luz, por um processo conhecido como fosforescência. Em solução homogênea, a probabilidade e a eficiência do processo de fotossensibilização dependem de vários parâmetros fotofísicos, tais como o rendimento quântico do estado excitado triplete e sua velocidade de decaimento, ou a transferência de energia para o oxigênio molecular solubilizado no meio.

O espectro de absorção do transiente gerado por fotólise por pulso de laser não fornece um valor absoluto para a absorbância; obtém-se na verdade, a diferença da absorção entre o precursor e o transiente formado. Assim, o espectro de absorção do transiente é dependente da concentração do precursor na região onde este absorve, e um valor negativo encontrado para a diferença de absorbância ( $\Delta DO$ ) corresponde a formação de um intermediário com uma absortividade menor que a do precursor, ou seja, o desaparecimento da absorção do espectro de partida no estado estacionário.

Os estados excitados para a ZnPC no sistema lipossomal e associada ao complexo Rutpy no sistema misto foram gerados e estudados por fotólise por pulso de laser como descrito na sessão III.4.8. Os experimentos foram realizados na concentração de 5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> para a ZnPC e 50,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> para o complexo.

Os tempos de vida dos estados excitados tripletes ( $\tau_T$ ) dos fármacos foram calculados através da análise cinética das curvas de decaimento dos transientes no máximo da absorção do estado excitado triplete (480 nm) usando-se um programa de ajuste do próprio aparelho como mostrado na figura 18.



**Figura 18:** Espectro de absorção do transiente obtido através do método de fotólise por pulso de laser da ZnPC (5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup>) associada ao complexo Ru-tpy (50,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup>) em meio lipossomal após excitação por pulso de laser em 355 nm, mostrando a absorção máxima do triplete centrada no comprimento de onda de 480 nm e o fotobranqueamento do estado fundamental centrado a aproximadamente 380 nm e 580 nm. A curva de decaimento dos transientes no máximo da absorção triplete em 480 está mostrada no inserto.

Os tempos de vida obtidos estão mostrados na Tabela IV

Sistemas	$\tau_t$ ( $\mu s$ )
ZnPC em lipossoma	0,83
ZnPC/Ru-tpy	0,27

**Tabela IV** - Tempos de vida dos estados excitados tripletes ( $\tau_t$ ), Amplitude relativa (A) para o fotossensibilizador ZnPC em meio lipossomal e associado ao complexo Ru-tpy .

Os resultados obtidos através dos experimentos de fotólise por pulso de laser sugerem que os sistemas analisados possuam diferentes tempos de vida. A diminuição no tempo de vida para o sistema misto pode ser explicada pelo processo de supressão do estado excitado singlete da ZnPC na presença do complexo Ru-tpy. Este resultado está de acordo com os resultados de emissão de fluorescência para o sistema misto previamente descrito.

Embora, o valor encontrado do tempo de vida triplete para a ZnPC associada ao complexo de rutênio no sistema lipossomal tenha sido menor, este tempo mostrou-se ser suficiente para que os estados tripletes excitados produzidos reajam com o oxigênio molecular presente no meio, produzindo oxigênio singlete ou outras espécies reativas de oxigênio (EROs) e apresentar ainda uma atividade fotodinâmica como será mostrada nos estudos *in vitro*.

### IV.1.8 Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ )

A determinação deste parâmetro espectroscópico é muito importante, pois quantifica a produção de uma das principais espécies reativas responsável pela destruição da célula tumoral, o oxigênio singlete, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Esta espécie em conjunto com outras espécies radicalares promovem uma série de processos foto-oxidativos em sítios endógenos, situados tanto no citoplasma celular quanto na estrutura da membrana fosfolipídica (lipídios, proteínas, etc), desencadeando uma cascata de eventos de resposta celular tornando-se essencial para os

estudos fotoquímicos e fotofísicos, envolvendo fotossensibilizadores ativos no processo fotodinâmico.

Assim, um grande número de investigações tem sido realizado em meio aquoso e microheterogêneo (Oliveira et al., 2006; Spiller, 1998). Para a determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ) produzido pela ZnPC em meio homogêneo, lipossomal e associada ao complexo Ru-tpy foi empregado o método fotofísico, que consiste na medida da intensidade de luminescência na região do infravermelho (1270 nm) da espécie gerada. O  $\Phi_{\Delta}$ determinado através da intensidade do sinal de luminescência do oxigênio singlete pode ser determinado pela Equação 2 (Spiller, 1998):

$$\Phi_{\Delta} = (I / I_{ref}) \cdot \Phi_{\Delta ref} \cdot (\tau_{\Delta ref} / \tau_{\Delta})$$
 (Equação 2)

onde, I é a intensidade do sinal de luminescência,  $\tau_{\Delta}$  é o tempo de vida do oxigênio singlete e o subscrito ref se refere à substância padrão.

Nos estudos de determinação da produção de oxigênio singlete, o composto utilizado como padrão foi o feoforbide-a, pois este apresenta um alto rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ = 0,59).

Os tempos de vida do oxigênio singlete foram medidos pela transferência de energia entre o estado excitado triplete do fotossensibilizador e o oxigênio molecular presente no meio. Em todos os casos, a intensidade máxima de fosforescência no tempo t = 0 foi determinada pela regressão exponencial e os tempos de vida de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> foram determinados pelo tratamento do ajuste da curva. Os valores dos rendimentos quânticos de produção do oxigênio singlete produzidos pelo feoforbide-a e pela ZnPC associada ou não ao complexo Ru-tpy estão apresentados na Tabela V.

Amostras	$\Phi_{\Delta}$
Feoforbide-a	0,59
ZnPC em etanol <sup>a</sup>	0,65
ZnPC em lipossoma <sup>a</sup>	0,23
ZnPC/Ru-tpy	0,16
$(01)^{-1} = (1 - 2000)^{-1}$	

Tabela V - Valores de rendimento quântico de produção do oxigênio singlete

a: (Oliveira et al., 2006)

De acordo com os dados na Tabela V, pode-se observar que o rendimento quântico de oxigênio singlete produzido pela ZnPC em etanol foi maior do que para a ZnPC incorporada aos lipossomas. Portanto, há uma diminuição do rendimento quântico de oxigênio singlete produzido pela ZnPC quando incorporada aos lipossomas, devido ao fato de que com a distribuição do fotossensibilizador no lipossoma, sua concentração local na bicamada lipídica pode aumentar e, por conseguinte as colisões das moléculas do fotossensibilizador entre si, levando a uma supressão das moléculas no estado excitado (Oliveira, D. M., 2006). Uma outra explicação é que uma vez gerado dentro do lipossoma, o oxigênio singlete pode rapidamente se difundir para outras regiões do sistema microheterogêneo e ser suprimido e gerar espécies secundárias (Roslaniec et al., 2000).

Quando comparamos com os dados na literatura, podemos observar que o resultado obtido pelo sistema lipossomal da ZnPC associada ao complexo Ru-tpy também apresentou uma diminuição no rendimento quântico de oxigênio singlete em relação ao rendimento quântico apresentada pela ZnPC em meio lipossomal. Este resultado é bastante coerente com os dados obtidos dos outros parâmetros fotofísicos como o  $\Phi_f$ ,  $\tau_s e \tau_{T1}$  em que o sistema misto (ZnPC/ Ru-tpy ) apresenta uma diminuição do valor quando o comparamos com os dados obtidos para a ZnPC lipossomal, sendo esperado portanto, que o valor de  $\Phi_{\Delta}$  fosse menor. No entanto, continua sendo suficiente para ativar os processos de oxidação útil para TFD.

85

## IV. 1.9 Estudos de detecção de NO gerado por fotólise de pulso a laser em 675 nm.

Os experimentos de fotólise por pulso de laser permitem a observação das mudanças dos espectros de absorção que ocorre após à absorção da luz do pulso laser, no intuito, de estudar a liberação de NO dentro do processo de excitação da ZnPC associada ao complexo Ru-tpy pelo sistema misto em 675 nm.

Cabe ressaltar que estes estudos foram realizados nas condições usuais utilizadas nos estudos *in vitro* ou *in vivo*, ou seja, excitou com um laser contínuo (CW) na região visível do espectro eletromagnético.

Concomitantemente, acompanhou-se a liberação *in situ* de NO gasoso pelo acoplamento do NOmeter na cubeta irradiada, como descrito na sessão III.4.10.

A variação espectral na região do UV-visível para o sistema durante a fotólise em 675 nm representadas nas figuras 19 e 20.

Pela Figura 19, podemos observar a diminuição da banda em 670 nm da Zinco ftalocianina, como já era esperado, em conseqüência do seu processo de fotooxidação.



**Figura 19:** Espectro de absorção da ZnPC 5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> incorporadas em lipossomas sob irradiação do laser em 675 nm, na faixa total de energia de 0 J a 60 J num intervalo de tempo de 0 s a 150 s.



**Figura 20:** Espectro de absorção da ZnPC 5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> e do complexo Ru-tpy (50,0  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>) incorporados em lipossomas sob irradiação do laser em 675 nm, na faixa total de energia de 0 J a 60 J num intervalo de tempo de 0 s a 150 s.

No lipossoma contendo o sistema misto (ZnPC/Ru-tpy) na Figura 20, observamos novamente a diminuição da banda em 670 nm da ZnPC e também a redução da banda TCML (360 nm) do tipo  $d_{\pi}(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(NO)$  do complexo Ru-tpy em conseqüência da saída de NO gasoso. Tais comportamentos espectroscópicos são justificáveis diante dos experimentos realizados por Rotta et. al (Rotta, Lunardi e Tedesco, 2003), onde irradiou no comprimento de onda de 355 nm o complexo de S-nitroso-*N*-acetilcisteína- Zinco ftalocianina (NacySNO-ZnPC) em lipossoma e observou mudanças das bandas de absorção na região do ultra-violeta em 300-350 nm e na região do visível em 500-600 nm, tendo comprovado a liberação de NO gasoso. E de Lima 2006 (de Lima, R. G., 2006) também irradiou o complexo de rutênio [Ru(NH.NHq)(tpy)NO]<sup>3+</sup> em 355 nm utilizado neste trabalho, e observou a redução da banda TCML (360 nm) do tipo  $d_{\pi}(Ru^{II}) \rightarrow \pi^*(NO)$  típica da liberação de NO pelo processo da fotólise. A Figura 21 demonstra o cronoamperograma obtido pelo NOmeter para o sistema misto ZnPC/Ru-tpy (5/50 μmolL<sup>-1</sup>) durante a fotólise em 675 nm, sendo cada pulso de 25s e 10J de potência.



**Figura 21:** Cronoamperograma para o lipossoma contendo a ZnPC e o complexo Ru-tpy sob irradiação do laser em 675 nm.

A concentração de NO gerado fotoquimicamente, a partir do lipossoma contendo a mistura ZnPC/Ru-tpy, foi calculada pelos picos máximos obtidos pelo cronoamperograma após a irradiação. A partir dos pontos coletados obtivemos a concentração média de NO liberado de 0,27 μmolL<sup>-1</sup>.

Assumindo que a irradiação em 675 nm promove o processo de fotobranqueamento na banda Q de transição  $\pi -\pi^*$  do fotossensibilizador, no lipossoma contendo apenas a ZnPC ocorreu uma diminuição de 85% desta banda num tempo total de 100 s de irradiação, de 10 J de energia com dose 3,18 J/cm<sup>2</sup>. Já no lipossoma contendo a ZnPC e o complexo Ru-tpy associados ocorre uma diminuição de 65% dessa banda. Os resultados demonstraram que a excitação do lipossoma contendo a ZnPC e o complexo de rutênio associados pode liberar NO e  ${}^{1}O_{2}$  usando luz visível, sendo este um sistema promissor para o uso na Terapia Fotodinâmica.

De acordo com os resultados fotofísicos e fotoquímicos, ressaltamos novamente o possível mecanismo de interação entre a ZnPC e o complexo Ru-tpy, envolvendo a transferência de elétron do estado singlete excitado da ZnPC (equação 16) para o complexo Ru-tpy, liberando NO (equação 17). Desta forma, como já foi estabelecido que pode ocorrer um processo de transferência de energia do estado excitado triplete da ZnPC para o oxigênio molecular do meio, acarretaria assim na produção de oxigênio singlete (equação 18).

Estes resultados demonstram, que a ZnPC possa atuar efetivamente como uma "antena" para o processo de transferência de elétron, necessário para que o complexo de rutênio libere o NO (de Lima, R. G., 2006). Mostrando-nos uma situação, onde o complexo nitrosilo de rutênio doador de NO, atue claramente como um pró-fármaco. Além disso, considerando que a ZnPC, um fotossensibilizador clássico, possa agir no sistema pelos mecanismos do tipo I e II para a produção de espécies reativas (Foote, 1991b), ocorre a potencialização da atividade fotodinâmica pelo mecanismo de sinergismo (liberação de NO e  ${}^{1}O_{2}$ ) como já descrito de outras moléculas fotossensibilizadoras (da Silva et al., 2007).

$$ZnPC + h\nu \rightarrow {}^{1}ZnPC$$
(16)  
$${}^{1}ZnPC + [Ru(NH.NHq)(tpy)NO]^{3+} \rightarrow {}^{0}ZnPC + [Ru(S)(NHNHq)(tpy)]^{2+} + NO^{0} (17)$$
  
$${}^{1}ZnPC (ISC) \rightarrow {}^{3}ZnPC + {}^{3}O_{2} \rightarrow {}^{0}ZnPC + {}^{1}O_{2}$$
(18)  
$$S = solvente ; ISC = cruzamento inter sistema$$

90

#### **III.2 Estudos in vitro**

# III.2.1 Determinação da Toxicidade da ZnPC, do complexo Ru-tpy e do sistema lipossomal misto na ausência de luz.

Os testes de viabilidade celular para a ZnPC em lipossoma, para o complexo Ru-tpy em lipossoma e para o sistema misto na ausência de estímulo luminoso, foram feitos para linhagens de células B-16 F10 para verificarmos a toxicidade dos sistemas utilizados.

O tempo de incubação utilizado na avaliação da toxicidade celular foi de 3 horas, pois é o tempo ideal considerando, que quando associarmos esse complexo ao fotossensibilizador ZnPC devemos nos orientar pelo tempo de incubação determinado pelo composto mais fotossensível sem causar morte celular no escuro. Neste caso nos orientamos pelo tempo de incubação já determinando para a ZnPC lipossomal (Oliveira, D. M., 2006). Os resultados foram analisados com base nos estudos de viabilidade celular pelo método do "MTT" (a descrição detalhada desta metodologia foi apresentada na seção experimental, item III.2.2.

Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade das células B16-F10 estão apresentados na figura 22, na forma de gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função dos sistemas utilizados.



**Figura 22:** Porcentagem de células B16-F10 vivas após 3 horas de incubação com as formulações lipossomais estudadas. 1= lipossoma vazio, 2 = Ru-tpy 0,5 mmolL<sup>-1</sup> em lipossoma, 3 = ZnPC 5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> em lipossoma e 4 = ZnPC /Ru-tpy (5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> /0,5 mmolL<sup>-1</sup>) no sistema lipossomal. Significância estatística das diferentes formulações foi determinada pelo teste de variância One-way ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls t-test para múltiplas comparações (\*p> 0,05; \*\*p< 0,05; \*\*\*p<0,01). Cada SEM representa o desvio padrão (± SD) para n = 3.

Os resultados mostraram um perfil de toxicidade apropriado para as amostras 1, 2 e 3, com a viabilidade celular igual ou acima de 90%. Entretanto, para a combinação sinérgica da ZnPC com 0,5 mmolL<sup>-1</sup> do complexo Ru-tpy mostrou uma toxicidade basal de cerca de 20%. Estes dados encontram-se sumarizados na Tabela VI. Tabela VI - Viabilidade celular após a incubação por 3 horas com as formulações

lipossomais estudadas

Lipossoma	Viabilidade Celular (%)
$ZnPC(5,0 \mu mol.L^{-1})$	93±1
Ru-tpy (0,5 mmol.L <sup>-1</sup> )	90±2
ZnPC (5,0 µmol.L <sup>-1</sup> )/ Ru-tpy	77±1
(0,5 mmol.L <sup>-</sup>	

Portanto, baseando-nos nestes resultados, a fim de minimizar este efeito de toxicidade do sistema misto (ZnPC/Ru-tpy) decidimos realizar os estudos de fototoxicidade utilizando uma concentração do complexo Ru-tpy 10 vezes menor, ou seja, 50,0 μmolL<sup>-1</sup>. Sendo que esta concentração foi a utilizada em toda caracterização fotofísica e fotoquímica do sistema sinérgico mostrada anteriormente.

IV.2.2 Estudo da fototoxicidade do sistema lipossomal da ZnPC e do sistema lipossomal misto

Analisamos a seguir, a fototoxicidade para a ZnPC (1  $\mu$ molL<sup>-1</sup>) em lipossoma, e para o sistema lipossomal misto, variando-se a concentração da ZnPC em 1,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> e 5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup> mantendo constante a concentração do complexo Ry-pty 50,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup>. Estes estudos foram realizados como descrito na sessão III.2.4 e na presença de luz com uma dose de 0,5 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 23:** Toxicidade no excuro (A) e fototoxicidade (B) para células B16-F10.  $1 = \text{ZnPC} \ 1 \ \mu\text{molL}^{-1}$  em lipossoma;  $2 = \text{ZnPC/Ru-tpy} \ (1 \ \mu\text{molL}^{-1} \ /50 \ \mu\text{molL}^{-1})$  no sistema lipossomal;  $3 = \text{ZnPC/Ru-tpy} \ (5 \ \mu\text{molL}^{-1} \ /50 \ \mu\text{molL}^{-1})$  no sistema lipossomal. Significância estatística das diferentes formulações foi determinada pelo teste de variância One-way ANOVA seguido do pós-teste Newman-Keuls t-test para múltiplas comparações (\*\*p< 0,05, \*\*\* p< 0,01), Cada SEM representa o desvio padrão (± SD) para n = 3.

Primeiramente na figura 23-A, pode-se observar nos estudos de toxicidade no escuro, utilizando os sistemas lipossomais da ZnPC e o sistema misto, apresentaram uma viabilidade celular acima de 90%, o que nos confirma que o sistema sinérgico (ZnPC/Ru-tpy) (5,0  $\mu$ molL<sup>-1</sup>) não apresentou toxicidade para linhagem neoplásica.

Na figura 23-B, pode-se observar que na presença de luz, o sistema lipossomal misto (ZnPC/Ru-tpy) (5,0 µmolL<sup>-1</sup> /50,0 µmolL<sup>-1</sup>) mostrou uma alta capacidade em induzir morte celular sob a irradiação de luz (quase 95%).

Este efeito apenas confirma nossa hipótese de que o possível mecanismo de interação da ZnPC com o complexo de rutênio leva a uma formulação, onde o efeito sinérgico das espécies produzidas, induz a morte celular.

Estes resultados indicam claramente que esta linha de raciocínio permite uma melhor ação da TFD, onde fármacos atuando sinergicamente produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERONs), induzem *in vitro* uma considerável morte celular após mínimas doses de luz pelo processo de fotossensibilização (Tedesco, Rotta e Lunardi, 2003).

# **V. CONCLUSÕES**

Dentro da proposta do trabalho, podemos destacar as seguintes conclusões:

Pela análise das características espectroscópicas da ZnPC e do complexo de rutênio Ru-tpy, pode-se observar que não houve mudança em seus perfis espectrais de absorção após serem incorporados nos lipossomas. Houve, porém, houve uma redução no perfil espectroscópico de emissão de fluorescência da ZnPC associada ao complexo de rutênio em lipossoma, resultantes de um processo de supressão do primeiro estado excitado singlete da ZnPC.

Os rendimentos quânticos de fluorescência ( $\Phi_F$ ) da ZnPC e de sua associação ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal foram determinados, utilizando-se o método relativo a um composto padrão (ZnPC em etanol,  $\Phi_F = 0,28$ ). Pela análise dos dados pode-se observar que houve a incorporação da ZnPC no lipossoma e sua associação ao complexo causaram uma diminuição no valor do  $\Phi_F$ .

Nos estudos dos estados excitados tripletes por fotólise, por pulso de laser, os resultados obtidos mostraram tempos de vida diferentes, quando os comparamos aos dados da literatura, estes tempos diferentes sugerem a formação de outras possíveis espécies reativas pela associação do fotossensibilizador ZnPC com o complexo Ru-tpy em lipossoma.

Nos estudos de fotólise em 675 nm somente com a Zinco ftalocianina (ZnPC) em meio lipossomal observou-se a diminuição de sua banda em 670 nm cerca de 85%, devido seu processo de fotooxidação após a irradiação do laser. Tal efeito, também foi observado no estudo da ZnPC associada ao complexo Ru-tpy em meio lipossomal, porém essa diminuição foi de 65%, ocorrendo também a diminuição da banda TCML do tipo  $d_{\pi}(Ru^{II}) \rightarrow \pi^{*}(NO)$  do complexo Ru-tpy. Este comportamento pode ser comprovado pela saída de NO gasoso registrado no NOmeter. Os estudos de citotoxicidade, utilizando-se as linhagens B-16 F10, mostraram que a incubação destas células com o sistema misto ZnPC/Ru-tpy na concentração de 5,0 µmolL<sup>-1</sup>/50,0 µmolL<sup>-1</sup>, foi a melhor combinação encontrada para estes fármacos uma vez que apresentaram uma viabilidade celular significativa . No entanto, sob ação da luz nestas mesmas condições, pode-se observar uma alta atividade fotodinâmica com uma diminuição bem significativa na viabilidade celular.

Portanto, a idéia de combinar dois compostos que trabalhem sinergicamente para a produção das espécies reativas, EROs e ERONs, pela combinação da Zinco ftalocianina e do complexo nitrosilo de rutênio, nos mostrou ser bem eficiente na destruição das células neoplásicas.

# VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARDYCE, C. S.; DYSON, P. J. Ruthenium in medicine: current clinical uses and futureprospects. **Platinum Metals Review.** v.45, p.62-69, 2001.

ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current Status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.5, p.161-69, 2001.

ALLEN, T. M.; HANSEN, C.; RUTLEDGE, J. Liposomes with prolonged circulation time: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.981, p.27-35, 1989.

ARBOGAST, J. W. et al. Photophysical Properties of C60. Journal of Physical Chemistry, v.95, p.11, 1991.

BALASUBRAMANIAM, E.; NATARAJAN, P. Photophysical properties of protoporphyrin IX and thionine covalently attached to macromolecules. **Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry**, v.103, p.201-11, 1997.

BARBUGLI P. A. Caracterização da atividade citotóxica de complexos de rutênio II
doadores de óxido nítrico em linhagens celulares neoplásicas. 96 f. Dissertação Mestrado,
FMRP-USP, 2007.

BONETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching of sensitizer used in photodynamic therapy. **Tetrahedron Letters**, v.57, p.9513-47, 2001.

BONNETT, R.; BERENBAUM, M. Porphyrins as photosensitizers. **Ciba Foundation Symposium**, v.146, p.40-53, 1989.

98

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic terapy in cancer treatment. Lancet Oncological, v.5, p.497-508, 2004.

CHEN, B.; POGUE, B. W.; HASAN, T. Lipossomal delivery of photossensitizing agents. **Expert Opinion Drug Delivery**, v.42, n.3, p.477-87, 2005.

CHIANG, T. M.; SAYRE, R. M.; DOWDY, J. C.; WILKIN, N. K.; ROSENBERG, E. W. Sunscreen ingredients inhibit inducible nitric oxide synthase (iNOS): a possible biochemical explanation for the sunscreen melanoma controversy. **Melanoma Research**, v.15, p.3-6, 2005.

CHUNG, H. T.; PAE, H. O.; CHOI, B. M.; BILLIAR, T. R.; KIM, Y. M. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282, p.1075-79, 2001.

CULLOTA, E.; KOSHLAND JUNIOR, D. E. NO news is good news. Science, v.258, p.1862-65, 1992.

DA SILVA, R. S.; MARCHESI, M. S. P.; KHIN, C.; LUNARDI, C. N.; BENDHACK, L. M.; FORD, P. C. Photoinduced electron transfer between the cationic complexes  $Ru(NH_3)_5pz^{2+}$ and trans-RuCl([15]aneN<sub>4</sub>)NO<sup>2+</sup> mediated by phosphate ion: Visible light generation of nitric oxide for biological targets. **Journal of Physical Chemistry B**, v.111, n.24, p.6962-68, 2007.

DARWENT, J. R.; DOUGLAS, P.; HARRIMAN, A.; PORTER, G.; RICHOUX, M. C. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hidrogen. **Coordination Chemistry Reviews**, v.44, p.83-126, 1982. DE LIMA R. G. Reatividade química e fotoquímica de complexos nitrosilos de rutênio do tipo [Ru(terpy)(L)NO]<sup>n+</sup>. 253 f. Tese Doutorado, FFCLRP-USP ,2006.

DE LIMA, R. G.; SAUAIA, M. G.; BONAVENTURA, D.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; BEDHACK, L. M.; DA SILVA, R. S. Controlled nitric oxide photo-release from nitro ruthenium complexes: The vasodilator response produced by UV light irradiation. **Inorganica Chimica Acta**, v.9, n.358, p.2643-50, 2005.

DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v.233-234, n.1, p.351-71, 2002.

DEMAS, J.; CROSBY, G. Measurement of photoluminescence Quantum Yeilds: A Review. **The journal of Physical Chemistry**, v.75, p.992-1024, 1971.

DEPAOLI, V. M.; DEPAOLI, S. H.; BORISSEVITCH, L. E. Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH<sub>2</sub> associated with micelles and DNA. Journal of Alloys and Compounds, v.344, n.1-2, p.27-31, 2002.

DOUGHERTY, T. J. Photoradiaton therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v.38, p.2628-35, 1978.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. **Critical Review in Oncology and Hematology**, v.2, p.83-116, 1984.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic Therapy. Advances in Experimental Medicine and Biology, v.193, p.313-28, 1985.

DOUGHERTY, T. J.; MACDONALD, I. J. Basic principle of photodynamic therapy. Journal of Porphyrin and Phthalocyanines, v.5, p.105-29, 2001.

EATON, F. D. Reference Material for Fluorescence Measurement. International Union of Pure and Applied Chemistry. v.60, n.7, p.1107-14, 1988a.

EATON, F.D. Reference Material for Fluorescence Measurement. International Union of Pure and Applied Chemistry. v.60, n.7, p.1107-14, 1988b.

FELDMAN, P. L.; GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. The surprising life of nitric oxide. **Chemical and Engineering News**, v.20, p.26-33, 1993.

FOOTE, C. S. Definition of type I and II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v.54, p.659, 1991a.

FOOTE, C.S. Definition of type I and II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v.54, p.659, 1991b.

FRESHNEY, R. I. Animal cell culture: a practical approache. 1ed. Oxford: IRL Press, 1986.

GARETH, E. J. Human Cell Culture Protocols. 1.ed. London: Humana Press, 1996.

GORMAN, A.; KILLORAN, J.; O'SHEA, C.; KENNA, T.; GALLAGHER, W. M.; O'SHEA, D. F. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. **Journal of the American Chemical Society**, v.126, n.34, p.10619-31, 2004.

HOEBEKE, M. The importance of lipossomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanismis. **Jounal of Photochemistry and Phtobiology B: Biology**, v.28, p.189-96, 1995.

IGNARRO, L. Nitric Oxide: Biology and Photobiology. 1.ed. San Diego: Academic Press, 2000.

KOCHEVAR, I. E.; LAMBERT, C. R.; LYNCH, M. C. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals . **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.1280, n.2, p.223-30, 1996.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. Journal of Photochemistry and Photobiology
B: Biology, v.66, p.89-106, 2002.

KÜBLER, A. C. Photodynamic Therapy. Medical Laser Application, v.20, p.37-45, 2005.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2ed. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, 1999.

LEHRER, S. Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. **Biochemistry**, v.10, p.3254-63, 1971.

LIPSON, R. L.; BALDES, E. J. The Photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivate. **Archives Dermatologie**, v.82, p.508-16, 1960.

LOVCINSKY, M.; BORECKY, J.; KUBAT, P.; JESEK, P. Meso-tetraphenylporphyrin in liposomes as a suitable photosensitizer for photodynamic theraphy of tumors. **General Physiology and Biophysics**, v.18, p.107-18, 1999.

LUNARDI, C. N.; ROTTA, J. C. G.; TEDESCO, A. C. Synthesis, Photophysical and Photobiological study of synergic photosensitizer: zinc-phthalocyanine with Ca<sup>2+</sup> chelating agent. **Current Organic Chemistry**, v.11, n.7, p.647-54, 2007.

LUNARDI, C. N.; ROTTA, J. C. G.; TEDESCO, A. C. Zinc tetranitrophthalocyanine: isomer separation and photophysical photobiological evaluation in J774A tumor cells. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.7, n.7, p.493-99, 2003.

LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Synergic photosensitizers: A new trend in photodynamic therapy. **Current Organic Chemistry**, v.9, n.8, p.813-21, 2005.

MA, C. et al. Synthesis and electrochemistry of a substituted phthalocyaninatozinc. **Dyes and Pigments**, v.72, n.2, p.267-70, 2007.

MACAROFF, P. P.; OLIVEIRA, D. M.; RIBEIRO, K. F.; LACAVA, Z. G. M.; LIMA, E. C. O.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Studies of cell toxicity of complexes of magnetic fluids and biological macromolecules. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.293, p.293-97, 2005.

MILLER, L. J.; MARX, J. Apoptosis. Science, v.281, p.1301, 1998.

MIRONOV, A. F. et al. New photosensitizers of bacteriochlorin series for photodynamic cancer therapy. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.29, n.2, p.190-97, 2003.

MORI, V.; BERTOTTI, M. Nitric oxide solutions: standartdisation by chronoamperometry using a platinum disc microelectrode. **Analyst**, v.125, p.1629-32, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

NIZIOLEK, M.; KORYTOWSKI, W.; GIROTTI, A. W. Nitric oxide inhibition of free radical-mediated lipid peroxidation in photodynamically treated membranes and cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.34, n.8, p.997-1005, 2003.

NUNES S. M. Estudos Fotoquímicos e Fotofísicos das Interações entre Ftalocianinas e Lipossomos. 144f. Dissertação Mestrado, FFCLRP-USP,1999.

NUNES S. M. T. Uso Potencial de LDE e Microesferas de Albumina como sistemas liberadores de ftalocianinas e clorinas ativas na Terapia Fotodinâmica de neoplasias. 196f. Tese Doutorado, FFCLRP-USP, 2003.

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.2, p.273-84, 2004.

NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.73, n.1-2, p.1-28, 2004.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v.1, p.1-21, 2002.

OLIVEIRA D. M. Estudos sinérgicos de fármacos fotossensibilizadores utilizados na Terapia Fotodinâmica e fluidos magnéticos utilizados em Hipertermia celular. 162 f. Tese Doutorado, FFCLRP-USP, Ribeirão Preto, 2006.

OLIVEIRA, D. M.; LACAVA, L. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A.C. Zinc phtalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructure system for cancer treatment. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v.6, p.1-7, 2006.

OLIVEIRA, D. M.; MACAROFF, P.P.; RIBEIRO, K.F.; LACAVA, Z.G.M.; AZEVEDO, R B; LIMA,E C D; MORAIS,P C; TEDESCO,A C. Studies of Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex as a bifunctional agent for cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.289, n.p.476-9, 2005.

OLIVEIRA, F. D.S.; FERREIRA, K.Q.;BONAVENTURA, D.; BENDHACK, L.M.; TEDESCO, A.C.; MACHADO, S.D.; TFOUNI, E.; DA SILVA, R.S. The macrocyclic effect and vasodilation response based on the photoinduced nitric oxide release from trans-[RuCl(tetraazamacrocycle)NO]<sup>2+</sup>. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.101, n.2, p.313-20, 2007.

OLIVEIRA, F. D. S.; TOGNIOLO, V.; PUPO, T. T.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, R. S. Nitrosyl ruthenium complex as nitric oxide delivery agent: synthesis, characterization and photochemical properties. **Inorganic Chemistry Communications**, v.7, p.160-64, 2004.

OWENS, J. W.; SMITH, R.; ROBINSON, R.; ROBINS, M. Photophysicals properties of porphyrins, phtalocyanines, and benzochlorins. **Inorganic Chimica Acta**, v.279, p.226-31, 1998.

PANDEY, R. Long wavelength photosensitizers to chlorins and bacteriochlorin class with amphiphilic properties. Journal Chemicaal Society Perkin Transactions, p.1377-85, 1992.

PELEGRINO, A. C.; CAROLINA, M. M.; GOTARDO, A. F.; SIMIONI, A. R.; ASSIS, M. D.; TEDESCO, A. C. Photophysical properties of crowned porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v.81, n.4, p.771-76, 2005.

PHILLIPS, D.; O'CONNOR, D. V. **Time Correlated Single Photon Counting**. London: Academic Press, 1984.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical Studies and In Vitro Skin Permeation/Retention of Foscan/Nanoemulsion (NE) Applicable to PDT Skin Cancer Treatment. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v.8, p.340-47, 2008.

PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. A. M.; SIMIONI, A. R.; BENTLEY, M. V. L. B.;
MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsions loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in cancer treatment. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v.320, p.211-14, 2008.

RENNO, R. Z.; MILLER, J. W. Photosensitizers delivery for photodynamic therapy of choroidal neovascularization. Advanced Drug Delivery Review, v.52, p.63-78, 2001.

RICHTER-ADDO, G. B.; LEGZDINS, P. Metal nitrosyls. Nova Iorque: Oxford University Press, 1992 ROSLANIEC, M.; WEITMAN, H.; FREEMAN, D.; MAXU, Y.; EHRENBERG, B. Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of hypericin, tetrahydroxy helianthrone and their derivates: studies in organic solutions and in liposomes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.57, p.149-58, 2000.

ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Nitric oxide release from the Snitrosothiol zinc phthalocyanine complex by flash photolysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.5, p.587-94, 2003.

SAUAIA, M. G.; DE LIMA, R. G.; TEDESCO, A. C.; DA SILVA, R. S. Nitric oxide production from visible light irradiation on aqueous solution of nitrosyl ruthenium complexes. **Inorganic Chemistry**, 2005a.

SAUAIA, M. G.; OLIVEIRA, F. D. S.; DE LIMA, R. G.; CACCIARI, A. D. L.; TFOUNI, E.; DA SILVA, R. S. Syntheses, characterization and photochemical properties of new NO center dot-ruthenium(II) complexes. **Inorganic Chemistry Communications**, v.4, n.8, p.347-49, 2005b.

SERSA, G.; MIKLAVCIC, D.; CEMAZAR, M.; RUDOLF, Z.; PUCIHAR, G.; SNOJ, M. Eletrochemotherapy in treatment of tumors. **Ejso** , v.34, n.2, p.232-40, 2008.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Role of activated oxigen species in photodynamic therapy. **Methods in Enzimology**, v.319, p.376-400, 2000.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, v.4, p.507-17, 1999.

SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysical and photochemical studies of zinc(II) phtalocyanine in long time crculation micelles for Photodynamic Therapy use. **European Journal of Phamaceutical Sciences**, v.23, p.131-8, 2004.

SIMIONI, A. R.; PELISSON, M. M.; BELTRANE, M.; TEDESCO, A. C. Photophysical and Photobiological Studies of a Silicon Tribenzonaphthoporphyrazinato Incorporated into Liposomes for Photodynamic Therapy Use. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v.8, p.3208-15, 2008.

SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. A. M.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P.
C.; TEDESCO, A. C. Preparation, Characterization and in vitro Tocicity Test of Magnetic
Nanoparticle-Based Drug Delivery System to Hyperthermia of Biological Tissues. IEEE
Transactions on Magnetics, v.43, p.2459-61, 2007.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: AspectosFarmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos.Química Nova, v.25, n.5, p.801-07, 2002.

SOUZA, C. S.; FELÍCIO, L. B.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Topical photodynamic therapy for Bowen's disease of the digit n epidermolysis bullosa. **British Journal of Dermatology**, v.153, n.3, p.672-74, 2005.

SPIKES, J. D. Phtalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v.43, p.691-99, 1986.

SPIKES, J. D.; BOMMER, J. C. Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for Photodynamic therapy of tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology**, n.2, p.135-43, 1993.

108
SPILLER, W. Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.2, p.145-48, 1998.

TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Current Organic Chemistry**, v.7, p.187-96, 2003.

TURCHIELLO, R. F.; VENA, F. C. B.; MAILLARD, PH.; SOUZA, C. S.; BENTLEY, M.
V. L. B.; TEDESCO, A. C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and *m*-THPC in photodynamic therapy (PDT). Journal of
Photochemistry and Photobiology B:Biology, v.70, n.1, p.1-6, 2003.

TURRO, N. J. Modern molecular photochemistry. 1ed. Menlo Park, California: The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc. 1978.

VAN NOSTRUM, C. F. Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. **Advances in Drug Delivery for Cancer Therapy**, v.56, p.9-16, 2004.

VIOLA, A.; JEUNET, A.; DECREAU, R.; CHANON, M.; JULLIARD, M. ESR studies of a series of phtalocyanines. Mechanism of phototoxicity comparative quantitation of O<sub>2</sub> - using ESR - spin trapping and cytochrome c reduction techniques. **Free Radical Research**, v.28, p.517-32, 1998.

VISTICA, D. T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: Acritical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research**, v.51, p.2515-20, 1991. VISWANATHAN, K.; NATARAJAN, P. Photophysical properties of thionine and phenosafranine dyes covalently bound to macromolecules. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.95, p.245, 1996.

WELLER, R. Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.28, p.511-14, 2003.

WINK, A. A.; DARBYSHIRE, J. F.; NIMS, R. W.; SAAVEDRA, J. E.; FORD, P. C. Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. **Chemical Research Toxicology**, v.6, p.23-27, 1993.

WOODLE, M. C.; LASIC, D. D. Stecally stabilized lipossomes. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.1113, p.171-99, 1992.

WORKS, C. F.; JOCHER, C. J.; BART, G. D.; BU, X. H.; FORD, P. C. Synthesis characterization, and photophysical studies of some ruthenium salen nitrosyl compounds: Potential NO delivery agents and mechanistis insights in catalytic behavior. **Inorganic Chemistry**, v.14, n.41, p.3728-39, 2002.

YAMAMOTO, M.; NAGANO, T.; OKURA, I. Production of singlet oxygen on irradiation of a photodynamic therapy agent, zinc-coproporphyrin III, with low host toxicity. **Biometals**, v.16, n.4, p.591-97, 2003.