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

**Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de porfirinas e ftalocianinas
derivadas de éter de coroa**

Alessandra Caramori Pelegrino

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2007

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

**Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de porfirinas e ftalocianinas
derivadas de éter de coroa**

Alessandra Caramori Pelegrino

Orientada

Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor
em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto/USP

Pelegrino, Alessandra Caramori

Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de
porfirinas e ftalocianinas derivadas de éter de coroa.

179 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de
concentração: Química.

Orientador: Tedesco, Antônio Cláudio.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Porfirina. 3. Ftalocianina. 4.
Éter de coroa.

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

Folha de Aprovação

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Alessandra Caramori Pelegrino, apresentada ao Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, __/__/__.

Comissão Julgadora:

(Nome/Instituição)

(Nome/Instituição)

(Nome/Instituição)

(Nome/Instituição)

(Nome/Instituição)

*Agradeço a Deus por tudo que alcancei, e por Ele sempre
ter me abençoado,
ao meu Santo Expedito pelas realizações julgadas
impossíveis e também
aos ensinamentos de Dalai Lama, que me tornaram muito
mais feliz.*

Agradecimentos Especiais

Ao meu marido, amigo e amor

Denilson

Que nesses 19 anos de união sempre esteve me incentivando, acreditando e sonhando comigo.

Que me mostrou que a felicidade é uma trajetória e cada dia tem que ser especial.

À minha filha

Carolina

Que sempre me ensinou a ser mais tolerante, a acreditar em pessoas e na vida.

À minha filha

Júlia

Que enche nosso lar de alegria, amor e também de teimosia.

Ao *Pub (in memorian)*, menino da casa que amou muito a família.

A *Sophie, Fofinha e Snowbela* pelo carinho.

Às minhas irmãs *Arteti e Elina*, que sempre estão ao meu lado; e aos meus cunhados *Léo e Serginho*, que cuidam delas.

À minha mãe *Alice* e meu pai *Máximo* pelo carinho.

À minha sogra *Dila*, que é uma segunda mãe, e ao meu sogro *Otávio*, que sempre está ao nosso lado.

Aos cunhados *Daniel e Wanderson* pela amizade e carinho.

E finalmente à toda família que amo muito.

Gostaria principalmente de agradecer nesta oportunidade a todos aqueles que com sua colaboração tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco, pela orientação, incentivo, paciência e amizade durante este trabalho de doutorado.

À Fapesp, pelo apoio financeiro.

À Professora Dra. Marilda das Dores Assis, pelas valiosas contribuições e amizade; e ao seu grupo de pesquisa pela síntese dos fármacos fotossensibilizadores, em especial a Maria Carolina.

Às minhas colegas de trabalho Patrícia e Daniela, que se tornaram amigas inesquecíveis, e que me mostraram que a mais pura amizade pode existir mesmo no ambiente de trabalho.

A Olímpia, Daniela Manfrim, Fernando, Andreza, Vânia, Cristina, Mariana, Jacques, Renata, Kátia, Ângelo, Gilson, Yara e Abílio, que no decorrer desse trabalho fizeram inúmeras e valiosas contribuições.

A todos com quem convivi no laboratório, alunos de Iniciação Científica, Mestrado, Doutorado e Pós-Doc, que de uma forma ou de outra contribuíram em minhas escolhas.

Aos professores D^r. Pietro Ciancaglini, D^{ra}. Rosa do Prazeres M. F. Inocentes, D^{ra}. Maria Vitória Lopes Badra.Bentley e D^{ra}. Maria Elisabete Darbello Zaniquelli, que cederam não só equipamentos, mas também atenção em seus laboratórios. Aos alunos dos correspondentes grupos de pesquisas.

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

Ao Prof Dr. Milton Beltrame Júnior, do Grupo de Síntese Orgânica da Universidade do Vale do Paraíba, pelas tentativas de preparação da ftalocianina ligada ao éter de coroa.

Aos meus amigos do Circo, em especial ao Dola, Claudinho, Felipe e João, que me ajudaram a superar meus limites e me ensinaram que estes não existem, a não ser na nossa cabeça. A inesquecível frase: “Eu ainda não consigo, mas vou conseguir” ouvida tantas vezes.

Aos amigos Mamutes pela enorme amizade, pelas inesquecíveis reuniões lúdicas e por mostrar que existe mais alguém preocupado em ser feliz.

Finalmente, a todos meus amigos, e pensando bem, aos que não foram tão amigos também, pois cada qual à sua maneira, contribuíram na realização deste trabalho.

Sumário

I.Introdução	1
I.1. Terapia Fotodinâmica.	7
I.2. A atuação da Terapia Fotodinâmica no tratamento de células tumorais.	10
I.3. Mecanismos de ação fotoquímicos e fotofísicos	12
I.4. Os fármacos fotossensibilizadores já utilizados na Terapia Fotodinâmica..	16
I.5. Ftalocianinas como fármacos fotossensibilizadores em estudo na Terapia Fotodinâmica.....	19
I.6. Éteres de coroa.....	24
I.7. Porphirinas ligadas a éteres de coroa.	26
I.8. Uso da sonda fluorescente para monitorar a diferença de potencial de membrana.....	29
I.9. Sistemas de liberação de fármacos.	32
II.Objetivos	34
III.Parte Experimental	36
III.1.Materiais	36
III.2. Preparações	38
III.3. Aparelhagem	40
III.4. Métodos.....	44
III.4.1 Estudos espectroscópicos.....	44
III.4.1.1 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ZnC_4P , H_2C_4P , TPP e da $ZnPc$ em meio orgânico.....	44
III.4.1.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da ZnC_4P e da H_2C_4P em etanol.	44
III.4.1.3 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ZnC_4P e para H_2C_4P em meio orgânico.	46
III.4.1.4 Estudos dos estados tripletes por fotólise por pulso de laser.....	47
III.4.1.5 Estudos para a determinação do rendimento quântico de produção do oxigênio singlete (Φ_Δ) da ZnC_4P e da H_2C_4P em meio orgânico.	48
III.4.1.6 Determinação do Rendimento Quântico de Formação do Estado Triplete dos fármacos fotossensibilizadores H_2C_4P , ZnC_4P	50
III.4.1.7 Preparação da ZnC_4P , da H_2C_4P e da $ZnPc$ concomitante ao éter de coroa em meio lipossomal.	52
III.4.1.8 Estudos do tamanho de partícula e Potencial Zeta da ZnC_4P , H_2C_4P e $ZnPc$ e 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 em meio lipossomal.....	54
III.4.2 Estudos envolvendo células neoplásicas.....	59
III.4.2.1.a Crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas J774-A.1	59
III.4.2.1.b Congelamento das células J774-A.1	60
III.4.2.1.c Diagrama de crescimento da cultura celular	60
III.4.2.1.d Controle da integridade da membrana celular.	61
III.4.2.2 Definição de parâmetros para os estudos de fototoxicidade.....	63

III.4.2.2.1 Toxicidade dos fármacos ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio homogêneo e micro heterogêneo na linhagem de células J774-A.1 em meio fisiológico Hank's.	63
III.4.2.2.1.a Avaliação do tempo de incubação para o fármaco fotossensibilizador ZnC_4P em meio lipossomal e na presença de tampão Hank's, (estudo preliminar).	64
III.4.2.2.2 Viabilidade celular dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ nos diferentes meios fisiológicos.	65
III.4.2.2.3 Efeito do SBF na incorporação dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, ZnC_4P e TPP em células neoplásicas J774-A.1.	66
III.4.2.2.4 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, ZnC_4P e TPP por espectrofluorimetria.	67
III.4.2.2.5 Cinética de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e TPP no meio de cultura ideal (DMEM com 10% de serum).	68
III.4.2.3 Estudos Fotobiológicos.	68
III.4.2.3.1 Avaliação da fototoxicidade dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, ZnC_4P e TPP em células neoplásicas da linhagem J774-A.1.	68
III.4.2.3.2 Avaliação da fototoxicidade dos fármacos fotossensibilizadores em meio lipossomal.	70
III.4.2.4. Estudos da influência do éter de coroa na membrana plasmática.	71
III.4.2.4.1 Estudos com a sonda fluorescente bis(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C2, durante processo de hiperpolarização.	71
III.4.2.4.2.a Calibração da sonda de resposta lenta bis(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C ₂ .	75
IV.Resultados e Discussões:	77
IV.1. Estudos espectroscópicos.	78
IV.1.1. Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ZnC_4P e da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico.	78
IV.1.2. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da ZnC_4P e da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em etanol.	85
IV.1.3 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ZnC_4P e para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico.	88
IV.1.4. Estudos dos estados tripletes por fotólise por pulso de laser.	90
IV.1.5 Estudos para a determinação do rendimento quântico de produção do oxigênio singlete (Φ_Δ) dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico.	95
IV.1.6. Determinação do Rendimento Quântico de Formação do Estado Triplete dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$.	97
IV.1.7a Preparação da ZnC_4P e da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio lipossomal.	99
IV.1.7.b Preparação da ZnPc e o éter de coroa em meio lipossomal.	102
IV.1.8 Estudos do potencial zeta e tamanho de partículas da Zinco Ftalocianina (ZnPc) na ausência e na presença do éter de coroa 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6.	106

IV.2 Estudos envolvendo linhagem de células J774-A.1.	112
IV.2.1 Diagrama de crescimento da cultura celular.....	112
IV.2.2 Definição de parâmetros para os estudos de fototoxicidade.	116
IV.2.2.1 Toxicidade dos fármacos ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio homogêneo e micro heterogêneo sobre a linhagem de células J774-A.1 em meio Hank's	117
IV.2.2.2 Viabilidade celular dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ nos diferentes meios fisiológicos.	119
IV.2.2.3 Efeito do SBF na incorporação dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, ZnC_4P e TPP em células neoplásicas J774-A.1.	120
IV.2.2.4 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e TPP por espectrofluorometria.	129
IV.2.2.5 Cinética de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, ZnC_4P e TPP no meio de cultura (DMEM com 10% de SBF).	132
IV.2.3 Estudos fotobiológicos.....	135
IV.2.3.1 Avaliação da fototoxicidade dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, ZnC_4P e TPP em células neoplásicas da linhagem J774-A.1.	135
IV.2.3.2 Avaliação da fototoxicidade dos fármacos fotossensibilizadores em meio lipossomal.	138
IV.2.4. Estudo da influência do éter de coroa na membrana plasmática.....	144
IV.2.4.1 Estudos com a sonda fluorescente bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA- C_2 , durante processo de hiperpolarização da membrana plasmática das células J774-A.1.	148
IV.2.4.2 Estudos com a sonda fluorescente bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA- C_2 , durante processo de despolarização da membrana plasmática das células J774-A.1.	154
V.Conclusões:	159
VI.Referências Bibliográficas	164

Índice de Figuras

Figura 1. Representação das etapas de como as células defeituosas dão origem a metástase (Extraído do site da Sociedade Brasileira de Oncologia – www.inca.gov.br).....	2
Figura 2. Figura representando onde os agentes iniciadores agem (Extraído do site da Sociedade Brasileira de Oncologia – www.inca.gov.br).....	3
Figura 3. Figura representativa da transformação das células iniciadas em malignas. (Extraído do site da Sociedade Brasileira de Oncologia – www.inca.gov.br).....	4
Figura 4. Diagrama esquemático representando como as células defeituosas dão origem aos tumores (Extraído do site da Sociedade Brasileira de Oncologia – www.inca.gov.br).	4
Figura 5. Digrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização	13
Figura 6. Estrutura de fotossensibilizadores aprovados para aplicação clínica. (A) Visudyne®, (B) Foscan®, (C) Levulan® e (D) Metvix®.	18
Figura 7. Estrutura química das metalo ftalocianinas.	21
Figura 8. Estrutura de éteres de coroa.....	26
Figura 9. Figura esquemática da formação de um canal na bicamada.	28
Figura10. Estrutura da Zn(II)5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)- 2,3, 5,6-(tetrafluoro)fenil]-porfirinato (ZnC ₄ P).....	35
Figura 11. Figura esquemática da preparação dos lipossomas.	53
Figura 12. Espectro de absorção normalizado da H ₂ C ₄ P (6 µM em etanol ----) e ZnC ₄ P (6 µM em etanol —). O inserto apresenta a expansão da região espectral que representa as bandas Q (500 a 800 nm) para uma solução 15 µM em etanol de ambos os compostos	79
Figura 13. Espectro de absorção das bandas Q para a porfirina H ₂ C ₄ P em etanol (—), e espectro de emissão para a porfirina H ₂ C ₄ P em etanol (-----). Excitação fixa em 424 nm.....	81
Figura 14. Espectro de absorção das bandas Q para a porfirina ZnC ₄ P em etanol (—), e espectro de emissão para a porfirina ZnC ₄ P em etanol (-----). Excitação fixa em 422 nm.....	83
Figura 15. Espectro de absorção da TFPP (6 µM em etanol —). O inserto apresenta a expansão da região espectral que representa as bandas Q (500 a 800 nm).....	85
Figura 16. Espectro de absorção normalizado para H ₂ C ₄ P (6 µM em meio lipossomal ----) e ZnC ₄ P (6 µM em meio lipossomal —)	101
Figura 17. Figura demonstrativa da formação de canais de íons.....	102
Figura 18. Espectro de absorção normalizado da ZnPC (5,0µM) em etanol.	103

Figura 19: Espectro de absorção normalizado da ZnPC (5,0 μ M) em meio lipossomal na ausência (—) e na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 (16 μ M) (—).	104
Figura 20 Espectro de emissão de fluorescência normalizado da ZnPC (5,0 μ M) em etanol. (λ_{exc} = 610 nm)	105
Figura 21. Espectro de emissão de fluorescência normalizado da ZnPC (5,0 μ M) incorporada aos fosfolipídios na ausência (—) e na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 (16 μ M) (—). (λ_{exc} = 610 nm)	106
Figura 22. Curva de crescimento da linhagem J774-A.1 até 67 horas.....	115
Figura 23. Variação da intensidade de fluorescência para a ZnC ₄ P em DMEN com diferentes porcentagem de SBF, com λ de excitação fixa em 428 nm. (curva ■ para 0% de SBF, curva ■ para 3% de SBF e curva ■ para 10% de SBF).	122
Figura 24. Variação da intensidade de fluorescência para a H ₂ C ₄ P em DMEN com diferentes porcentagens de SBF, com λ de excitação fixa em 424 nm (curva ■ para 0% de SBF, curva ■ para 3% de SBF e curva ■ para 10% de SBF).	122
Figura 25. Variação da intensidade de fluorescência para a TPP em DMEM com diferentes porcentagens de SBF com λ de excitação fixa em 418 nm, (curva ■ para 0% de SBF e curva ■ para 10% de SBF).	124
Figura 26. Variação da intensidade de fluorescência para a ZnC ₄ P em diferentes porcentagens do SBF no meio de cultura celular, onde o SBF variou de 0, 3 e 10%, com λ de excitação fixa em 428 nm.	126
Figura 27. Variação da intensidade de fluorescência da H ₂ C ₄ P em meio lipossomal em diferentes porcentagens de SBF no meio de cultura celular, onde o SBF variou de 0, 3% e 10%, com λ de excitação fixa em 424 nm.....	126
Figura 28. Variação da Intensidade de Fluorescência para a TPP em DMEM com diferentes porcentagens de SBF (curva ■ para 0% de SBF, curva ■ para 3% de SBF curva ■ para 10% de SBF), com λ de excitação fixa em 418 nm	128
Figura 29. Curva de calibração da ZnC ₄ P em etanol. Inseto: espectros de emissão de fluorescência da ZnC ₄ P em etanol, com excitação fixa em 428 nm, fenda de excitação de 10 nm e emissão 5 nm. Equação: $y = 7,0737e^{10}x + 4104,9$, $R^2 = 0,995$	130
Figura 30. Curva de calibração da H ₂ C ₄ P em etanol. Inseto: espectros de emissão de fluorescência da H ₂ C ₄ P em etanol, com excitação fixa em 424 nm, fenda de excitação de 10 nm e emissão 5 nm. Equação: $y = 1,8e^{10}x + 807,0$, $R^2 = 0,995$	131
Figura 31. Curva de calibração da TPP em etanol. Inseto: espectros de emissão de fluorescência da TPP em etanol, com excitação fixa em 418 nm, fenda de excitação de 10 nm e emissão 5 nm. Equação: $y = 4,49e^{10}x + 1197,6$	132

Figura 32. Porcentagem de incorporação, por tempo de incubação, a partir de uma solução 4 μ M de ZnC ₄ P, H ₂ C ₄ P e TPP em meio de cultura DMEN com 10 % de SBF pela linhagem celular J774-A.1.	133
Figura 33. Porcentagem de viabilidade celular por dose de luz irradiada, onde as células J774-A.1 foram pré-incubadas com 4 μ M de ZnC ₄ P, H ₂ C ₄ P e TPP em meio de cultura DMEN. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos irradiados foi determinada por one-way ANOVA, seguido pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias $\pm$ SEM (n=3). Valores de P. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, p com relação ao controle.	136
Figura 34. Porcentagem de células viáveis após serem incubadas por uma solução 4 μ M H ₂ C ₄ P em meio de cultura DMEN, e 1 μ M H ₂ C ₄ P lipossomal em meio de cultura DMEN com 10 % de soro bovino fetal pela linhagem celular J774-A.1, e posteriormente irradiadas.	139
Figura 35. Porcentagem de células vivas após serem incubadas por uma solução 4 μ M ZnC ₄ P em meio de cultura DMEN, e 1 μ M ZnC ₄ P lipossomal em meio de cultura DMEN com 10 % de soro bovino fetal pela linhagem celular J774-A.1, e posteriormente irradiadas.	140
Figura 36. Porcentagem de células vivas após serem incubadas por uma solução 1 μ M H ₂ C ₄ P lipossomal e ZnC ₄ P lipossomal em meio de cultura DMEN com 10 % de soro bovino fetal pela linhagem celular J774-A.1, e posteriormente irradiadas.	142
Figura 37. Figura esquemática da membrana plasmática.....	145
Figura 38. Figura esquemática do transporte passivo através da membrana.	146
Figura 41. Representação da sonda incorporada à bicama fosfolipídica.	148
Figura 39. Concentração de íons sódio e potássio intra e extracelular.....	149
Figura 40. Efeito na intensidade de fluorescência da sonda diSBA-C ₂ (excitação em 500 nm) pelo acréscimo de íons sódio, na ausência do fármaco, medida através da sonda di-SBA-C ₂ . A curva (-) refere-se à intensidade de fluorescência na ausência do sal e a curva (-) refere-se à emissão de fluorescência após a adição de íons sódio, até a concentração de 160 mM, à suspensão celular, ocorrendo assim hiperpolarização nas células J774-A.1	150
Figura 41. Efeito na intensidade de fluorescência da sonda diSBA-C ₂ (excitação em 500 nm) pelo acréscimo de íons sódio, na presença do fármaco ZnC ₄ P, medida através da sonda di-SBA-C ₂ . A curva (-) refere-se à intensidade de fluorescência na ausência do sal e a curva (-) refere-se à emissão de fluorescência após a adição de íons sódio, até a concentração de 160 mM, à suspensão celular, ocorrendo assim hiperpolarização nas células J774-A.1	151

Figura 42. Forma esquemática da incorporação do fotossensibilizador na bicamada lipídica. Formam-se nano-poros que afetam o transporte íons sódio através da mesma.	152
Figura 43. Efeito na intensidade de fluorescência da sonda diSBA-C₂ (excitação em 500 nm) pelo acréscimo de monesin até a concentração de 48 µM. A curva (-) refere-se à intensidade de fluorescência na ausência do monesin e a curva (-) refere-se à emissão de fluorescência após a adição do antibiótico monesin, até a concentração de 48 µM, à suspensão celular, ocorrendo assim despolarização nas células J774-A.1	153
Figura 44. Curva de calibração do potencial de membrana para as células J774-A.1 na ausência do éter de coroa.	155
Figura 45. Curva do potencial de membrana para células J774-A.1 previamente incubadas com éter de coroa.	156

Índice de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros Fotofísicos da ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ ($6\ \mu\text{M}$ em meio etanólico). τ_T = tempo de vida triplete, τ_S = tempo de vida singlete, Φ_f = rendimento quântico de fluorescência e Φ_Δ = rendimento quântico de oxigênio singlete.	94
Tabela 2: Tamanho das partículas e potencial zeta das preparações lipossomais	109
Tabela 3- Cálculo do diâmetro médio do lipossoma com base em medidas de espalhamento de luz.	110
Tabela 4- Toxicidade dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e ZnC_4P em meio Hank's e lipossomal, na ausência de luz na linhagem de células J774-A.1 ...	117
Tabela 5- Porcentagem de células mortas após a incubação das células J774-A.1, por 7 e 24 horas, com os diferentes meios de cultura.	120
Tabela 7- Porcentagem da variação de fluorescência e porcentagem da variação da diferença de potencial.	157

Lista de Símbolos.

TFD	Terapia Fotodinâmica
HpD	Hematoporfirina
FS	Fármaco fotossensibilizador
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
O_2^{*-}	Ânion superóxido
$^*\text{OH}$	Radical Hidroxila
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
S_0	Estado singlete fundamental
T_1	Baixo estado triplete
$h\nu$	Absorção de luz
S_n	Estado excitado singlete superior
IC	Conversão interna
k_p	Fosforescência
k_f	Fluorescência
T_n	Estado excitado triplete superior
ISC	Cruzamento intersistema
S_1	Estado eletrônico singlete excitado
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
EMA	European Medical Agency
CPHA	Canadian Public Health Agency
Pc	Ftalocianinas
ϵ	Coeficiente de absorvidade molar ($\text{mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$)
ϕ	Rendimento quântico (mol einstein^{-1})
λ_{max}	Comprimento de onda de absorção máxima(nm)
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação
τ_T	Tempo de vida do estado excitado triplete

τ_s	Tempo de vida do estado excitado singlete
ZnTSPC	Zinco ftalocianina tetrasulfonada
ZnPc	Zinco ftalocianina
ATP	Adenosina Trifosfato
ADP	Adenosina Difosfato
ZnC ₄ P	Zn(II)5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)- 2,3, 5,6-(tetrafluoro)fenil]-porfirinato
H ₂ C ₄ P	5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)2,3,5,6-(tetrafluoro)fenil]porfirina
TPP	Tetrafenilporfirina
diSBA-C ₂	bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbiturico) trimetina oxonol
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ATCC	American Type Culture Collection
DMEM	Meio de cultura dulbelcco mem
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium
DPPC	L- α - dipalmitoil fosfatidilcolina
SBF	Soro bovino fetal
TMPyPH ₂	5,10,15,20-tetrakis(4-N-Metilpyridil)porfirina
Φ_F	Rendimentos quânticos de fluorescência
Φ_Δ	rendimento quântico de produção do oxigênio singlete
DO	Densidade óptica
τ_Δ	Tempo de vida do oxigênio singlete
Abs	Absorção
I _{ref}	Intensidade de emissão de fosforescência do ¹ O ₂ produzido pelo composto padrão
I	Intensidade de emissão de fosforescência do ¹ O ₂ produzido pela amostra
$\Phi_{\Delta ref}$	Rendimento quântico de produção de ¹ O ₂ produzido pela

	referência
$\tau_{\Delta\text{ref}}$	Tempo de vida do $^1\text{O}_2$ produzido pela referência
τ_{Δ}	Tempo de vida do $^1\text{O}_2$ produzido pela amostra
Φ_T	Rendimento quântico de produção do estado excitado triplete
Φ_{Δ}	Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete
ΔF	Variação de fluorescência
S_0	Estado fundamental
S_n	Estados excitados singletes mais energéticos
T_n	Estados excitados tripletes de maior energia
$3F$	Fotossensibilizador no estado excitado triplete
F	Fotossensibilizador
$1F$	Fotossensibilizador no estado excitado singlete
Ψ	Potencial de membrana
χ^2	Função chi-quadrado
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular

Resumo

A Terapia Fotodinâmica (TFD) está baseada no uso de um fármaco fotossensível que, uma vez ativado por luz visível e na presença do oxigênio, induz a produção de espécies reativas de oxigênio tais como o radical peroxila, o ânion radical superóxido e o radical hidroxila (Tipo I) ou oxigênio singlete (Tipo II), que atuam diretamente sobre os sistemas biológicos induzindo a morte da célula, por processo necrótico ou apoptótico.

A maioria dos tipos de tumores responde ao tratamento e os resultados são promissores. Entretanto, órgãos altamente pigmentados e vísceras maciças (fígado, baço, rins e medula óssea) impedem a penetração da luz visível para o tratamento, o que representa um tipo de resistência aos protocolos da Terapia Fotodinâmica.

Torna-se necessário, portanto, procurar por novos agentes fotossensibilizadores. Estudos mostraram que a ação fotodinâmica induz mudanças diretas na membrana celular que levam a um desequilíbrio na homeostase iônica celular (íons sódio, potássio e cálcio), o que certamente leva a um dano no transporte de proteínas da membrana plasmática, e em última análise, a um stress osmótico irreversível.

Neste trabalho, procurou-se determinar a potencialidade do uso da 5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)2,3,5,6-(tetrafluoro)fenil]porfirina (H_2C_4P), e do $Zn(II)$ 5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)2,3,5,6-(tetrafluoro)fenil]-

porfirinato (ZnC_4P) como fármaco fotossensível. Avaliou-se também a zinco ftalocianina associada ao éter de coroa onde, graças à presença do éter de coroa, pode-se observar uma potencialização da ação fotodinâmica.

Nos estudos fotofísicos e fotoquímicos, observou-se que os fármacos porfirínicos apresentam importantes propriedades espectroscópicas para o protocolo da TFD. O rendimento quântico de produção de oxigênio singlete foi medido e o valor encontrado para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ ($\Phi_{\Delta} = 0,62$) foi maior que o valor encontrado para ZnC_4P ($\Phi_{\Delta} = 0,46$).

Os valores de rendimento quântico de produção dos estados excitado tripletes (Φ_T) para ZnC_4P foi da ordem de 0,73 e para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ foi da ordem de 0,63, mostrando que o mecanismo Tipo II para a porfirina base livre $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ é o efeito dominante, e para o fotossensibilizador metalado ZnC_4P , o processo Tipo I é o dominante. Ambos os sistemas apresentaram uma eficiente ação fotodinâmica nos estudos com a linhagem de células J774-A.1.

Fez-se uso de sondas fluorescentes para monitorar a distribuição e alteração na homeostase de íons através da membrana plasmática celular. Esses estudos mostraram que a presença dos ligantes éter de coroa na estrutura da porfirina, atuando concomitantemente à ftalocianina, potencializam a ação fotodinâmica. Observou-se que o 18-crow-6 éter de coroa minimiza a diferença de potencial da mesma ordem de magnitude de quando está associado à ZnPC em uma formulação

lipossomal, (da ordem de 50%), o que mostra que a ZnPc não interfere na formação dos canais de íons potássio formados.

Estes resultados indicaram um grande potencial de aplicação do ligante éter de coroa associado ou ligado covalentemente ao fármaco no uso da TFD, visto que o éter de coroa não modificou as características fotofísicas e fotoquímicas dos fotossensibilizadores, uma nova perspectiva no que chamamos de Terapia Fotodinâmica Sinérgica.

Abstract

Photodynamic Therapy (PDT) is based on the use of a photosensitive drug which, once activated by visible light and in the presence of oxygen, induces the production of several reactive species of oxygen, such as the peroxy radical, superoxide anion and hydroxyl radical (Type I) or singlet oxygen (Type II), which act directly over the biological systems inducing the cell death, through a necrotic or apoptotic process.

Most of the types of tumor respond to the treatment and the results are prosperous. However, highly pigmented organs and massive viscera (kidneys, spleen, liver and bone marrow) block the penetration of the visible light for the treatment, what represents a kind of resistance towards the Photodynamic Therapy protocols.

Hence, it is necessary to look for new photosensitizing agents. Studies have shown that the photodynamic action induces direct changes in the cell membrane that lead to an unbalance in the cell ionic homeostasis (sodium, potassium and calcium ions), what certainly causes damage to the plasmatic membrane protein transport, and in a final analysis, irreversible osmotic stress.

In this work, we aimed at determining the potentiality of the use of the 5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxacyclopentadecane-2-aminomethyl)2,3,5,6-(tetrafluoro)phenyl] porphyrin (H_2C_4P), and the $Zn(II)$ 5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxacyclopentadecane-2-aminomethyl)2,3,5,6-(tetrafluoro)-

phenyl]-porphyrinate (ZnC_4P) as a photosensitive drug. We evaluated also the phthalocyanine zinc associated to the crown ether where, due to the presence of the crown ether, we could observe a potentialization of the photodynamic action.

In the photophysical and photochemical studies, we observed that the porphyrinic drugs present important spectroscopic properties to PDT protocol. The singlet oxygen production quantum yield was measured and the value found for $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ ($\Phi_{\Delta} = 0.62$) was higher than that one found for ZnC_4P ($\Phi_{\Delta} = 0.46$).

The value of the quantum yield of the production of the triplet excited states (Φ_T) for ZnC_4P was 0.73, and for $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ it was 0.63, showing that the mechanism Type II for the free-base porphyrin $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ is the dominant effect, and for the ZnC_4P metallated photosensitizer, Type I process is the dominant one. Both systems present an efficient photodynamic action in the studies with the J774-A.1 cell strain.

We used fluorescent probes to monitor the distribution and alteration of the ionic homeostasis through the plasmatic cell membrane. These studies showed that the presence of the crowned-ether ligands in the structure of the porphyrine, acting together with the dye structure, potentializes the photodynamic action. We observed that the 18-crow-6 crown ether decrease the difference in the transmembrane electrical potential in the same order of magnitude when it is associated to the ZnPC in a liposome formulation, (around 50%), what shows that the ZnPC does not interfere in the action of the potassium ion channels.

These results indicated a great potential of application of the crowned-ether ligant associated or covalently connected to the drug in the use of PDT, protocol once the crown ether structure did not modify the photophysical and photochemical characteristics of the photosensitizers, a new perspective in what we call Synergic Photodynamic Therapy.

I. Introdução

“Câncer” é um termo que abrange um grande número de doenças com padrões clínicos muito diferentes, e ocorre quando uma célula normal sofre alterações no DNA dos genes, o que se chama mutação genética. As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais por um eficiente sistema de reparo. Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferentes são denominadas, então, células cancerosas.

As células alteradas passam então a se comportar de forma anormal.

- Multiplicam-se de maneira descontrolada, mais rapidamente que as células normais do tecido à sua volta, invadindo-o. Geralmente, têm capacidade para formar novos vasos sanguíneos, que as nutrirão e manterão as atividades de crescimento descontrolado. O acúmulo dessas células forma os tumores malignos;
- Adquirem a capacidade de se desprender do tumor e de migrar. Invadem inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. Dependendo do tipo da célula do tumor, algumas dão metástases mais rapidamente e mais precocemente, outras o fazem bem lentamente, ou até não o fazem;

- As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais. Conforme as células cancerosas vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções (figura 1). Por exemplo: a invasão dos pulmões gera alterações respiratórias, a invasão do cérebro pode gerar dores de cabeça, convulsões, alterações da consciência etc.

Figura 1. Representação das etapas de como as células defeituosas dão origem à metástase (Extraído do site da Sociedade Brasileira de Oncologia – www.inca.gov.br).

Além disso, estas células perdem uma de suas características mais vitais: a de entrarem em um processo de morte programado quando envelhecem - conhecido como apoptose, o que permite sua replicação por tempo indefinido.

O processo de carcinogênese, ou seja, de formação de câncer, em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor.

Estágio de iniciação

É o primeiro estágio da carcinogênese. Nele, as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos ou carcinógenos, que provocam modificações em alguns de seus genes (figura 2). Nesta fase, as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível detectar um tumor clinicamente. Encontram-se 'preparadas', ou seja, 'iniciadas' para a ação de um segundo grupo de agentes que atuará no próximo estágio.

Figura 2. Figura representando onde os agentes iniciadores agem (Extraído do site da Sociedade Brasileira de Oncologia – www.inca.gov.br).

Estágio de promoção

É o segundo estágio da carcinogênese. Nele, as células geneticamente alteradas, ou seja, 'iniciadas', sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas (figura 3).

Figura 3. Figura representativa da transformação das células iniciadas em malignas. (Extraído do site da Sociedade Brasileira de Oncologia – www.inca.gov.br).

Estágio de progressão

É o terceiro e último estágio e caracteriza-se pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas (figura 4). Nesse estágio, o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.

Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados agentes oncoaceleradores ou carcinógenos.

Figura 4. Diagrama esquemático representando como as células defeituosas dão origem aos tumores (Extraído do site da Sociedade Brasileira de Oncologia – www.inca.gov.br).

As causas de câncer são variadas, podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas: estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas.

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar essas modalidades.

Radioterapia - É um tratamento no qual se utilizam radiações para destruir um tumor ou impedir que suas células aumentem. A radioterapia induz a morte celular pelo efeito da localização da radiação ionizante, que pode ser eletromagnética (raios X ou gama) e particulada (radiação de partículas α e β , prótons e nêutrons). Os principais efeitos colaterais são: cansaço, perda de apetite e dificuldade para ingerir alimentos, reações na pele (a área afetada poderá coçar, ficar vermelha, irritada, queimada, tornando-se seca e escamosa), além de poder atingir outros tecidos e causar doenças como cistite, dermatite e retinite.

Quimioterapia - A quimioterapia é um tratamento à base de fármacos que impede a reprodução celular e, conseqüentemente, mata as células malignas. No entanto, atua também sobre as células normais com inúmeros efeitos colaterais. Os medicamentos são aplicados, em sua maioria, de forma intravenosa, podendo

também ser administrados por via oral, intramuscular, subcutânea, tópica e intratecal. Os principais efeitos colaterais são: fraqueza, diarreia, perda ou aumento de peso, feridas na boca, queda de cabelos e outros pêlos do corpo, enjôo, vômitos, tonteadas.

Transplante de medula óssea - É um tipo de tratamento proposto para algumas doenças malignas que afetam as células do sangue. Ele consiste na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma nova medula.

Para que se realize um transplante de medula é necessário que haja uma total compatibilidade tecidual entre doador e receptor. Caso contrário, a medula será rejeitada. Esta compatibilidade tecidual é determinada por um conjunto de genes localizados no cromossoma 6. Por isso, devem ser iguais entre doador e receptor. Esta análise é realizada em testes laboratoriais específicos, a partir de amostras de sangue do doador e receptor, chamados de exames de histocompatibilidade. Com base nas leis de genética, as chances de um indivíduo encontrar um doador ideal entre irmãos (mesmo pai e mesma mãe) é de 35%.

Cirurgia - (remoção do tecido lesado e seus arredores). Esse tratamento apresenta inúmeras desvantagens, como por exemplo a desfiguração do paciente, com prejuízos à sua auto-estima.

Podemos ver que os tratamentos convencionais normalmente resultam em sério efeito causado pela perda de função da célula saudável vizinha ao tecido tumoral, e por ter propriedades citotóxicas relativamente indiscriminadas. O

desenvolvimento de novas terapias de câncer, com seletividade melhorada, é sem dúvida uma necessidade. 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 (Kübler, 2005; Pandey, 1992).

I.1. Terapia Fotodinâmica.

A terapia que usa a luz visível ou visível próximo (infravermelho) como agente terapêutico - também definida como fototerapia - foi aplicada no Egito, Índia e China há mais de 4000 anos para o tratamento de psoríase, vitiligo, raquitismo, câncer (Spikes, 1985). Há 2500 anos atrás, um médico grego chamado Heródoto recomendou a fototerapia através da luz solar para a restauração da saúde (Juzeniene, Nielsen e Moan, 2006).

Embora se considere o marco inicial da fototerapia o trabalho desenvolvido por Finsen em 1890 para tratamento de tuberculose cutânea (lupus vulgaris), utilizando-se uma lâmpada de arco-carbono e um filtro para radiação infravermelha (trabalho este que concedeu a Finsen o prêmio Nobel de 1903), os pesquisadores franceses já utilizavam radiação solar para o tratamento da tuberculose, escorbuto, reumatismo, edemas e fraqueza nos músculos mesmo antes de Finsen (Cauvin, J. F., (1815).

Muitos consideram o grupo de pesquisa de von Tappeiner como o fundador da terapia fotodinâmica (TFD). Dentre os trabalhos desenvolvidos neste grupo, destaca-se o realizado por Raab em 1900(Raab, 1900), o qual estudou o efeito do alaranjado de acridina e luz sobre o paramécio, bem como o trabalho de Jesionek em 1903(Tappeiner e Jesionek, 1903), que fez a primeira aplicação clínica da terapia fotodinâmica como o uso tópico de eosina e luz no tratamento de carcinoma basocelular antes do período de irradiação. Em 1907, von Tappeiner e Jodlbauer definiram a TFD como a interação dinâmica entre luz, um agente fotossensibilizador e moléculas de oxigênio, resultando na destruição de tecidos(Tappeiner e Jodlbauer, 1907).

Muitos trabalhos foram realizados até a terapia fotodinâmica moderna, como a demonstração do efeito fotossensibilizante da hematoporfirina em ratos por Hausmann (1911)(Hausmann, 1911) e em humanos por Meyer-Betz)(Meyer-Betz, 1913); a observação da fluorescência da porfirina em sarcomas de ratos por Policard (1924) e em carcinomas de mama humana por Körbler (1931); a primeira aplicação da TFD usando porfirinas no tratamento de tumores de animais por Auler e Banzer (1942); a aplicação de derivados de hematoporfirina no tratamento de câncer de mama e metástase na região torácica por Richard Lipson (1966) e por Kelly e Snell para tratamento de câncer de bexiga(Kelly e Snell, 1976) usando luz branca. Em 1975, Dougherty et al registraram que o derivado de hematoporfirina (HpD), em combinação com luz vermelha, poderia erradicar completamente o crescimento de tumores de mama em ratos.

Purificação do HpD realizado por Dougherty levou à produção do Photofrin II[®], que foi aplicado em vários testes de cânceres de bexiga e pele, conduzindo à pesquisas modernas de TFD.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica que além de ser utilizada no tratamento do câncer, bem como em outras doenças não oncológicas (Qiang , Zhang e Ichikawa, 2006; Triesscheijin et al., 2006), tem sido utilizada no tratamento de efluentes (Clennan, 2000), em sínteses químicas (Esser , Pohlmann e Scharf, 1994; Gerdes et al., 2001), na esterilização de sangue (Sharman , Allen e Lier, 1999) e na exterminação de pragas agrícolas (BenAmor e Jori, 2000).

No Brasil, a técnica da TFD vem sendo estudada desde 1995 pelo grupo de Pesquisa em Fotobiologia e Fotomedicina da FFCLRP-USP, na pesquisa de novos sistemas de liberação de fármacos (Nunes , Sguilla e Tedesco, 2004a) e FSs aplicados à TFD (Rotta , Lunardi e Tedesco, 2003a; Tedesco et al., 2003; Tedesco , Rotta e Lunardi, 2003a).

Este procedimento 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 (Costa et al., 2005; Tedesco et al., 2003; Turchiello et al., 2003).

I.2. A atuação da Terapia Fotodinâmica no tratamento de células tumorais.

Na oncologia, a TFD baseia-se na administração sistêmica de um fármaco fotossensibilizador (FS) que pode ser injetado de forma intravenosa, seletivamente retido pelas áreas neoplásicas e após alguns dias expelido pelo tecido normal.

O tumor é então irradiado, após algum tempo da administração do fármaco, utilizando-se uma fonte de luz na região do vermelho ou infravermelho próximo (Machado, 2000) a fim de que a irradiação penetre efetivamente nos tecidos tumorais, uma vez que radiações de alta energia são absorvidas por cromóforos bioendogênicos e/ou espalhadas pelos tecidos, o que torna a fotoxidação apenas superficial (Ostler et al., 2000). Lâmpadas convencionais, diodos emissores de luz (LED) e lasers tem sido usados como fonte de irradiação na TFD. Devido à elevada potência do feixe de radiação, o laser possibilita que os períodos de irradiação sejam curtos. Também são facilmente acoplados às fibras óticas permitindo que as irradiações possam ser realizadas em órgãos internos (Juzeniene , Nielsen e Moan, 2006b; Qiang , Zhang e Ichikawa, 2006). No entanto, no tratamento de grandes lesões da pele, fontes como os LED's são superiores aos lasers, devido ao seu largo campo de irradiação (Juzeniene , Nielsen e Moan, 2006b; Qiang , Zhang e Ichikawa, 2006).

A irradiação do tumor provoca a excitação do fármaco fotossensibilizador a um estado eletrônico de maior energia, o qual pode retornar ao estado fundamental via processos radioativos (como fluorescência ou fosforescência) ou não-radioativos (como conversão interna, cruzamento intersistema ou relaxações vibracionais)(Juzeiene , Nielsen e Moan, 2006b). É o cruzamento intersistema, que na presença de oxigênio, e do estado triplete excitado gerado, acaba por induzir a produção de espécies reativas de oxigênio ($^1\text{O}_2$, O_2^{-*} , $^*\text{OH}$, H_2O_2 , definidas como EROs) que atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares, desencadeando a morte de tais tecidos por apoptose ou necrose celular.

O fármaco fotossensibilizador ou a luz, sozinhas, não apresentam citotoxicidade para o organismo. Entretanto, a combinação dos dois agentes em presença de oxigênio induz a morte das células tumorais(Mironov , Grin e Tsiprovskii, 2003).

Depois do primeiro trabalho em humanos publicado por Dougherty em 1975(Dougherty et al., 1975), milhares de pacientes têm sido tratados por esta técnica. Os casos publicados incluem neoplasias originárias de diferentes órgãos, como carcinoma de células escamosas; adenocarcinoma; carcinoma de células basais; tumores malignos de origem não-epitelial como glioma, melanoma, retinoblastoma; cromosarcoma e sarcoma de Kaposi. A maioria dos tipos de tumor responde ao tratamento e os resultados são promissores(Akita et al., 2007; Brown et al., 2007; Donnelly et al., 2007; Kaiserman et al., 2007; Moore et al., 2007; Selman, 2007; van der Maulen et al., 2007). Entretanto, órgãos altamente

pigmentados e vísceras maciças (fígado, baço, rins e medula óssea) impedem a penetração da luz para o tratamento, o que os torna resistentes à Terapia Fotodinâmica.

Sendo assim, nos últimos anos ocorreu um aumento da procura por novos agentes fotossensibilizadores, bem como a avaliação da potencialidade no tratamento fotoquímio-terápico de tecidos tumorais (Hamblin e Hasan, 1996; Henderson et al., 2000; Henderson e Dougherty, 1992; Pandey, 2000).

I.3. Mecanismos de ação fotoquímicos e fotofísicos

O mecanismo pode ser descrito de forma global pelo diagrama de Jablonski (figura 5), onde observa-se que o fármaco fotossensibilizador no estado fundamental (S_0) é excitado a um estado eletrônico de maior energia, o qual pode fluorescer e retornar ao estado fundamental, ou realizar um cruzamento intersistema para o mais baixo estado tripleto (T_1).

Figura 5. Digrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização.

$h\nu$ - absorção de luz	S_0 – estado singlete fundamental
S_n - estado excitado singlete superior	k_f – fluorescência
IC - conversão interna	T_n – estado excitado triplete superior
k_p – fosforescência	ISC – cruzamento intersistema

Dentre estes processos de decaimento energético, o cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica, pois consiste numa transição proibida por spin, onde o fotossensibilizador no estado eletrônico singlete excitado (S_1) sofre uma transição para o estado triplete excitado (T_1). A substância fotossensível localizada no estado triplete excitado apresenta um tempo de vida maior do que no estado singlete excitado, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_0$ ser proibida por spin (Sharman, Allen e vanLier, 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 reativas que danificam o tecido irradiado (Gorman et al., 2004; Oleinick, Morris e Belichenko, 2002; van Nostrum, 2004).

A fotodestruição dos tecidos pode ocorrer através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou de oxigênio singlete (mecanismo tipo II) (Bonnett, 1995; Ochsner, 1997; Sibata et al., 2000). O mecanismo tipo I envolve reações de transferência de elétrons e/ou extração de átomos de hidrogênio entre o fotossensibilizador e um substrato (biológico, solvente ou outro fotossensibilizador) produzindo radicais e/ou íons radicais. Estas espécies radicalares, por serem altamente reativas, podem causar destruições aos tecidos irradiados, mas também podem interagir facilmente com o oxigênio molecular gerando espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido ou hidroxila, os quais também são citotóxicos (Sharman, Allen e vanLier, 2000). Este tipo de fotossensibilização é conhecido como sendo do Tipo I.

Outro caminho possível para o estado excitado tripleto gerado é o de transferência de energia para o oxigênio molecular com formação de oxigênio singlete, o qual reage rapidamente com vários materiais biológicos eletrofílicos, como lipídios insaturados, proteínas, ácidos nucleicos etc., generalizando assim a produção dos EROs. Este tipo de fotossensibilização é conhecido como sensibilização do Tipo II.

Existem dois estados singletes do oxigênio. O estado $^1\Delta_g$ tem energia de 94 kJ/mol acima do estado fundamental e o estado $^1\Sigma_g^+$ tem 156,7 kJ/mol. Como o

singlete de maior energia ($^1\Sigma_g^+$) tem um tempo de vida muito curto (20ps em metanol) (Schmidt e Dodesheim, 1994), acaba decaindo ao estado $^1\Delta_g$. Então, o oxigênio singlete no estado $^1\Delta_g$ é considerado como a principal espécie envolvida no mecanismo tipo II. Neste mecanismo, a energia transferida do fotossensibilizador ao oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$ ou 3O_2) leva um dos dois elétrons do 3O_2 (localizados separadamente em orbitais moleculares degenerados antiligantes π^*) a ocupar o mesmo orbital degenerado do outro elétron decorrendo inversão do spin. O fato de um dos orbitais degenerados estar vazio é o fato que confere ao oxigênio singlete um caráter eletrofílico, favorecendo sua participação em reações onde há presença de substratos ricos em elétrons (Machado, 2000).

Atualmente, alguns grupos estão trabalhando nos estudos envolvendo a absorção de um segundo fóton a partir do estado excitado triplete (T_1), gerando estados tripletes de maior energia (T_n) que resultam na degradação do fotossensibilizador em outras espécies radicalares, independente da presença de oxigênio.

Embora boa parte da TFD em desenvolvimento nos diferentes centros de pesquisa pelo globo se baseia na utilização do oxigênio singlete como espécie reativa (DePaoli, DePaoli e Borissevitch, 2002; Kochevar et al., 1996; Yamamoto, Nagano e Okura, 2003), 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), ou as espécies reativas de nitrogênio(Lima et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Tedesco et al., 2007).

I.4. Os fármacos fotossensibilizadores já utilizados na Terapia Fotodinâmica.

O primeiro composto aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para ser utilizado clinicamente foi o Photofrin[®], um derivado da hematoporfirina que apresenta outros variantes comerciais (Photosan[®], Photogem[®], Photocarcinorin[®] e Haematodrex[®])(Brown , Brown e Walker, 2004); (Nyman e Hynninen, 2004). A habilidade fotodinâmica deste composto se deve principalmente aos seus componentes oligoméricos, sendo caracterizado por uma proporção de monômeros, dímeros e oligômeros estimada em 14:19:67, respectivamente(Nyman e Hynninen, 2004). Em razão dos bons resultados obtidos em estudos clínicos, o Photofrin[®] já foi aprovado pelos órgãos de saúde de mais de 40 países para tratamento de diversos tipos de câncer(Nyman e Hynninen, 2004).

Atualmente, mais três compostos aprovados pela FDA vem sendo utilizados na TFD: o Visudyne (verteporfirina ou monoácido derivado de benzoporfirina) no tratamento da degeneração macular, o Levulan (ácido aminolevulínico) no tratamento de ceratose actínica e o Metvix (aminolevulinato de metila) no tratamento de ceratose actínica e carcinoma basocelular(Dickson , Goyan e Pottier, 2003; Nyman e Hynninen, 2004; Oleinick , Morris e Belichenko, 2002; Simplicio ,

Maionchi e Hioka, 2002). O Visudyne também foi recentemente aprovado pela EMEA (European Medical Agency) e a CPHA (Canadian Public Health Agency) para o tratamento da degeneração macular (Nyman e Hynninen, 2004). Mais recentemente, um novo fotossensibilizador (Foscan, m-tetrahidroxifenilclorina) foi aprovado pela EMEA para uso no tratamento de carcinomas celulares da cabeça e do pescoço (Banfi et al., 2004). Além disso, outros compostos estão sendo estudados em testes clínicos de fase I, II e III para aplicações em diversos tipos de câncer, como ftalocianinas de alumínio sulfonadas, ftalocianinas de zinco, etiopurpurinato de estanho (IV), texafirinato de lutécio (III) e hexoxyfitoclorina (Nyman e Hynninen, 2004).

No intuito de aumentar a seletividade tumoral e a absorção na região do vermelho, reduzir a fotossensibilidade da pele depois do período de irradiação e facilitar a solubilidade em meios fisiológicos, vários compostos vêm sendo sintetizados para a aplicação em TFD (Chen, Li e Pandey, 2004; Nyman e Hynninen, 2004; Pandey et al., 1996). Dentre estes compostos destacam-se os derivados de pirofeoforbide, com diferentes tamanhos de grupos alcóxi (RO-, onde R refere-se a grupos alquil). Estes compostos têm demonstrado que o aumento da anfifilicidade pela adição do grupo alcóxi elevou a eficiência fotodinâmica do pirofeoforbide, sendo os heptoxi derivados os mais eficientes. Grupos alcóxi maiores reduziram a eficiência em razão do aumento do caráter hidrofóbico.

Wiehe et al. (Wiehe et al., 2002), ao sintetizarem uma série de derivados tetrapirrólicos com estruturas similares ao Foscan[®], mostraram que a substituição

de um grupo hidroxifenil por grupos alquílicos (hexa ou heptil) levou à localização preferencial destes derivados na interface hidrofóbica/hidrofílica de lipossomas, sugerindo que o aumento da anfifilicidade pode favorecer o acúmulo específico dos fotossensibilizadores *in vivo*. Resultados semelhantes foram obtidos por Rancan et al.(Rancan et al., 2005), os quais mostraram que as dihidroxiclorinas sintetizadas a partir do Foscan® foram retidas diferentemente pelas células linfoblásticas humanas da linhagem Jukart devido à variação da anfifilicidade.

Figura 6. Estrutura de fotossensibilizadores aprovados para aplicação clínica. (A) Visudyne®, (B) Foscan®, (C) Levulan® e (D) Metvix®.

I.5. Ftalocianinas como fármacos fotossensibilizadores em estudo na Terapia Fotodinâmica.

Um dos problemas geralmente encontrados no uso dos derivados porfirínicos diz respeito à sua absorção máxima de luz em comprimento de onda na região de 600 nm, usualmente de baixa penetração nos tecidos humanos (Anderson, 1983). Para solucionar tais problemas, têm surgido nos últimos anos várias novas classes de agentes fotossensibilizadores. Entre eles destacam-se os derivados de ftalocianinas (Brasseur, Quellet e LaMadeleine, 1999; Chan, Brasseur e LaMadeleine, 1997; Hu, Brasseur e Yildiz, 1998).

As ftalocianinas têm sido alvo de intensos estudos como fotossensibilizadores de segunda geração desde meados da década de 80, uma vez que apresentam uma alta seletividade, uma alta absorção nos comprimentos de onda de 600 a 800 nm e uma baixa fototoxicidade. Estes compostos representam uma extensão do sistema porfirínico, podendo ser facilmente preparados por métodos sintéticos clássicos (embora nem sempre sejam fáceis de se purificar). Elas são ainda eficientes geradoras de oxigênio singlete, apresentando bandas de absorção ligeiramente deslocadas em direção ao infravermelho (ftalocianinas monoméricas – banda de absorção no vermelho, banda Q), com maiores coeficientes de extinção molar ($\lambda \cong 670 \text{ nm}$, $\epsilon \cong 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Algumas ftalocianinas são seletivamente retidas nos tecidos tumorais e são resistentes à degradação química e fotoquímica. Produzem estados excitados triplete de vida longa (na ordem de μs), com razoável eficiência sob iluminação.

As ftalocianinas mimetizam as porfirinas em seu macrociclo central, que consiste em uma unidade cíclica tetrapirrólica (Figura 7). Contudo, nas ftalocianinas, as subunidades pirrólicas são unidas por átomos de Nitrogênio, enquanto nas porfirinas as subunidades são unidas via 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 do vermelho do espectro visível, que como já mencionado anteriormente, é a região do espectro mais útil no tratamento de tumores. Sendo assim sua absorção máxima localiza-se em comprimentos de onda maiores que o das porfirinas (aproximadamente 670 nm). A emissão de fluorescência das ftalocianinas também se encontra na região do vermelho por volta de 670 nm.

Figura 7. Estrutura química das metalo ftalocianinas.

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central (Figura 7), o que é refletido nas grandes variações no rendimento quântico do estado excitado triplete (ϕ_T) e tempo de vida do estado excitado triplete (τ_T) das metalo ftalocianinas (Bonnet, 2000). Podem ser encontrados vários relatos na literatura (Darwent et al., 1982) a respeito da influência do íon metálico central das ftalocianinas sobre suas propriedades fotofísicas. Os efeitos fotossensibilizadores nos sistemas biológicos envolvem principalmente o primeiro estado excitado triplete (T_1) do fotossensibilizador, que é formado via cruzamento intersistema do estado excitado singlete de vida curta produzido inicialmente pela excitação do fármaco (Spikes, 1984b). Assim, um bom fotossensibilizador deve ter um alto rendimento quântico do estado excitado triplete e um tempo de vida apropriado desse estado (Phillips e O'Connor, 1984). A

complexação das ftalocianinas com íons metálicos diamagnéticos, tais como Zn^{2+} , Al^{3+} e Ga^{3+} , dá origem a complexos ftalocianínicos com alto rendimento quântico do estado excitado triplete ($\phi_T > 0,4$) e com tempos de vida longos (Darwent et al., 1982), e consequentemente, os complexos ftalocianínicos de alumínio e zinco (d^0 e d^{10} , respectivamente) apresentam um apreciável rendimento quântico de oxigênio singlete (Allen, 2001). Um fotossensibilizador ftalocianínico contendo um metal diamagnético é mais adequado para uma fotossensibilização eficiente do que um composto análogo contendo um metal paramagnético, pois este último diminui o tempo de vida do estado excitado triplete, tornando o fotossensibilizador inativo, como por exemplo o Cu(II) , que é d^9 (Bonnet, 2000). Sendo assim, um bom fotossensibilizador apresenta um estado excitado singlete de vida relativamente curta (cerca de 3 à 8 ns), e um estado excitado triplete de vida longa, que são produzidos em alto rendimento quântico (Daraio et al., 1991; Daraio, Aramendía e San Román, 1993; Foley et al., 1997; Xu et al., 1992; Xu et al., 1999).

Portanto, as ftalocianinas e seus derivados encontram uma vasta aplicação em medicina como fotossensibilizadores para a TFD. Estudos para aumentar sua eficiência, aumentando o acúmulo preferencial e seletivo nos tecidos tumorais e proporcionando intensa absorção na região do infravermelho próximo, estão em estudo (Lukyanets, 1998; Lukyanets, 1999). Atualmente, há dois grupos principais de ftalocianinas sob investigação na TFD: as ftalocianinas solúveis em água e as ftalocianinas hidrofóbicas ou lipofílicas.

Dentre as ftalocianinas solúveis em água, destacamos a Zinco ftalocianina tetrasulfonada (ZnTSPC). Os esqueletos ftalocianínicos contendo derivados sulfonados são fotossensibilizadores adequados para a TFD (Gomer, 1989). As metaloftalocianinas sulfonadas, solúveis em água, são particularmente atrativas para a TFD porque elas são destituídas de toxicidade sistêmica e local, e assim suas propriedades fotossensibilizadoras têm sido bastante estudadas, tanto “in vivo”, quanto “in vitro”(Obochi , Boyle e van Lier, 1993).

Dentre as ftalocianinas hidrofóbicas mais utilizadas em TFD clínica, encontra-se a Zinco ftalocianina não substituída (ZnPc). A Zinco ftalocianina é um fotossensibilizador de segunda geração promissor para uso na TFD devido às suas propriedades comprovadas, tais como sua alta seletividade do alvo tumoral (Reddi et al., 1987; Reddi et al., 1990) e alta eficiência de fotogeração de oxigênio singlete citotóxico (Valduga et al., 1988).

Uma propriedade importante das drogas fotossensibilizantes são as suas características hidrofóbicas e hidrofílicas. Ambas as estruturas centrais das porfirinas e ftalocianinas são essencialmente hidrofóbicas, o que torna importante o estudo de grupos substituintes com o objetivo de conferir-lhes um caráter anfifílico e aumentar a sua seletividade(Simplicio , Maionchi e Hioka, 2002).

Para pesquisas na área de biomedicina, vários tipos de ftalocianinas e porfirinas com maior solubilidade em meio fisiológico têm sido estudados. Dentro deste contexto, a proposta de trabalho apresentada por esta Tese de Doutorado inclui o estudo de novas porfirinas e ftalocianinas derivadas de éter de

coroa, com potencial ação fotodinâmica, uma vez que a presença de tais grupos aumenta a hidrofiliidade destes compostos. Além disso, tais ligantes formam canais na membrana celular que alteram o equilíbrio homeostático da membrana plasmática, permitindo com que outros processos de resposta celular sejam alterados - o que chamamos de TFD sinérgica, um novo conceito em TFD (Lunardi e Tedesco, 2006; Pelegrino et al., 2005; Rotta , Lunardi e Tedesco, 2003b).

I.6. Éteres de coroa.

Éteres de coroa são sistemas macrociclos conhecidos por mimetizarem facilmente processos de reconhecimento biológico, mediando vários processos químicos (Tsukube, 1990; Tsukube, 1992; Tsukube , Yamada e Shinoda, 2001). Uma vez que os éteres de coroa apresentam a propriedade de atrair para a proximidade da estrutura cíclicas muitos íons ou moléculas, estes sistemas atuam usualmente como catalisadores, mimetizando vários sistemas enzimáticos(Yamada et al., 1999). Esse fato tem tornado viável a sua investigação nos fenômenos de transportes iônicos, uma vez que tais compostos apresentam propriedades similares aos antibióticos macrociclos (Pedersen e Frensdorff, 1972).

Muitos antibióticos, tais como valinomicina (McMurray e Begg, 1959) e nonctina (Prestegard e ChanSunney, 1970), exercem efeito biológico interessante, pois influenciam o transporte de íons Na^+ e K^+ através da membrana celular, o

que é extremamente importante para a vida celular (Lehninger; Nelson e Cox, 1995). Praticamente cada célula animal mantém um equilíbrio homeostático dos íons Na^+ e K^+ em relação ao seu meio circundante.

Este equilíbrio é estabelecido e mantido por um sistema de transporte ativo na membrana plasmática, envolvendo enzimas do tipo Na^+K^+ ATPase, que acopla a quebra do ATP à movimentação simultânea dos íons contra seus gradientes de concentração. Para cada molécula do ATP convertida em ADP e fosfato inorgânico, este transportador move dois íons K^+ para dentro e três íons Na^+ para fora, através da membrana plasmática (Lehninger; Nelson e Cox, 1995).

Complexos desses cátions, como o macrociclo presente na valinomicina, são responsáveis pela morte de células microbianas através do rompimento dos processos de transporte secundário e as reações conservadoras de energia (Lehninger; Nelson e Cox, 1995). A valinomicina (McMurray e Begg, 1959) é um peptídeo cíclico pequeno, que se dobra em volta dos íons K^+ e neutraliza sua carga positiva. O peptídeo age então como um vetor, transportando os íons K^+ através da membrana no sentido do gradiente de concentração.

Os éteres de coroa apresentam diferenças de especificidade para os diferentes cátions de metais alcalinos. Os complexos sal-poliéter são formados pela interação íon-dipolo entre o cátion e a carga negativa dos átomos de oxigênio, que são simetricamente arranjados no anel do poliéter (Pedersen, 1968).

Figura 8. Estrutura de éteres de coroa.

A estabilidade do complexo não é alcançada se o cátion for muito grande para se ajustar à cavidade do éter de coroa. A seletividade indica que o poliéter de quatro oxigênios é específico para os íons lítio, o poliéter de cinco oxigênios é específico para o sódio e o de seis oxigênios, específico para o potássio (figura 8)(Pedersen e Frensdorff, 1972).

I.7. Porfirinas ligadas a éteres de coroa.

A síntese de derivados porfirínicos e de ftalocianínicos com éteres de coroa tem sido estudada durante as últimas décadas (Michaudet , Richard e Boitrel, 2000). O principal objetivo desenvolvido até o momento tem sido o de construir ligantes de porfirinas ou ftalocianinas com os éteres de coroa, pois estas estruturas exibiam interessantes propriedades eletroquímicas, elétricas e óticas (vanVeggel , Verboom e Reinhout, 1994).

A idéia de preparar éteres de coroa com funcionalização lateral tem merecido atenção especial em vários segmentos da ciência (Nickon e Silversmith, 1987; Tsukube , Yamada e Shinoda, 2001).

Os sistemas vesiculares naturais ou artificiais, ordenados naturalmente segundo o modelo do fluido mosaico, compostos por fosfolipídios e glicolipídios, presentes na maioria das células animais, e sistemas biológicos, podem incorporar facilmente proteínas, receptores, ionóforos, bem como inúmeras outras estruturas supramoleculares, tanto na superfície como no interior das bicamadas lipídicas.

Quando estruturas análogas a éteres de coroas são associadas à dupla camada lipídica em sistemas vesiculares, um canal molecular é espontaneamente formado através da vesícula (figura 9) atuando diretamente no equilíbrio homeostático iônico.

Figura 9. Figura esquemática da formação de um canal na bicamada.

Interações entre tais agregados lipídicos e sistemas proteínas ou ionóforos têm sido investigadas (Cristian, 1996; Lopes, Stark e Hong, 2001) e são responsáveis por controlar a permeabilidade da membrana celular a vários elementos e íons metálicos, alterando o metabolismo celular diretamente.

De acordo com modelos de ionóforos de Fyles (Fyles et al., 1993) e Lehn (Pregel, Jullien e Lehn, 1992), que estudaram canais de cátions derivados de 18-crown-6, os éteres de coroa são incorporados à vesículas de fosfolipídios, e formam canais espontaneamente através da vesícula após sua incorporação.

Existem também numerosos estudos de canais de íons formados por derivados de éteres de coroa, quando incorporados à peptídios (Otto , Osifchin e Regen, 1999; Voyer e Robitaille, 1995). Estes autores relataram que os éteres de coroa encontram-se incorporados aos poros do tubo. Nesta incorporação, os lipídios ficam em uma linha perpendicular ao plano do éter. A estrutura do nanotubo tem um extraordinário potencial, pois é capaz de formar os canais pela associação de moléculas idênticas. Além disso, foi descrito que esta estrutura pode adaptar-se à qualquer espessura de membrana (Hartgerink , Clark e Ghadiri, 1998).

Sendo assim, a ação destes éteres de coroa, associada aos sistemas biológicos, em especial membranas celulares, fornece uma ferramenta adicional do controle do metabolismo celular.

A incorporação do agente sensibilizador (fotoativo) em membrana biológica parece ser bastante favorecida quando se utiliza o veículo adequado como sistemas carregadores de drogas.

I.8. Uso da sonda fluorescente para monitorar a diferença de potencial de membrana.

Na célula, a membrana biológica mantém uma diferença de potencial entre as fases aquosas que ela separa. Essa diferença de potencial está envolvida em uma série de funções da membrana, por exemplo: transporte ativo de solutos (Wilson, 1978) e regulação do volume da célula (Jakobsson, 1980).

Estudos mostraram que a ação fotodinâmica provoca mudanças na membrana e indicaram que as células sofreram um desequilíbrio da homeostase dos íons sódio, potássio e cálcio, o que possivelmente leva a um dano no transporte de proteínas da membrana plasmática, e por último a um stress osmótico(Specht e Rodgers, 1990a; Specht e Rodgers, 1991b).

Sendo assim, uma parte dos estudos da presente tese de doutorado está diretamente relacionada ao uso de sondas fluorescentes para monitorar a distribuição de íons através da membrana plasmática(Cheung , Solonenko e Busch, 2003; Yamamoto , Nagano e Okura, 2003). Esses estudos tornam-se importantes devido à presença dos ligantes éter de coroa na estrutura da porfirina, ou na solução lipossomal junto à ftalocianina, podendo então estes ligantes trabalhar concomitantemente ao fotossensibilizador potencializando assim a ação fotodinâmica, visto que vários trabalhos tem mostrado que alterações nas distribuições de íons como, cálcio, sódio, potássio, cloretos, bem como alterações no pH intracelular e extracelular, estão sempre associadas ao processo de TFD (BenHur , Dubbelman e VanSteveninck, 1991; Morgan , Whitaker e Oseroff, 1998; Varnes , Bayne e Bright, 1996).

A possibilidade do uso de sondas fluorescentes para estudos de variações no potencial de membrana tem sido descrita em muitos reviews (Loew, 1993; Shapiro, 1994). Estas sondas têm sido classificadas como sondas de resposta lenta

ou sondas de resposta rápida, dependendo do mecanismo de resposta e estrutura química da mesma (Plásek e Sigler, 1996).

Existe uma diferença fundamental entre essas duas famílias distintas de sondas, sendo que cada tipo possui características específicas para os mecanismos de resposta à variação do potencial elétrico trans-membrana, atuando diretamente sobre a resposta, medida espectrofluorimetricamente.

Sondas de resposta rápida são adequadas para respostas mais rápidas de variação de potencial que ocorrem em nervos e músculos (Cohen e Salzberg, 1978); as sondas fluorescentes de resposta lenta podem atravessar a membrana em segundos. Isso permite com que as mesmas se acumulem de uma forma relativamente rápida em várias células (Waggoner, 1976; Waggoner, Sirkin e Tolles, 1975), e assim como outros íons permeáveis presentes na membrana, podem se deslocar através da mesma até alcançarem um equilíbrio eletroquímico.

Sob tais condições, seu gradiente de concentração entre a fase aquosa dos dois lados da membrana celular obedece à equação de Nernst (Rottenberg, 1979). As células hiperpolarizadas apresentam um aumento intracelular na concentração da sonda, o que leva a um acúmulo da mesma no interior da célula, ao passo que um efeito oposto, ou seja, a despolarização, leva ao decréscimo da concentração da sonda no interior da célula.

Devido à variação na quantidade da sonda no interior da célula pode-se monitorar a variação de potencial elétrico trans-membrana. A intensidade de fluorescência da sonda é, em geral, afetada por dois fenômenos físicos: i)

formação de dímeros não fluorescentes, que ocorre devido ao aumento da sonda no citossol, e ii) mudança no espectro de emissão e absorção devido à ligação da sonda à macromoléculas do citossol e às membranas de organelas celulares.

Nos estudos referentes à influência dos ligantes éter de coroa no potencial elétrico trans-membrana, foi escolhida a sonda bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C₂, que é uma sonda que não se acumula na mitocôndria, e é seletiva para o monitoramento do potencial elétrico trans-membrana da membrana plasmática (Plásek e Sigler, 1996).

I.9. Sistemas de liberação de fármacos.

Uma outra grande linha de estudo na área de TFD se concentra nos estudos relacionados à administração e biodistribuição dos corantes fotossensibilizadores nos diferentes sistemas biológicos (Dougherty, 1995; Dougherty e Potter, 1991; Henderson e Dougherty, 1992; Nunes, S. M. T., 2003; Nunes, Sguilla e Tedesco, 2004b) com o intuito de torná-los mais específicos na retenção e distribuição pelos tecidos carcinogênicos, baseada no uso do sistema de liberação do fármaco.

Tecidos tumorais são altamente heterogêneos e compartimentalizados, onde o fotossensibilizador pode possuir diferentes propriedades (Jori, 1996). Portanto, parece importante que a abordagem destes problemas se inicie através do uso de sistemas mais simples que os biológicos, sistemas estes que mimetizam

ao máximo as situações específicas que ocorrem *in vivo*, com a finalidade de definir a influência de parâmetros específicos na determinação da eficiência fotossensibilizadora total.

Dentre os sistemas sintéticos que mimetizam sistemas biológicos e que têm sido preferencialmente escolhidos, destacam-se as vesículas sintéticas, lipossomas, preparadas por diferentes técnicas e com composição semelhante à da membrana plasmática celular. Tais compostos são também muito utilizados como sistemas transportadores de agentes farmacologicamente ativos (drogas, enzimas)(Selbo , Hogset e Prasmickaite, 2002; Takeuchi , Kurohane e Ichikawa, 2003; Tedesco , Rotta e Lunardi, 2003b).

Os fosfolipídios são os componentes estruturais das membranas biológicas que aparecem em maior proporção. As moléculas de fosfolipídios são anfipáticas e quando dispersas em meio aquoso se aproximam e se alinham formando uma bicamada planar laminar a fim de minimizar as interações desfavoráveis entre a fase aquosa e as longas cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos. Tais interações são completamente eliminadas quando a bicamada laminar se dobra para formar vesículas fechadas.

Com base nas considerações apresentadas, ressaltamos a importância do presente trabalho de doutorado na aplicação desses novos agentes fotossensibilizadores à Terapia Fotodinâmica. A importância das porfirinas e de ftalocianinas, ligadas covalentemente às estruturas do tipo éter de coroa permitirão com que tais agentes atuem de modo sinérgico, maximizando a ação

fotodinâmica. A produção conjunta de espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete e ânion radical superóxido), com concomitante alteração na homeostase intracelular de íons como sódio, potássio e cálcio, deve sem dúvida induzir uma resposta mais agressiva do sistema biológico, facilitando o processo apoptótico.

II. Objetivos

Tendo em vista a possibilidade do éter de coroa alterar o sistema homeostático e assim maximizar a ação fotodinâmica e facilitar o processo apoptótico, idealizamos como objetivos deste Doutorado:

- Realizar estudos fotoquímicos e fotofísicos no estado estacionário e resolvido no tempo, para os derivados porfirínicos de éteres de coroa em meio homogêneo orgânico e em meio micro heterogêneo lipossomal;
- Determinar a taxa de incorporação destes fármacos em linhagem de macrófagos neoplásicos J774-A1;
- Realizar experimentos de toxicidade na ausência e presença de luz com os diferentes fármacos fotossensibilizadores (ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ TPP) em meio lipossomal e em meio de cultura celular de macrófagos neoplásicos J774-A1;
- Avaliar a alteração da homeostase intracelular de íons Na^+ durante processo de hiperpolarização na presença dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$;
- Analisar o efeito do éter de coroa 6-crown-18 no processo de despolarização da membrana plasmática, utilizando a sonda de resposta lenta diSBA- C_2 ;
- Realizar estudos com a zinco ftalocianina (ZnPc) e o éter de coroa 6-crown-18, em suspensão lipossomal;

- Quantificação da diferença de potencial elétrico transmembrana, utilizando a sonda de resposta lenta bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbiturico) trimetina oxonol, diSBA-C₂, *in vitro*.

Os seguintes fármacos foram estudados: 5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)2,3,5,6-(tetrafluoro)fenil]porfirina (H₂C₄P), Zn(II)5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)- 2,3, 5,6-(tetrafluoro)fenil]-porfirinato (ZnC₄P) (figura 10). Esses fármacos foram preparados pelo grupo da Prof^a. Marilda das Dores Assis, desenvolvendo trabalho de colaboração. E Zinco Ftalocianica (ZnPc) da Aldrich.

Figura 10. Estrutura da Zn(II)5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)- 2,3, 5,6-(tetrafluoro)fenil]-porfirinato (ZnC₄P).

III. Parte Experimental

III.1. Materiais

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 Barnstead D 3750, com filtragem final em membrana de 0,2 μm de diâmetro, pressão máxima de operação em 50 psi (3,4 Kg/cm^2) e resistividade de 18 $\text{m}\Omega$.

O fármaco 5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)2,3,5,6-(tetrafluoro)fenil]porfirina ($\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$), e o $\text{Zn(II)5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)2,3,5,6-(tetrafluoro)fenil]-porfirinato}$ (ZnC_4P) foram preparados pelo grupo de bio-inorgânica coordenado pela professora Marilda das Dores Assis do Departamento de Química da FFCLRP-USP, que conta com o apoio da FAPESP, e desenvolve trabalho de colaboração com nosso grupo de pesquisa.

Os materiais relacionados abaixo foram utilizados sem tratamento prévio: L- α - dipalmitoil fosfatidilcolina-DPPC (Sigma Chemical Company), lisofosfatidilcolina (Aldrich), zinco ftalocianina-ZnPC (Aldrich), bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina, diSBA- C_2 , (Molecular Probe), 2-(Hidroximetil)-18-crown-6 (Aldrich), Tetrafenilporfirina (TPP, Aldrich). Os solventes de grau analítico relacionados a seguir foram utilizados sem tratamento prévio:

dimetilformamida-DMF (Sigma), dimetilsulfóxido-DMSO (Sigma), etanol (Merck), isopropanol (Merck).

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

Os estudos envolvendo culturas de células foram realizados com a linhagem neoplásica de macrófagos J774-A1 (American Type Culture Collection, ATCC). Essas células plasmáticas linfáticas foram obtidas originalmente de ratos DBA/2. A indução deste tipo de neoplasma (câncer linfótico) foi feita, normalmente, pela injeção de metilcolantreno na cavidade torácica de ratos. A remoção do fluido, presente na cavidade após dois dias e a transfusão para outros animais garante a proliferação deste tipo de células. Os estoques primários cultivados em laboratório, a partir das matrizes animais, foram analisados e comercializados pela American ATCC.

Os materiais referentes às culturas celulares foram: meio de cultura dulbelcco mem (DMEM) (Cultilab), antibiótico (Antibiotic/Antimycotic-Gibco BRL), L-glutamina (200 mM-Gibco BRL), bicarbonato de sódio (Nuclear), Hank's (Gibco BRL), 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium (MTT, Sigma), corante azul de tripan (Gibco BRL), glicose (Sigma), cloreto de sódio (NaCl, Nuclear), cloreto de potássio (KCl, Nuclear).

O soro bovino fetal (SBF) adquirido junto a Gibco BRL apresenta em sua composição básica insulina, hormônios e vários outros fatores de crescimento. Essa solução estoque foi pré-aquecida a 56°C para inativação das enzimas e, em

seguida, dividida em alíquotas de volumes fixos de 10,0 mL, conservados no freezer a -20°C.

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

III.2. Preparações

As soluções de tampão Hank's foram rotineiramente preparadas pela diluição 10 vezes em água ultrapura, seguida de filtração com membrana estéril de poro de 0,22 µm.

As soluções estoques de ZnC₄P, H₂C₄P, TPP, em solução de DMSO, foram armazenadas na ausência de luz a - 20 °C por um período não superior à duas semanas.

Para os experimentos em meio homogêneo, foram realizadas soluções no meio em estudo a partir de uma solução estoque inicial do fármaco fotossensibilizador em DMSO com concentração 3 mM.

As soluções estoques de zinco ftalocianina (ZnPc) preparadas em uma mistura de DMSO/DMF (1:1) (absoluto) foram armazenadas por um período não superior à duas semanas, na ausência de luz a - 20 °C.

Todas as formulações lipossomais de DPPC foram preparadas pelo método de injeção, conforme descritos na seção Métodos III.4.1.7, e armazenadas na ausência total de luz à temperatura ambiente, por até duas semanas.

As concentrações finais da ZnPc, nas soluções utilizadas nos estudos, foram determinadas espectrofotometricamente, utilizando-se os coeficientes de extinção molar em 674 nm ($\epsilon = 2,41 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em DMSO/DMF e em suspensões lipossomais e em 666 nm ($\epsilon = 2,42 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em etanol Oliveira, D. M., (2006). Para as porfirinas, utilizaram-se os seguintes coeficientes de extinção molar para ZnC_4P em 422 nm ($\epsilon = 1.23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) e para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em 420 nm ($\epsilon = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) em etanol (Pelegrino et al., 2005).

Para o cultivo da linhagem J774-A.1, foi utilizado o meio DMEM, constituído de uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, atuando como uma solução nutritiva. Esse meio foi destinado à cultura de células humanas e de outros animais. O meio DMEM foi adquirido na forma desidratada. Esse meio foi preparado em 1,0 L de água ultrapura, pela adição do conteúdo do envelope, acrescido de 2,0 g de bicarbonato de sódio.

Ao final da adição de todos os componentes, esse meio foi filtrado, utilizando-se uma membrana de 0,22 μm em capela de fluxo e um sistema de filtração autoclavável da Corning. Posteriormente, esta solução foi distribuída em 11 garrafas de vidro estéreis, contendo cada uma 90,0 mL de DMEM, sendo que antes da sua utilização, foram adicionados às mesmas 10,0 mL de soro bovino fetal para obtenção do meio completo, 1,0 mL de antibiótico.

A solução de azul de tripan foi preparada na concentração estoque de 0,4%, utilizando-se como solvente o tampão Hank's (pH = 7,4); tal solução foi filtrada, utilizando-se membrana de 0,22 μm . A seguir, alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para um *ependorff* e conservadas sob refrigeração em temperatura de 2-8° C.

III.3. Aparelhagem

Nos estudos espectrofotométricos foram utilizados os espectrofotômetros de absorção modelo Lambda 20 da Perkin Elmer e U300 da Hitachi, e os espectrofluorímetros modelo Fluorog 3 da Spex e F4500 da Hitachi, todos com controle de temperatura e agitação magnética.

Para as medidas de decaimento de fluorescência, foi utilizado o método de contagem simples de fótons. O sistema utilizado para excitação consiste em 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:YVO₄ - Millennia Xs - Spectra Physics) que emite em 1064 nm. O feixe passa então por um cristal dobrador de frequências 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 frequência 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.

A fonte de irradiação utilizada nos experimentos de determinação do espectro de absorção do transiente e tempo de vida triplete dos fármacos fotossensíveis foi um sistema laser Nd-YAG da Continuum, modelo SURELIT I-10. Como fonte de excitação, utilizou-se o terceiro harmônico do laser (355 nm). A energia média utilizada foi da ordem de 30 mJ por pulso, através de uma fenda de 8,0 mm de diâmetro. À uma distância de 10 cm da fenda do laser, foi posicionado um suporte para celas termostatizável com agitação magnética (Hellman CUV-O-Stir).

A intensidade da luz foi determinada antes e após o conjunto de pulsos por um “Power Meter” (Field Master da Coherent), usando uma cabeça de detecção LM-30 V, posicionado a partir do suporte para celas. Os sinais dos transientes gerados foram detectados pela fotomultiplicadora e transferidos para um osciloscópio digital (Tektronix modelo TDS 340A), sendo armazenados em um computador. A análise final dos dados obtidos foi realizada utilizando-se o software fornecido pela Edinburg Instruments.

A mesma fonte de irradiação foi utilizada para a determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete. Neste caso, a energia

média utilizada foi da ordem de 50 mJ por pulso. O sinal de emissão de fosforescência do oxigênio singlete foi identificado em 1270 nm utilizando-se um detector de germânio da North Coast Scientific Corporation, modelo 823A, e transferido para o osciloscópio digital. Um filtro de silicone foi usado para evitar qualquer sinal de fluorescência interferindo com as medidas de oxigênio singlete. Os dados obtidos foram processados e analisados utilizando-se o software operacional do próprio equipamento.

Nos estudos envolvendo preparações lipossomais pelo método de injeção, foi utilizada uma bomba de injeção peristáltica da World Precision Instruments (WPI) (modelo SP 100i).

Nos estudos do potencial zeta e de 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 possuindo a capacidade de determinar tamanho de partículas no intervalo de 2 nm a 3 μ m. 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 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 CK2 da Olympus (para análise da

forma, tamanho e crescimento de cultura), microscópio convencional e de fluorescência, modelo BX-50 da Olympus, centrífuga refrigerada, modelo 5810 R da Eppendorf e banhos termostatizáveis Fischer Scientific, modelo 801.

Nos estudos de fototoxicidade, empregou-se como fonte de luz um sistema do tipo foto-polimerizador (Dabi-Atlante) de uso rotineiro em procedimentos odontológicos. O sistema foto-polimerizador foi acoplado a um filtro óptico (Eikonal Instrumentos) que permite a transmissão de uma faixa selecionada de comprimento de onda. Para os estudos envolvendo os fotossensibilizadores TPP, ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, o filtro utilizado permite a passagem de radiação com comprimento de onda entre 400 e 500 nm, que é a faixa de comprimento de onda em que ocorre a máxima absorção de radiação por estes fotossensibilizadores. A intensidade de luz foi determinada por um “Power Meter”(Field Master da Coherent), usando uma cabeça de detecção LM-3. A intensidade da luz utilizada foi de 1, 3 e 5 Jcm^{-2} .

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

III.4. Métodos

III.4.1 Estudos espectroscópicos.

III.4.1.1 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, TPP e da ZnPc em meio orgânico.

A investigação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário da ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e ZnPc em meio orgânico foi baseada em medidas diretas dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência.

Os espectros de absorção foram registrados em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho ótico, utilizando-se como referência o meio em estudo, na ausência das ZnC_4P , da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e da ZnPc . Tais espectros foram registrados para os fotossensibilizadores ZnC_4P , da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e da ZnPc em meio orgânico.

Os espectros de emissão de fluorescência fotoestacionária foram registrados na faixa de 630 a 750 nm, com excitação fixa em 428 nm para ZnC_4P , 424 para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ nm, 418 nm para TPP e 610 nm para ZnPc em cela de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

III.4.1.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da ZnC_4P e da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em etanol.

Uma solução de 5,10,15,20-tetrakis(4-N-Metilpyridil)porfirina (TMPyPH_2) e de tetrafenilporfirina (TPP) em meio orgânico foi preparada inicialmente, de

modo a obter uma absorbância constante na faixa de 0,03, utilizada como padrão. As soluções contendo os fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em etanol foram preparadas de modo a obter absorbâncias da ordem de 0,04, evitando assim que o efeito de filtro interno interferisse no resultado.

Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) foram obtidos através do cálculo da área do espectro de emissão de fluorescência corrigido da solução de TPP ($\Phi_F = 0,13$, $\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$) e TMPyPH₂ ($\Phi_F = 0,07$, $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$) em benzeno e metanol respectivamente, na faixa de 630 – 750 nm (Eaton, 1988; Magde, 1979).

Assim, foram obtidos os valores de Φ_F , registrando-se os espectros de absorção do padrão (TMPyPH e TPP em meio orgânico), bem como os espectros de emissão de fluorescência corrigidos, tanto para o padrão como das soluções preparadas nos meios considerados, utilizando-se o método relativo. Este método relaciona o rendimento quântico de fluorescência de cada composto com o rendimento quântico de fluorescência do padrão, de acordo com o formalismo descrito por Demas e Crosby (Demas e Crosby, 1971a).

$$\Phi_F = (A_x/A(p)).(DO(p)/DO_x).(n(p)^2/n_x^2). \Phi_F(p) \quad \text{Equação 1}$$

onde os subscritos x e p são referentes à amostra e ao padrão, respectivamente. A é a área do espectro de emissão de fluorescência corrigido, DO é a densidade óptica

no comprimento de onda de excitação, n é o índice de refração do meio e Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência.

III.4.1.3 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ZnC_4P e para H_2C_4P em meio orgânico.

Os tempos de vida de fluorescência da ZnC_4P (5,0 μM) e da H_2C_4P (5,0 μM) em meio orgânico (etanol) foram obtidos pela técnica de contagem de fótons.

À cada cela de quartzo de 1 cm, foram adicionadas alíquotas 3,0 mL das soluções de estudo contendo o fotossensibilizador.

O comprimento de onda de excitação e de emissão utilizado para a ZnC_4P foi de 434 nm e 652 nm respectivamente, e para H_2C_4P foi de 428nm e 713nm respectivamente. Para cada medida de decaimento foram coletadas em média 8000 contagens.

As medidas foram realizadas utilizando-se como fonte de excitação um diodo laser que bombeia um laser de estado sólido (Nd:YVO₄ - Millenia Xs - Spectra Physics), passando depois por um cristal dobrador de frequência. Assim, feixe final, com potência podendo chegar a 10 W e comprimento de onda 532nm, 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 frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz, com agitação e termostatização contínua. As curvas de decaimento de

fluorescência foram analisadas utilizando-se o software operacional do próprio instrumento. Os ajustes foram validados através do valor mínimo na função chi-quadrado (χ^2).

III.4.1.4 Estudos dos estados tripletes por fotólise por pulso de laser

Os estados excitados tripletes dos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico (etanol) foram estudados e gerados por fotólise por pulso de laser.

As soluções de trabalho foram preparadas de maneira a apresentarem uma absorção igual a 0,3 no comprimento de onda de excitação da amostra (355nm).

Os experimentos foram realizados utilizando-se como fonte de excitação o terceiro harmônico (355 nm) do laser de Nd-YAG modelo SURELITE I-10 da Continuum., como descrito anteriormente na sessão III.3.

O comprimento de onda utilizado para monitoramento da absorção máxima do transiente gerado e para a determinação do tempo de vida triplete do mesmo foi de 460 nm. A escala de tempo foi ajustada de modo a registrar o decaimento de espécies com tempos de vida entre 2 μs e 5 μs .

Como resposta do sistema de laser computadorizado, foi obtido um gráfico de decaimento experimental, ou seja, da variação da densidade óptica em função do tempo, bem como a curva teórica que melhor simulava o decaimento observado.

III.4.1.5 Estudos para a determinação do rendimento quântico de produção do oxigênio singlete (Φ_{Δ}) da ZnC_4P e da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico.

A determinação do rendimento quântico de produção do oxigênio singlete (Φ_{Δ}) pode ser realizada por 2 métodos, diretos e indiretos. Os métodos diretos envolvem as medidas resolvidas no tempo. Por outro lado, os métodos indiretos se baseiam em medidas de consumo de um substrato oxidável, realizadas no estado estacionário (Corey , Mehrotra e Khan, 1987). Embora a fosforescência do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) seja muito baixa na maioria dos solventes, o emprego de detectores de alta sensibilidade, algumas vezes resfriados a 77K, tem tornado possível a sua detecção direta. Um exemplo disso é a utilização de fotodiodos de germânio, de alta resolução, acoplados a amplificadores operacionais capazes de captar sinais da ordem de microsegundos ou menos. Isso permite com que o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ (τ_{Δ}) em muitos solventes seja medido com precisão através do seu decaimento na região do infravermelho próximo.

Analizou-se a eficiência quântica de geração de $^1\text{O}_2$ para os FS 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 (Φ_{Δ} = 0,59)(Arbogast, 1991). Na detecção do ϕ_{Δ} utilizou-se o método fotofísico, que consiste no monitoramento da intensidade de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ em

1270nm , 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 ϕ_{Δ} produzido pela ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico foi de 30 mJ por pulso. A intensidade máxima de fosforescência no tempo $t=0$ foi determinada pelo método relativo com base na equação 4, conforme descrito por Arbogast (Arbogast, 1991).

$$\Phi_{\Delta} = \frac{I}{I_{Ref}} * \Phi_{\Delta Ref} * \frac{\tau_{\Delta Ref}}{\tau_{\Delta}}$$

Equação 2

na qual I_{ref} é a intensidade de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ produzido pelo composto padrão, I é a intensidade de emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ produzido pela amostra, $\Phi_{\Delta ref}$ é o rendimento quântico de produção de $^1\text{O}_2$ produzido pela referência, $\tau_{\Delta ref}$ é o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ produzido pela referência e τ_{Δ} é o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ produzido pela amostra.

III.4.1.6 Determinação do Rendimento Quântico de Formação do Estado Triplete dos fármacos fotossensibilizadores H₂C₄P, ZnC₄P.

O rendimento quântico do estado triplete (Φ_T) foi estudado por flash fotólise (Ermolenko, Delaire e Giannotti, 1997) para os fármacos fotossensibilizadores H₂C₄P, ZnC₄P em solução etanólica. Os experimentos foram realizados utilizando-se como fonte de excitação no terceiro harmônico (355 nm) do laser de Nd-YAG modelo SURELITE I-10 da Continuum, descrito no item III.3.

Para ambos os fármacos fotossensibilizadores, o Φ_T foi determinado relativamente ao padrão TPP ($\Phi_T = 0,8$, $\Delta\epsilon_T = 35000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 450 nm em tolueno) (Dupuis et al., 1999); (Ermolenko, Delaire e Giannotti, 1997).

No procedimento experimental, as concentrações das amostras e do padrão foram ajustadas de modo que a absorvância fosse de 0,3 no comprimento de onda de excitação (355 nm), e as soluções dos fármacos foram desaeradas pelo borbulhamento de nitrogênio durante 30 minutos. O borbulhamento do nitrogênio é necessário porque o oxigênio molecular pode atuar como um supressor do estado excitado triplete. Então, os espectros de absorção do transiente foram determinados ponto a ponto no intervalo entre 300 e 800 nm. O espectro de absorção do transiente obtido para cada fármaco foi, então, corrigido para a obtenção do espectro real do transiente, através da equação 3:

$$\Delta A(t) = A_T + \alpha A_F$$

Equação 3

em que A_T é a absorção triplete, A_F é a absorção no estado fundamental e α refere-se à fração de espécies excitadas no estado triplete. O valor de α é tal que, quando introduzido na Equação 2, observa-se a supressão das absorbâncias negativas observadas nas faixas de comprimento de onda equivalentes às bandas de absorção no estado fundamental do fármaco. O novo espectro de absorção obtido é conhecido como espectro de absorção real do transiente. O conhecimento do α é fundamental para o cálculo da absortividade molar do estado triplete (ϵ_T) do fármaco (utilizado no cálculo de Φ_T), que faz uso da equação 4:

$$\frac{\epsilon_T(\lambda)}{\epsilon_F(\lambda)} = \frac{A_T(\lambda)}{\alpha A_F(\lambda)}$$

Equação 4

em que ϵ_F é o coeficiente de absortividade molar no estado fundamental num comprimento de onda (λ).

O rendimento quântico de formação do estado triplete para os fármacos foi estimado registrando-se os decaimentos das espécies triplete geradas como uma função da energia de excitação (5, 7, 10, 15 e 50 mJ) e determinando-se a intensidade máxima de absorção do transiente. O comprimento de onda utilizado para monitoramento da absorção máxima do transiente gerado e para a determinação do tempo de vida triplete do mesmo foi de 460 nm. A escala de

tempo foi ajustada de modo a registrar o decaimento de espécies com tempos de vida entre 2 μ s e 5 μ s.

O gráfico de absorbância triplete como função da energia é linear e a inclinação da reta obtida (ΔA) é uma função do produto entre o ϵ_T e o Φ_T :

$$\Delta A = \epsilon_T \times \Phi_T \quad \text{Equação 5}$$

Então, o rendimento quântico de formação do estado triplete para as amostras pode ser estimado relacionando-se o seu valor obtido de ΔA com aquele obtido para o padrão (Dupuis et al., 1999). O rendimento quântico triplete foi então determinado através da seguinte equação 6 (Amand e Bensasson, 1975):

$$\frac{\Delta A_{\text{amostra}}}{\Delta A_{\text{padrão}}} = \frac{\Phi_{T_amostra} (\epsilon_T - \epsilon_F)_{\text{amostra}}}{\Phi_{T_padrão} (\epsilon_T - \epsilon_F)_{\text{padrão}}} \quad \text{Equação 6}$$

III.4.1.7 Preparação da ZnC_4P , da H_2C_4P e da $ZnPc$ concomitante ao éter de coroa em meio lipossomal.

Os fármacos ZnC_4P , H_2C_4P e $ZnPc$ foram incorporados aos lipossomas L- α -dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC 0,70 mM) e foram preparados pelo método de injeção conforme descrito por Nunes e colaboradores (Nunes , Sguilla e Tedesco, 2004b).

Uma solução etanólica de 0,300 mL contendo 93.3 mM de L- α -fosfatidilcolina, 0.19 mM lisofosfatidilcolina e 80 μ M do fármaco em estudo foi injetada por uma bomba peristáltica de adição controlada sobre uma solução tampão Hank's pH 7,4 contida numa jaqueta termostatzada (volume final de 4,0 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 injeção foi realizada a 57°C sob agitação magnética na ausência de luz e com uma velocidade de 1,0 μ L/s (360 μ L/h).

Figura 11. Figura esquemática da preparação dos lipossomas.

A concentração das porfirinas em meio lipossomal foi estimada espectroscopicamente usando os respectivos coeficientes de absorvidade $\epsilon = 1.23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para ZnC_4P , $\epsilon = 1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio etanólico, de $\epsilon = 2,41 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para ZnPc em DMSO/DMF. O espectro de absorbância e o espectro de fluorescência foram obtidos através do espectrofotômetro Hitachi U-

3000 e do Spex Fluorog 3 (Jobin-Ivon) respectivamente, a 25°C e sob agitação magnética.

Paralelamente, foram preparados lipossomas vazios (sem adição de corante) com o objetivo de usá-los como referência nos estudos espectroscópicos. Após cada preparação lipossomal, foi registrado o espectro de absorção do fármaco fotossensibilizador incorporado ao lipossoma a fim de se verificar a eficiência da incorporação e a ausência de formação de agregados superiores. Além da determinação de seus parâmetros fotofísicos, a ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e ZnPc incorporadas aos lipossomas também foram caracterizadas de acordo com o tamanho das vesículas. O diâmetro médio das partículas foi calculado com base em medidas de espalhamento de luz.

III.4.1.8 Estudos do tamanho de partícula e Potencial Zeta da ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e ZnPc e 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 em meio lipossomal.

Realizamos um estudo do tamanho das partículas lipossomais formadas e do potencial Zeta, com o intuito de averiguar a estabilidade físico-química e a viabilidade destas preparações quanto à homogeneidade no tamanho das partículas, bem como a influências dos agentes formadores dos sistemas (ZnPc , 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6, DPPC, lisofosfatidilcolina); (ZnC_4P , DPPC, lisofosfatidilcolina); ($\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, DPPC e lisofosfatidilcolina) em suas propriedades físico-químicas.

A intensidade, a polarização e a distribuição angular da luz espalhada por uma dispersão coloidal dependem do tamanho e da forma das partículas que provocam o espalhamento, das interações entre essas partículas e das diferenças entre os índices de refração das partículas e do meio. Assim, medidas de espalhamento de luz podem ser de grande valor na determinação do tamanho e da forma das partículas.

A amplitude total da luz espalhada por uma partícula é proporcional ao número de fontes individuais de espalhamento existentes na partícula, isto é, proporcional ao seu volume (tamanho) e também à massa. Assim, através de medidas de espalhamento de luz pode-se determinar o tamanho das partículas e a distribuição de tamanhos na solução lipossomal.

Também determinamos o tamanho das partículas coloidais para os sistemas com presença do fármaco fotossensibilizador H_2C_4P e ZnC_4P .

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 7.

$$G(\tau) = A [1 + B \exp(-2\Gamma\tau)] \quad \text{Equação 7}$$

Onde **A** é a linha de base, **B** é o intercepto para a função de correlação, $\Gamma = Dq^2$, sendo **D** o coeficiente de difusão translacional, $q = (4 \pi n / \lambda_0) \sin(\theta / 2)$, sendo **n** o índice de refração da solução, λ_0 , o comprimento de onda do laser, θ , o

ângulo da luz espalhada e τ , 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.

As partículas que compõem uma solução adquirem uma carga em contato com um líquido que adquire uma carga elétrica em sua superfície. Essa carga pode aparecer de várias maneiras - a dissociação de grupos iônicos na superfície da partícula e a adsorção diferencial de íons da solução na superfície da partícula.

A carga líquida na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na sua vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido.

Essa dupla camada divide-se em duas regiões: uma região interna que inclui íons fortemente ligados à superfície e uma região exterior onde a distribuição dos íons é determinada pelo equilíbrio entre forças eletrostáticas e movimento térmico.

Dessa forma, o potencial nessa região decai com o aumento da distância da superfície até uma distância suficientemente grande atingir o potencial da solução. Esse potencial é convencionado como potencial zero.

Em um campo elétrico, como em microeletroforese, cada partícula e os íons mais fortemente ligados à mesma se movem como uma unidade, e o potencial no

plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado de potencial zeta.

O potencial zeta se dá em função da carga superficial da partícula de qualquer camada adsorvida na interface com o meio, e da natureza e composição do meio que a circunda.

Esse potencial pode ser determinado experimentalmente e, como reflete a carga efetiva nas partículas, ele se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão.

O potencial zeta é um indicador útil dessa carga e pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de soluções, suspensões ou emulsões. Quanto maior o potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação.

O potencial zeta foi medido pelo mesmo equipamento utilizado no experimento de espalhamento dinâmico da luz. O Zetasizer Nano Series utiliza uma combinação de velocimetria de laser Doppler e análise de fase do espalhamento de luz (PALS), ou seja, utiliza um laser modulado e mede o deslocamento doppler na luz espalhada pelas partículas. Esta técnica está patenteada como M3-PALS, a qual mede a mobilidade eletroforética da partícula. O equipamento realiza em média vinte e duas medidas para cada amostra analisada.

Como o potencial zeta não pode ser medido diretamente, usa-se algum tipo de medida indireta, a partir da qual se calcula o potencial zeta. A técnica mais usada e mais aceita é através da mobilidade eletroforética, na qual introduz-se uma suspensão coloidal diluída em uma cuba com dois eletrodos e aplica-se um potencial elétrico à suspensão. As partículas com carga elétrica líquida se movimentarão em direção ao eletrodo de carga contrária, tão mais rapidamente quanto maior a sua carga elétrica e maior o campo elétrico aplicado.

O quociente da velocidade de deslocamento pelo campo elétrico chama-se mobilidade eletroforética, a qual pode ser expressa por em $\text{m}^2/\text{V.s}$.

Esse valor entra na equação (as equações mais usadas são as aproximações de Smoluchowski ou a de Debye) para calcular o potencial zeta.

Para constatar a influência do sal na estabilidade do lipossoma, foram realizados estudos onde pequenas alíquotas de NaCl foram adicionadas à solução lipossomal, resultando em uma variação da concentração de sal de 0 à 180 mM. Após cada adição, foram calculados novamente o diâmetro médio das partículas com base em medidas de espalhamento de luz. Posteriormente, repetimos o mesmo procedimento para o sal KCl.

III.4.2 Estudos envolvendo células neoplásicas

III.4.2.1.a Crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas J774-

A.1

As matrizes de células J774-A.1 ($0,5 \times 10^6$ células/mL) estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas a 37°C e adicionadas em placas de cultura (Corning Incorporated, estéril, 100 mm x 20 mm) contendo 20,0 mL do meio completo (DMEM). As placas de cultura foram colocadas em uma incubadora a 37°C com 5,0 % de CO₂ durante 48 horas.

Após este período, as células ficaram confluentes. Realizou-se então a primeira repicagem de células. Como as células crescem aderidas nas placas de cultura, foi necessária a utilização de rodilhos para soltá-las. Assim, o meio contendo as células foi adicionado em um tubo falcon e centrifugado a 25°C com rotação constante de 5000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso com 10,0 mL de meio completo; as células foram, então, distribuídas em duas placas de cultura.

A troca de meio destas células foi realizada sempre que necessário. Quando o número médio de células atingia $1,5 \times 10^6$ células/mL, ou preparava-se uma nova subcultura de células ($0,5 \times 10^6$ células/mL) ou congelavam-se as mesmas.

III.4.2.1.b Congelamento das células J774-A.1

No processo de congelamento, as células foram lavadas com Hank's e soltas com o rodilho. O meio contendo as células foi transferido para um tubo falcon, o qual foi centrifugado com rotação de 5000 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 500 µL de soro bovino fetal, sendo transferidas para um tubo criogênico previamente resfriado em uma caixa de congelamento contendo isopropanol. Em seguida foram adicionados ao tubo criogênico 500 µL de uma solução de soro bovino fetal e DMSO (80/20) numa proporção final de 1:1v/v.

O tubo criogênico foi levado imediatamente ao freezer a -80 °C por 24 horas e então armazenado em nitrogênio líquido.

III.4.2.1.c Diagrama de crescimento da cultura celular

Quando se inicia um trabalho com cultura de células, é usual que se determine o diagrama de crescimento das mesmas, pois este procedimento é um controle básico que permite a detecção do tempo ideal para que a cultura de células alcance a fase logarítmica de crescimento, considerada ideal para a execução da maioria dos experimentos, uma vez que nesta fase, as células estão em plena atividade, salvo contaminação externa.

Dez placas de cultura celular de J774-A1 foram preparadas com concentrações iniciais iguais, de $0,5 \times 10^6$ células/mL e incubadas a 37°C, 5%

CO₂. A cada 12 horas, a concentração celular de uma das placas foi determinada, através da câmara de Neubauer (0,0025 mm² e 0,100 mm de profundidade).

III.4.2.1.d Controle da integridade da membrana celular.

Quando se trabalha com cultura de células, costuma-se analisar a integridade da membrana celular e o controle da mesma. Este controle é feito tanto para avaliar o número médio de células presente na cultura, como também para avaliar o número de células com rompimento de membrana plasmática. Para tal, utiliza-se o 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 sanidade das culturas celulares (Freshney, 1986).

O azul de tripan é uma molécula colorida de grande peso molecular que só é capaz de entrar em células que tenham a membrana alterada ou rompida. Portanto, a célula viva em perfeito estado será observada incolor ao microscópio, ao passo que uma célula morta terá a coloração azul. Deste modo, pode-se determinar a viabilidade celular através da câmara de Neubauer.

Sendo assim, em um tubo de 1,5 mL foram colocados 90 µL de tampão Hank's, 90 µL de solução de azul de tripan (0,4% m/v) e 20 µL da suspensão de células. A mistura foi agitada, e após dois minutos com a ajuda da câmara de Neubauer, fez-se a contagem das células e calculou-se a viabilidade celular.

Um outro método para avaliar a atividade celular é o método do uso do corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) ou MTT. Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células com função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

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 dissolvidos em isopropanol acidificado. O produto obtido é monitorado espectrofotometricamente. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazan formado, indicando assim o grau de citotoxicidade (Mosmann, 1983; Vistica et al., 1991).

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 as células na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não deve exceder $1,0 \times 10^6$ células/mL. Cada teste deve incluir um branco contendo meio completo sem nenhum fármaco.

Inicialmente, as células foram removidas da incubadora, sendo levadas à capela de fluxo laminar e distribuídas nas placas de poços múltiplos (96 poços). À 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 CO₂ e os cristais de formazam resultantes foram dissolvidos pela adição de isopropanol.

O teste é finalizado através de medidas espectrofotométricas da absorbância no comprimento de onda de 570 nm, descontando-se a absorbância de fundo a 690 nm (Freshney, 1986; Mosmann, 1983). Estas medidas foram obtidas por um sistema de leitura de microplacas (ELISA) da Molecular Device modelo Versa Max.

III.4.2.2 Definição de parâmetros para os estudos de fototoxicidade.

III.4.2.2.1 Toxicidade dos fármacos ZnC₄P e H₂C₄P em meio homogêneo e micro heterogêneo na linhagem de células J774-A.1 em meio fisiológico Hank's.

Uma suspensão de $0,5 \times 10^6$ células/mL da linhagem J774-A.1 foi preparada a partir da re-suspensão das células das placas de petri em tampão Hank's para o experimento de toxicidade no escuro.

Após essa etapa, as células foram incubadas em placas de poços múltiplos (96 poços) com 200 µL por poço de meio completo. Depois de 24 horas o meio foi retirado, as células foram lavadas com 200 µL de tampão Hank's e logo em seguida à retirada do tampão, foram adicionados 100 µL da solução do fármaco nas concentrações desejadas. Depois de meia hora de incubação, com ausência total de luz, retirou-se a solução do fármaco, lavou-se novamente com 200 µL de

Hank's, adicionou-se meio DMEM completo e deixou-se por 24 horas. Após este período o meio foi retirado, as células foram lavadas com 200 μ L de Hank's e foram adicionados 50 μ L da solução de MTT 1mg/mL. As células foram incubadas por mais 4 horas e 200 μ L de isopropanol foram acrescentados para completa solubilização do formazan.

O experimento na ausência de irradiação foi realizado utilizando-se o fármaco fotossensibilizador ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio homogêneo (descrito no item III.2) e micro heterogêneo (suspensão lipossomal).

III.4.2.2.1.a Avaliação do tempo de incubação para o fármaco fotossensibilizador ZnC_4P em meio lipossomal e na presença de tampão Hank's, (estudo preliminar).

Uma suspensão de $0,5 \times 10^6$ células/mL da linhagem J774-A.1 foi preparada a partir da suspensão das células das placas de petri em meio de cultura completo, como descrito anteriormente na sessão III.4.2.1. Essas suspensões foram, então, transferidas para placas de petri de 60 mm x 15 mm e incubadas até atingirem confluência. Este procedimento foi adotado como padrão para a preparação da cultura celular utilizada em todos os experimentos *in vitro*. Em seguida, as células foram incubadas com uma solução 4 μ M de ZnC_4P em meio homogêneo em Hank's, e em meio micro heterogêneo (lipossomal) por 0,5; 1; 3; 5; 7; 21 e 24 horas.

Após cada tempo de incubação, este meio contendo o fotossensibilizador em estudo foi retirado, as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de Hank's e soltas das placas. Estas suspensões foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas com velocidade de 5000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pelet foi re-suspenso em etanol, submetido a uma agitação vigorosa em um sistema vortex e novamente centrifugado.

A solução sobrenadante foi colocada em uma cubeta de quartzo e foram realizadas medidas de emissão de fluorescência e de absorção da ZnC_4P que estava contida no interior das células. A determinação do espectro de emissão de fluorescência da ZnC_4P foi registrada de 550 a 750 nm, utilizando-se o comprimento de excitação em 428 nm.

III.4.2.2.2 Viabilidade celular dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ nos diferentes meios fisiológicos.

Nos estudos de citotoxicidade, foram avaliados os seguintes meios fisiológicos: meio de cultura DMEM sem soro bovino fetal (SBF), e na presença do SBF a 3% e 10%. Depois de 7 e 24 horas de incubação, as soluções foram retiradas, lavadas novamente com Hank's e soltas com rodinho.

Estas suspensões de células foram, então, transferidas para um tubo falcon e centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células foram suspensas em meio DMEM com 10% de soro. As suspensões foram, em

seguida, transferidas para as placas de poços múltiplos (96 poços) com 200 µL por poço de meio completo. Depois de 24 horas foi realizado o teste do MTT.

III.4.2.2.3 Efeito do SBF na incorporação dos fármacos fotossensibilizadores H₂C₄P, ZnC₄P e TPP em células neoplásicas J774-A.1.

Seguindo o protocolo padrão, descrito na sessão III.4.9.1, as células J774-A-1 foram então incubadas com os fármacos fotossensibilizadores TPP, ZnC₄P, H₂C₄P a 4 µM em meio homogêneo e micro heterogêneo do fotossensibilizador em estudo por 7 horas em DMEM na ausência e presença do soro bovino fetal a 3% e 10%.

Após esse período, o meio contendo os fármacos fotossensibilizadores, foram retirados, as células foram lavadas duas vezes com 2 mL de Hank's e soltas das placas com a ajuda do rodilho. Estas suspensões foram transferidas para tubos falcon e centrifugadas com velocidade de 5000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pelet foi resuspenso em etanol, submetido a uma agitação vigorosa em um sistema vortex e novamente centrifugado.

A determinação do espectro de emissão de fluorescência dos fármacos fotossensibilizadores foi registrada de 550 a 750 nm, utilizando-se os seguintes comprimentos de excitação: 424 nm para H₂C₄P, 428 nm para ZnC₄P, e 418 nm para TPP.

III.4.2.2.4 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos fotossensibilizadores H_2C_4P , ZnC_4P e TPP por espectrofluorimetria.

Com a necessidade de se desenvolver uma metodologia para quantificação dos fármacos fotossensibilizadores incorporados pelas células, foi desenvolvido um protocolo experimental para determinação de uma curva padrão de calibração.

Inicialmente preparou-se uma solução estoque da ZnC_4P , H_2C_4P e TPP em DMSO (conforme descrita no item III.2). Em uma cubeta de quartzo preparou-se por diluições infinitas um conjunto de amostras no intervalo de concentração de 0,01 a 2,00 μM do fármaco em solução etanólica para construção da curva padrão de calibração. Traçaram-se, então, os espectros de emissão na faixa de concentração com excitação fixa em 428 nm para ZnC_4P , 424 nm para H_2C_4P e 418 nm para TPP.

Foram utilizados os conjuntos de fendas de excitação e emissão mais adequados, traçando-se uma curva de calibração adequada para cada condição experimental.

As concentrações do fotossensibilizador foram determinadas por extrapolação, utilizando-se a equação obtida por regressão linear da curva padrão de calibração.

III.4.2.2.5 Cinética de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores ZnC₄P, H₂C₄P e TPP no meio de cultura ideal (DMEM com 10% de serum).

No estudo de cinética de incorporação dos fármacos, a linhagem de célula J774-A.1, após atingir confluência, foi incubada com uma solução 4 µM de H₂C₄P, ZnC₄P e TPP (meio homogêneo) em meio de cultura com 10% de soro bovino fetal, por 1; 3; 5; 7; 9; 21 e 24 horas.

Após cada tempo de incubação, o fármaco fotossensibilizador foi liberado das células pelo mesmo método descrito no item III.4.2.2.3.

A solução sobrenadante foi colocada em uma cubeta de quartzo para ser realizada a medida de emissão de fluorescência da H₂C₄P, ZnC₄P e TPP que estava contida no interior das células. A determinação do espectro de emissão de fluorescência foi registrada de 550 a 750 nm, utilizando-se os seguintes comprimentos de excitação: 424 para H₂C₄P, 428 para ZnC₄P, e 418 para TPP.

III.4.2.3 Estudos Fotobiológicos.

III.4.2.3.1 Avaliação da fototoxicidade dos fármacos fotossensibilizadores H₂C₄P, ZnC₄P e TPP em células neoplásicas da linhagem J774-A.1.

No estudo de fototoxicidade, foi avaliado o efeito da luz sob a linhagem de células J774-A1 na presença da solução do fármaco fotossensível H₂C₄P, ZnC₄P e TPP, estoque em DMSO. Neste experimento, uma suspensão de 0,5 x 10⁶

células/mL da linhagem J774-A.1 foi preparada a partir da suspensão das células das placas de petri em meio de cultura completo, método descrito no item III.4.2.1.a. Estas suspensões foram, então, transferidas para placas multi-poços e incubadas até atingirem confluência. Este procedimento foi adotado como padrão para a preparação da cultura celular utilizada em todos os experimentos *in vitro*.

A concentração do composto fotossensível foi mantida fixa em 4 μM e as células com aproximadamente 1×10^6 células/mL foram incubadas em meio DMEM com 10% de soro bovino fetal, por um intervalo de tempo de 7 horas a 37°C e uma estufa de CO₂. Em seguida, foi descartado o meio de cultura contendo os fotossensibilizadores e as células foram lavadas duas vezes com 0,5 mL de tampão Hank's. Adicionou-se então 2 mL de meio Hank's e as células foram irradiadas.

A cultura celular foi submetida a diferentes intensidades de irradiação, 1 J/cm⁻², 3 J/cm⁻² e 5 J/cm⁻². Como fonte de irradiação, utilizou-se um sistema fotopolimerizador da Dabi-Atlante acoplado a um filtro óptico específico que permite a transmissão de uma faixa selecionada de comprimento de onda, 400 a 500 nm.

Após a irradiação, a solução Hank's foi removida, sendo adicionado meio DMEM completo, e as células foram levadas à estufa de CO₂ por um período de 24 horas.

Após este intervalo, foi realizado o ensaio do MTT para a avaliação da viabilidade celular. Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando-se o teste t de Students (ANOVA, $P < 0,05$).

III.4.2.3.2 Avaliação da fototoxicidade dos fármacos fotossensibilizadores em meio lipossomal.

Neste estudo de fototoxicidade, foi avaliado o efeito da luz sob a linhagem de células J774-A1 na presença da solução do fármaco fotossensível $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, ZnC_4P em meio lipossomal.

As células J774-A-1 foram incubadas com os fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio lipossomal em DMEM com SBF a 10%, por 7 horas, a 37°C e em uma estufa de CO_2 . A concentração final atingida do fotossensibilizador em meio lipossomal nesta solução foi de $1\mu\text{M}$.

Após o período de incubação, o meio contendo os fármacos fotossensibilizadores, foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com 0,5 mL de Hank's. Adicionou-se então 2 mL de meio Hank's e as células foram irradiadas. A cultura celular foi então submetida a diferentes intensidades de irradiação, 1 J/cm^{-2} , 3 J/cm^{-2} e 5 J/cm^{-2} . Como fonte de irradiação, utilizou-se novamente um sistema foto-polimerizador da Dabi-Atlante acoplado a um filtro óptico específico que permite a transmissão de uma faixa selecionada de comprimento de onda, 400 a 500 nm.

A solução Hank's foi então removida, sendo adicionado meio DMEM completo, e as células foram levadas à estufa de CO_2 por um período de 24 horas.

Após este período, foi realizado o ensaio do MTT para a avaliação da viabilidade celular.

Os resultados encontrados através da leitura do MTT pela leitura multi-placa Safira Tecan foram analisados através do Students t-test (ANOVA), com o programa GraphPad Prism. Para indicar a diferença significativa entre os grupos, foi considerado o intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

III.4.2.4. Estudos da influência do éter de coroa na membrana plasmática.

III.4.2.4.1 Estudos com a sonda fluorescente bis(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C2, durante processo de hiperpolarização.

O procedimento seguido para a medida do potencial de membrana foi similar ao protocolo usado por Rink(Rink et al., 2005), onde nós observamos o comportamento da sonda na presença de íons sódio, potássio e monesin sobre as células J774-A.1 previamente incubadas ou não com o fármaco fotossensibilizador $ZnCl_2$. Três mililitros de uma suspensão de células em Hank's (10^6 células/ml) foram adicionados a uma cubeta de quartzo de fluorescência com 1.0 cm com agitação magnética. A concentração final de $1\mu M$ de di-SBA-C₂ foi alcançada pela adição de 1 μL de uma solução estoque de 3 mM em DMSO na cubeta.

A cubeta foi colocada no espectrofluorímetro SPEX Fluorog, equipado com um controlador de temperatura, mantida a 37°C.

As células ficaram incubadas na cubeta por vinte minutos e mantidas no fluorímetro com agitação ocasional. O espectro de fluorescência da sonda em

solução foi registrado com excitação fixa em 500 nm e a emissão inicial de fluorescência registrada na faixa de 530 a 640 nm.

As células foram então tratadas como descrito abaixo e a mudança no sinal foi registrada quando o sinal de fluorescência estacionário foi obtido.

Para os experimentos com NaCl, as células foram utilizadas, inicialmente, sem tratamento prévio com o fotossensibilizador ZnC₄P e foram incubadas com di-SBA-C₂, como descrito acima. Em seguida, alíquotas de NaCl de concentração 3 M foram adicionadas às células em suspensão para a hiperpolarização.

Nos estudos do efeito do fotossensibilizador ZnC₄P sobre as células, estas foram incubadas com o fotossensibilizador ZnC₄P (4 µM) por 4 horas e em seguida incubadas com di-SBA-C₂, como descrito acima. Então, alíquotas de NaCl de concentração 3 M foram adicionadas à suspensão de células para a hiperpolarização, e novamente o espectro de fluorescência foi registrado após a adição.

Nos estudos com o antibiótico Monesin, foi adicionado 1 µL do antibiótico (3mM em DMSO) na suspensão celular incubada com di-SBA-C₂, para despolarização das células.

Nos estudos com KCl, foi realizado o mesmo procedimento para os estudos com NaCl sem tratamento prévio das células com o fármaco fotossensibilizador ZnC₄P.

III.4.2.4.2 Estudos com a sonda fluorescente bis(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C₂, durante processo de despolarização.

O procedimento seguido para a medida do potencial de membrana foi similar ao protocolo usado por Rink et al (Rink et al., 2005), onde nós observamos o comportamento da sonda na presença de NaCl, KCl e o antibiótico monesin sobre as células J774-A.1 previamente incubadas ou não com o fármaco fotossensibilizador ZnPC e éter de coroa em meio lipossomal. Três mililitros de uma suspensão de células em Hank's (10⁶ células/ml) foram adicionados a uma cubeta de quartzo de fluorescência com 1.0 cm com agitação magnética. A concentração final de 0,5 µM de di-SBA-C₂ foi alcançada pela adição de 1,5 µL de uma solução estoque de 1 mM em DMSO na cubeta.

A cubeta foi colocada no espectrofluorímetro modelo 4500 da Hitach, equipado com um controlador de temperatura e mantida a 37°C.

As células ficaram incubadas na cubeta por vinte minutos e foram mantidas no fluorímetro com agitação ocasional. O espectro de fluorescência da sonda em solução foi registrado com excitação fixa em 500 nm e a emissão inicial de fluorescência registrada na faixa de 530 a 640 nm.

As células foram então tratadas como descrito abaixo e a mudança no sinal foi registrada quando o sinal de fluorescência estacionário foi obtido para cada experimento descrito abaixo.

Para os experimentos com KCl, as células foram utilizadas, inicialmente, sem tratamento prévio com o éter de coroa e o fotossensibilizador ZnPC e foram

incubadas com di-SBA-C₂, como descrito acima. Em seguida alíquotas de 30 µL de KCl de concentração 3 M foram adicionadas às células em suspensão para a despolarização.

Nos estudos do efeito do éter de coroa sobre as células, estas foram incubadas com o éter de coroa em meio lipossomal de forma que a concentração final alcançada fosse de 16 µM, por um período de 4 horas, em seguida foram incubadas com di-SBA-C₂, como descrito acima. Então, alíquotas de KCl de concentração 3 molar foram adicionadas à suspensão de células para a despolarização, e novamente o espectro de fluorescência foi registrado após cada adição.

Em um terceiro estudo verificamos o efeito do fotossensibilizador ZnPc e éter de coroa em meio lipossomal sobre as células. Estas foram incubadas com o fotossensibilizador ZnPc (4 µM), mais o éter de coroa (16 µM), por um período de 4 horas e em seguida incubadas com di-SBA-C₂, como descrito acima. Então, alíquotas de KCl de concentração 3 M foram adicionadas à suspensão de células para a despolarização, e novamente o espectro de fluorescência foi registrado após cada adição.

Nos estudos realizados com o antibiótico Monesin, as células foram utilizadas, inicialmente, sem tratamento prévio com o monesin, e foram incubadas com di-SBA-C₂, como descrito acima. Então, foi registrado o sinal de fluorescência estacionário e em seguida adicionou-se 1 µL do antibiótico (3 mM

em DMSO) na suspensão celular incubada com di-SBA-C₂, para despolarização das células, e novamente foi registrado o sinal de fluorescência.

III.4.2.4.2.a Calibração da sonda de resposta lenta bis(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C₂.

Uma vez conhecido o mecanismo de resposta da sonda fluorescente que promove um simples caminho para monitorar o potencial de membrana qualitativamente, torna-se necessário calibrar sua resposta em unidades de milivolts.

Um método de referência seguro é requerido para a avaliação do potencial de membrana. No entanto, não existe uma curva de calibração universal, pois a resposta da sonda é fortemente dependente do protocolo experimental.

A porcentagem da variação de fluorescência para cada experimento foi determinada pela seguinte equação 8 (Specht e Rodgers, 1990b):

$$\% \Delta F = (F_{\text{tratado}} - F_{\text{inicial}} \cdot 100) / F_{\text{inicial}} \quad \textbf{Equação 8}$$

Os resultados foram então normalizados, onde a maior variação de fluorescência (ΔF) foi para a despolarização final, alcançada por adição de alíquotas crescentes de KCl (3 mM) até alcançar a concentração final de 140 mM. Após a normalização, a porcentagem de mudança no potencial de membrana foi dado pela equação 9 (Specht e Rodgers, 1990b):

$$\% \Delta \Psi = (F_{\text{tratado}} - F_{\text{inicial}} \cdot 100) / (F_{\text{final}} - F_{\text{inicial}})$$

Equação 9

Células previamente incubadas com éter de coroa (16 μM) em meio lipossomal, e incubadas com éter de coroa na presença do fármaco fotossensibilizador ZnPc (4 μM) em meio lipossomal, seguiram o mesmo protocolo descrito acima para a avaliação da influência do éter de coroa no processo de despolarização da membrana plasmática pelos íons potássio.

IV. Resultados e Discussões:

Este trabalho se baseia na utilização combinada da Terapia Fotodinâmica (TFD) com a ação sinérgica do éter de coroa que, por sua vez, pode alterar o sistema homeostático pela formação de nanotubos na membrana plasmática. Esse sinergismo pode potencializar o efeito terapêutico no tratamento de células neoplásicas.

Para estudar a influência do éter de coroa, foi necessário observar sua ação no processo de hiperpolarização e despolarização, utilizando para isso uma sonda de resposta lenta, específica para membrana plasmática.

Para realizar este estudo utilizamos porfirinas ligadas covalentemente ao éter de coroa específico para íons sódio. Sendo assim, pode-se observar a influência do éter de coroa no processo de hiperpolarização.

No entanto, dentro da proposta inicial, não foi possível obter um fármaco fotossensibilizador ligado covalentemente ao éter de coroa específico para íons potássio por problemas sintéticos. Este estudo foi desenvolvido com o auxílio de um sistema de liberação combinado do tipo lipossomal contendo agentes ativos na TFD e o éter de coroa específico para íons potássio.

O agente ativo na TFD escolhido foi a zinco ftalocianina (ZnPc), considerada como um FS clássico de segunda geração. Este fármaco fotossensibilizador apresenta alta estabilidade e pureza, além de possuir suas propriedades espectrais diferenciadas, com uma intensa absorção de luz na região

do vermelho do espectro eletromagnético. Já o éter de coroa escolhido foi o 18-crown-6, que é específico para íons potássio. Pelo fato do éter de coroa conferir aos fotossensibilizadores um maior caráter anfifílico, e por estes apresentarem uma boa afinidade pelos tecidos tumorais, foram realizados estudos comparativos aos sistemas anteriormente descritos com a TPP, avaliando-se cinética de incorporação em linhagem de células J774-A.1. A TPP é uma porfirina hidrofóbica e clássica nos estudos desta natureza. Também foram realizados estudos comparativos de fototoxicidade.

Sendo assim, foi realizada inicialmente a caracterização espectroscópica da ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico. Em seguida, foram preparadas soluções lipossomais destas porfirinas e também da TPP e da ftalocianina da ZnPC , para os estudos comparativos de incorporação, fototoxicidade e os estudos referentes à alteração da homeostase pela presença dos ligantes éter de coroa.

IV.1. Estudos espectroscópicos

IV.1.1. Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ZnC_4P e da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico.

A escolha adequada do FS deve ser baseada na investigação dos parâmetros fotofísicos em solução homogênea e nos referidos sistemas micro-heterogêneos. A emissão de fluorescência do FS é um parâmetro fundamental nas determinações da ação fotodinâmica deste, uma vez que um FS eficiente deve apresentar um tempo

de vida singlete pequeno (da ordem de 100 ps a 10 ns), porém suficientemente longo para permitir a visualização, localização e delineação da lesão maligna.

Na primeira etapa do trabalho, foram realizados estudos espectroscópicos no estado fundamental (espectroscopia de absorção e de emissão de fluorescência no estado estacionário) da ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, TFPP em etanol, procedimento descrito no item III.4.1.1.

O espectro de absorção da ZnC_4P e da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio etanólico é característico de espécies não agregadas (de 5 a 20 μM) (Figura 12). Os espectros foram interpretados nos termos da nomenclatura de Gouterman (Gouterman, 1978).

Figura 12. Espectro de absorção normalizado da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (6 μM em etanol -----) e ZnC_4P (6 μM em etanol —). O inserto apresenta a expansão da região espectral

que representa as bandas Q (500 a 800 nm) para uma solução 15 μM em etanol de ambos os compostos

Uma considerável variação nas propriedades óptica e vibracional é resultado tanto do substituinte central, ou melhor, do átomo ou grupo de átomos que ocupam o anel central porfirínico, como dos substituintes ao anel pirrólico, pois estes substituintes também podem provocar uma variação na estrutura eletrônica.

Com relação ao substituinte central, quando há dois átomos de hidrogênio nos nitrogênios pirrólicos, o composto é chamado de porfirina base livre ($\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$), e apresenta cinco bandas de absorção no espectro visível, distintamente diferente das três bandas de absorção apresentadas quando os dois hidrogênios são substituídos por íons metálicos, as chamadas metaloporfirinas (ZnC_4P).

Essa diferença vem do fato de que os dois hidrogênios do anel da base livre fortemente conjugada reduzem a simetria do anel da metaloporfirina (ZnC_4P), de D_{4h} (onde observamos um eixo principal C_4 e um plano de simetria σ_h), para D_{2h} (onde o eixo principal é C_2 e também possui um plano de simetria σ_h), para a base livre.

Para a simetria D_{2h} da porfirina base livre ($\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$) observamos 4 bandas entre 500 e 660 nm, que são normalmente atribuídas ao nível (0,0) e (1,0) para as bandas denominadas Q_x e Q_y . No espectro de absorção da base livre ($\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$) na figura 12, foram observadas as seguintes posições de bandas $\text{Q}_x(0,0)$ em 649 nm, $\text{Q}_x(1,0)$ em 589 nm, $\text{Q}_y(0,0)$ em 552 nm e $\text{Q}_y(1,0)$ em 510 nm. Observa-se ainda

uma banda de forte intensidade chamada de Banda Soret (ou Banda B) em 420 nm.

Na Figura 13, apresentamos o espectro de absorção das bandas Q e o espectro de emissão de fluorescência para o fármaco H_2C_4P em etanol. Observa-se uma emissão máxima em 650 nm e em 710 nm, o que está de acordo com compostos porfirínicos regulares (Gouterman, 1978), isto é, apresentam quatro bandas Q para absorção na região de 500 a 660 nm, relacionadas as duas banda de emissão de fluorescência na região de 600 a 750 nm.

Figura 13. Espectro de absorção das bandas Q para a porfirina H_2C_4P em etanol (—), e espectro de emissão para a porfirina H_2C_4P em etanol (-----). Excitação fixa em 424 nm.

Para a porfirina metalada (ZnC_4P), a simetria observada é D_{4h} . Como esperado para metaloporfirinas, observamos 2 bandas de absorção entre 550 e 620 nm. A banda de menor energia é de origem eletrônica $Q(0,0)$, relacionada ao estado excitado singlete de mais baixa energia (Platt, 1956) e possui máxima intensidade de absorção em 618 nm. A banda de maior energia inclui um modo de excitação vibracional e é denominada de $Q(1,0)$ (Platt, 1956), possui máxima intensidade de absorção em 554 nm.

Observamos uma banda de maior intensidade (Banda Soret) em 425 nm que possui um coeficiente de extinção molar de $1,23 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a banda $Q(1,0)$ tem coeficiente de extinção molar de $1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Falk, 1964). Todos esses resultados estão de acordo com os estudos de Gouterman (Gouterman, 1978).

A inserção do Zn na porfirina faz com que haja uma mudança de simetria de D_{2h} para D_{4h} , apresentando um deslocamento batocrômico de 40 nm da banda $Q(1,0)$, o que é normalmente esperado para este tipo de composto com a mudança de simetria (Gouterman, 1978). Este fato é interessante para a proposta de utilização dos mesmos em TFD. Embora este deslocamento não seja intenso o suficiente para trazer a absorção desta classe de composto para uma região central da janela terapêutica, isto faz com que fármacos desta natureza tenham absorção mais deslocada para regiões onde já é possível o uso de diferentes tipos de fontes de luz, provenientes de sistemas Laser ou luzes não coerentes (como Laser de Argônio e Diodos) disponíveis no mercado (Thomas, 2004), passíveis de ativarem tais compostos.

Embora estas bandas não sejam ainda as ideais para TFD, sabe-se que as bandas na região Q de compostos porfirínicos têm sido utilizada com sucesso na TFD, a exemplo do Photofrin II (Merrill, 2002; Sharman , Allen e van Lier, 1999), um dos compostos mais usados clinicamente na TFD para vários tipos de tumores em vários países do mundo, inclusive no Brasil.

O espectro de emissão de fluorescência para ZnC_4P é apresentado na figura 14. Podemos observar que a fluorescência apresenta 2 picos de emissão denominados Q(0,0) e Q(0,1), que são na verdade imagem especular dos picos de absorção denominados Q(0,0) e Q(1,0), apresentados na Figura 10.

Figura 14. Espectro de absorção das bandas Q para a porfirina ZnC_4P em etanol (—), e espectro de emissão para a porfirina ZnC_4P em etanol (-----). Excitação fixa em 422 nm.

O mesmo comportamento foi observado por Gouterman (Gouterman, 1978) em seus estudos de fluorescência para metaloporfirinas regulares como (OEP)SnCl₂, (OEP)Zr^(IV) etc. Em todos os casos, a fluorescência apresenta 2 picos de emissão denominados Q(0,0) e Q(0,1), que são imagem especular dos picos de absorção Q(0,0) e Q(1,0). Frequentemente, observa-se a presença de mais um pico, que embora seja de menor intensidade, denomina-se Q(2,0) referente à banda de absorção Q(0,2).

Espectros de excitação de fluorescência obtidos estão em excelente concordância com os espectros de absorção.

Com relação à influência do ligante éter de coroa, pode-se observar um deslocamento de bandas para a região do vermelho, visto que no espectro de absorção da porfirina TFPP (porfirina usada como produto de partida para a síntese da base livre (H₂C₄P), Figura 15), foram observados as seguintes posições de bandas Q_x(0,0) em 644 nm, Q_x(1,0) em 584 nm, Q_y(0,0) em 538 nm e Q_y(1,0) em 502 nm. Observou-se ainda uma banda de forte intensidade chamada de Banda Soret (ou Banda B) em 412 nm. Sendo assim, um deslocamento da banda Soret de 8 nm para a região do vermelho é observado após a incorporação do éter de coroa.

Figura 15. Espectro de absorção da TFPP (6 μ M em etanol —). O inserto apresenta a expansão da região espectral que representa as bandas Q (500 a 800 nm).

IV.1.2. Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) da ZnC_4P e da H_2C_4P em etanol.

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 (S_0) promove seus elétrons aos estados excitados singletes mais energéticos (S_n),

de onde os mesmos podem retornar para o estado fundamental por vários processos radioativos e não radioativos. A razão entre os números de fótons emitidos a partir do estado excitado singlete por processo radioativo (denominado fluorescência) e o número total de fótons absorvidos define um parâmetro fotofísico denominado rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) (Turro, 1978).

Os Φ_F geralmente são determinados de forma relativa às propriedades previamente definidas para um composto padrão (Demas e Crosby, 1971a; Demas e Crosby, 1971b), conforme descrito na parte experimental (item III.4.1.2).

O rendimento quântico de fluorescência da ZnC_4P e H_2C_4P foi determinado utilizando como padrão uma solução de $TMPyPH_2$ em metanol como solvente, $\phi_f = 0,07 \pm 0,01$ e confirmado com a TPP em benzeno como solvente, $\phi_f = 0,13 \pm 0,01$.

Uma vez que a TFD é altamente dependente da produção de oxigênio singlete (1O_2), o Φ_F é uma propriedade fotofísica de grande importância para os fármacos fotossensibilizadores (FS). Compostos altamente fluorescentes usualmente são pouco eficientes como agentes fotodinâmicos, uma vez que é 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 1O_2 . Assim, os baixos valores de Φ_F encontrados contribuem para a formação dos estados excitados tripletes e, portanto, para a produção do 1O_2 .

Todas as soluções utilizadas para a determinação do Φ_F foram preparadas de modo a obter uma absorbância constante na faixa de 0,04 no comprimento de onda de 418 nm para a TPP.

O espectro de emissão de fluorescência corrigido foi obtido em um espectrofluorímetro Fluorog 3 da Spex de 500 à 800 nm. O método utilizado foi baseado no formalismo descrito por Demas (Demas e Crosby, 1971a), onde o rendimento quântico de uma amostra desconhecida é dado em relação a um padrão, como demonstrado na Equação 1.

$$\Phi_F = (A_x/A(p)).(DO(p)/DO_x).(n(p)^2/n_x^2). \Phi_F(p) \quad \text{Equação 1}$$

onde os subscritos x e p são referentes à amostra e ao padrão, respectivamente; A é a área do espectro de emissão de fluorescência corrigido; DO é a densidade óptica no comprimento de onda de excitação; n é o índice de refração do meio e Φ_F é o rendimento quântico de fluorescência.

Os valores encontrados foram: $\phi_f = 0,04 \pm 0,01$ para ZnC_4P e $\phi_f = 0,06 \pm 0,01$ para H_2C_4P e são da mesma ordem e estão de acordo com esta classe de compostos e de suas propriedades fotofísicas (Schneider et al., 2005). Esses resultados nos indicam que o fármaco, quando no estado excitado singlete (S_1), não retorna para o estado fundamental por emissão de luz (fluorescência) de uma forma efetiva. Sendo assim, ocorre um cruzamento intersistema para o mais baixo

estado triplete (T_1), resultado este confirmado pela determinação do rendimento quântico triplete.

IV.1.3 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ZnC_4P e para H_2C_4P em meio orgânico.

Outro parâmetro que é influenciado pela simetria e estrutura das moléculas é o tempo de vida do estado excitado singlete (τ_s). O tempo de vida de uma substância fluorescente representa o tempo médio em que esta molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental.

A espectroscopia de fluorescência pode fornecer informações detalhadas sobre o comportamento das macromoléculas, bem como a frequência de colisões com agentes supressores e a velocidade de transferência de energia envolvendo reações dos estados excitados. Estas informações estão contidas no espectro de emissão resolvido no tempo e são reveladas numa escala de tempo da ordem de nanosegundos.

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).

A intensidade da luz deve ser ajustada de modo que este pulso seja devido a um único fóton incidente, ou seja, deve ser assegurado que somente um fóton chegue ao detector a cada pulso para o qual um fóton é contado. Se mais de um fóton chegar por pulso, então o decaimento resolvido no tempo é deslocado para tempos mais curtos. Isto ocorre porque somente a chegada do primeiro fóton é contada. Se somente um fóton chega, então seu tempo de chegada reflete o decaimento resolvido no tempo verdadeiro. O tempo entre o pulso de excitação e a chegada do primeiro fóton é medido para um grande número de fótons. A distribuição dos tempos de chegada é representada por um histograma que traduz a curva de decaimento.

A técnica de contagem simples de fótons foi utilizada para se determinar os tempos de vida singlete do fármaco fotossensibilizador metalado ZnC_4P e da base livre $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em etanol, procedimento descrito no item III.4.1.3, e os valores encontrados foram $\tau_s = 1.31 \text{ ns}$ e $\tau_s = 7.83 \text{ ns}$ respectivamente. Estes resultados mostram que o fármaco metalado (ZnC_4P) tem um menor tempo de vida singlete. Normalmente, este comportamento é observado para derivados porfirínicos e ftalocianínicos metalados em relação à sua forma de base livre (Owens et al., 1998). Esses resultados indicaram que deve estar ocorrendo um cruzamento intersistemas eficiente, o que sem dúvida é de grande valia para o uso dos mesmos nos estudos de TFD, uma vez que existe a possibilidade de uma alta população dos

estados excitados triplete, que podem levar a produção do oxigênio singlete e de espécies reativas ativas na TFD.

IV.1.4. Estudos dos estados tripletes por fotólise por pulso de laser

Após a absorção de energia radiante, o fármaco fotossensibilizador passa a popular um estado excitado singlete de maior energia, o qual pode dar origem ao estado excitado triplete, através de um processo conhecido como cruzamento intersistema. A fotossensibilização celular ocorre devido à reação do oxigênio molecular, usualmente presente no meio, com o FS excitado (T_1) gerando oxigênio singlete (Spikes, 1984a). É por esse motivo que podemos afirmar que a ação fotodinâmica do FS nos sistemas biológicos é dependente da formação do primeiro estado excitado triplete (T_1) do FS.

No entanto, a fototoxicidade do FS não produz apenas o oxigênio singlete (1O_2) como espécies reativas de oxigênio. A absorção de elétrons foto-induzida por biomoléculas apropriadas levam às reações de transferência de elétrons, ou abstração de hidrogênio de moléculas biológicas que resultam na produção de radicais livres, que por sua vez podem atuar sozinhos (EROS, processos do Tipo I) ou simultaneamente à produção de oxigênio singlete (processo do Tipo II) (Foote, 1991; Viola et al., 1998). Sendo assim o FS que atua na produção de mais de um tipo de espécies excitadas se torna interessante para a TFD.

A técnica de fotólise por pulso de laser é uma das mais utilizadas dentre as técnicas resolvidas no tempo que são baseadas no monitoramento direto da absorção ou emissão de um intermediário reacional de vida curta, e é utilizada para gerar e estudar a reatividade dos transientes presentes nos estados excitados eletronicamente.

Após uma grande população de moléculas do estado fundamental ser promovida para os estados excitados singletes superiores através de um pulso rápido de luz de alta intensidade, as moléculas que se encontram no estado excitado singlete sofrem cruzamento intersistema para um estado excitado triplete.

O rendimento quântico de cruzamento intersistema mede a conversão do estados excitados singletes a tripletes e é representado pelo símbolo Φ_{isc} . 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 a velocidade de decaimento, ou da transferência de energia para o oxigênio molecular solubilizado no meio.

Os estados excitados para ZnC_4P como para a $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio etanólico foram gerados e estudados por fotólise por pulso de laser como descrito no item III.4.1.4. Os experimentos foram realizados na concentração de $5,0 \mu\text{M}$ para ambos os FS ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e estão ilustrados na figura 15.

Figura 15. Espectro de absorção do transiente obtido através do método de fotólise por pulso de laser da ZnC_4P (▼) e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (●) ($5 \mu\text{M}$) em etanol 30 mJ por pulso após excitação por pulso de laser em 355 nm, mostrando a absorção máxima do triplete centrada no comprimento de onda de 420 nm para ZnC_4P e 450 nm para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, e o fotobranqueamento do estado fundamental centrado a aproximadamente 410 nm.

Espectro de absorção do transiente obtido através do método de fotólise por pulso de laser da ZnC_4P (▼) e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (●) ($5 \mu\text{M}$) em etanol 12 μs após excitação por pulso de laser em 355nm, mostrando a absorção máxima do triplete centrada

no comprimento de onda de 420 nm para ZnC_4P e 450 nm para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e o fotobranqueamento do estado fundamental centrado a aproximadamente 410 nm.

O estado excitado triplete dos fármacos ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ apresenta absorção na faixa de comprimento de onda de 300 a 800 nm com o máximo da absorção do transiente em 420 nm para ZnC_4P e 450 nm para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, e está de acordo com o estado excitado triplete de muitas outras porfirinas (Foley et al., 1997b).

Para a ZnC_4P observamos, segundo a figura 15, que na absorção máxima, a variação da densidade ótica no estado triplete é de 0,10 enquanto que para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ é de aproximadamente 0,025. Isto é em torno de uma ordem de grandeza maior no sinal do triplete, o que indica um maior rendimento quântico de produção de triplete para ZnC_4P em comparação à $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, uma vez que a eficiência fotodinâmica é criteriosamente dependente do tempo de vida e do rendimento quântico do estado triplete.

Os tempos de vida dos estados excitados tripletes (τ_T) da ZnC_4P e da $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ foram calculados através da análise cinética das curvas de decaimento dos transientes no máximo da absorção triplete (420 e 450 nm, respectivamente) usando-se um programa de ajuste do próprio aparelho.

Os resultados obtidos através dos experimentos de fotólise por pulso de laser mostraram a presença de espécies simples, que decaem monoexponencialmente com tempos de vida da ordem de μs , para a ZnC_4P e para a $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em etanol.

Os valores dos tempos de vida do triplete obtidos para a ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ outros parâmetros fotofísicos, tais como tempo de vida singlete, rendimento quântico fluorescência e produção oxigênio singlete, estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros Fotofísicos da ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (6 μM em meio etanólico). τ_T = tempo de vida triplete, τ_S = tempo de vida singlete, Φ_f = rendimento quântico de fluorescência e Φ_Δ = rendimento quântico de oxigênio singlete.

Fotossensibilizador	$\tau_T(\mu\text{s})$ solução desaerada	$\tau_S(\mu\text{s})$ solução aerada.	Φ_f	Φ_Δ
$\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$	$0,42 \pm 0,02$	$7,83 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$0,62 \pm 0,01$
ZnC_4P	$0,73 \pm 0,02$	$1,31 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,01$

A duração do tempo de vida triplete depende de uma série de fatores, tais como solvente, concentração no estado fundamental, concentração no estado triplete e presença de supressores. Em nossos estudos, as medidas foram realizadas em solução etanólica desaerada.

Podemos verificar, de acordo com a tabela 1, que o fármaco fotossensibilizador metalado ZnC_4P possui o tempo de vida triplete maior, o tempo de vida singlete menor e o rendimento quântico de fluorescência menor que para o fármaco fotossensibilizador $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, o que é esperado pois a presença do

metal diamagnético é mais adequada para que ocorra uma fotossensibilização eficiente. Se houvesse a presença de um composto análogo contendo um metal paramagnético, este último diminuiria o tempo de vida do estado excitado tripleto, tornando o fotossensibilizador inativo (Bonnet, 2000).

O valor do tempo de vida tripleto encontrado para ZnC_4P foi 0.73 μs , maior que o da porfirina não metalada $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (0.42 μs), o que está de acordo com a literatura (Bonnet, 2000). Este tempo mostrou-se ser suficiente para que os estados tripletes excitados produzidos reajam com o oxigênio molecular presente no meio, produzindo oxigênio singleto ou outras espécies reativas de oxigênio (EROs).

IV.1.5 Estudos para a determinação do rendimento quântico de produção do oxigênio singleto (Φ_Δ) dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio orgânico.

O oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) desempenha um papel chave em muitos processos oxidativos fotoinduzidos em sistemas químicos e biológicos. Acredita-se que ele é um dos principais agentes responsáveis pela inativação da célula tumoral. Assim, um grande número de investigações tem sido realizado (Spiller, 1998).

O aniquilamento do estado excitado tripleto pelo oxigênio molecular pode ocorrer pelo processo Tipo I (transferência eletrônica) ou Tipo II (transferência de energia) como descrito na introdução.

Para porfirinas base livre, o processo Tipo II é frequentemente dominante (Bonnett et al., 1988). Para confirmar, foram realizadas medidas de emissão resolvidas no tempo, onde determinamos a produção de oxigênio singlete. O sinal de emissão do $O_2(^1\Delta_g)$ formado depois da excitação das soluções de porfirina em meio etanólico mostraram que o decaimento é de primeira ordem. O rendimento quântico de produção de oxigênio singlete foi medido pela emissão de luminescências das porfirinas ZnC_4P e H_2C_4P em 1270 nm, conforme descrito no item III.4.1.5.

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1, onde podemos verificar que o valor encontrado para H_2C_4P ($\Phi_\Delta = 0.62$) é maior que o valor encontrado para ZnC_4P ($\Phi_\Delta = 0.46$). Estes resultados indicaram que H_2C_4P apresenta uma eficiência um pouco maior na produção de oxigênio singlete que a equivalente metalada ZnC_4P . Embora a porfirina metalada tenha um tempo de vida do estado excitado triplete maior, sua produção final de oxigênio singlete é menor comparada à base livre. Porém, este valor é da mesma ordem de grandeza que de outras porfirinas metaladas, o que garante sua utilização na TFD (Bonnet, 2000). Para entendermos se está ocorrendo o cruzamento intersistema de uma forma eficiente para a porfirina metalada e base livre, realizamos o estudo da determinação do rendimento quântico de formação do estado triplete.

IV.1.6. Determinação do Rendimento Quântico de Formação do Estado Triplete dos fármacos fotossensibilizadores ZnC₄P e H₂C₄P.

Entre todos os estudos fotofísicos e fotoquímicos envolvendo FS ativos no processo fotodinâmico, o mais importante é o da detecção e quantificação da formação do estado triplete, pois a ação fotodinâmica é diretamente dependente da interação dos fármacos fotossensibilizadores neste estado excitado com substratos biológicos ou com o oxigênio molecular (Mecanismos I e II de fotossensibilização). É importante que o estado triplete seja produzido em alta concentração; portanto, o Φ_T é um importante parâmetro fotofísico a ser determinado.

Vários são os métodos disponíveis para a determinação do rendimento quântico de formação do estado triplete (Amand e Bensasson, 1975). Neste trabalho, o Φ_T foi determinado utilizando-se a técnica de flash fotólise a laser. A determinação do Φ_T para a ZnC₄P e para a H₂C₄P foi feita empregando-se a TPP como composto de referência ($\Phi_T = 0,8$ em tolueno) (Dupuis et al., 1999).

O cálculo do Φ_T inicia-se com a determinação do espectro real do estado triplete e o coeficiente de absorvidade molar no estado triplete excitado (ϵ_T) para os fármacos fotossensibilizadores no comprimento de onda de máxima absorção de seus transientes (430 nm para ambos os fármacos, ZnC₄P e H₂C₄P). As leituras de absorção do transiente foram determinadas 8 ns, após o pulso de excitação do

laser para a TPP e para os demais fármacos fotossensibilizadores, procedimento descrito no item III.4.1.6.

As medidas de rendimento quântico do estado excitado triplete para os fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ foram determinadas para a absorção inicial do triplete em várias intensidades do laser, comparadas com os valores do padrão TPP em tolueno e calculadas usando o rendimento da literatura e o coeficiente diferencial de absorção molar para o estado triplete da TPP.

O valor encontrado de rendimento quântico do estado excitado triplete (Φ_T) para ZnC_4P foi de $0,73 \pm 0,06$, e para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ foi de $0,63 \pm 0,05$.

O aniquilamento do estado excitado triplete pode ocorrer por dois mecanismos: Tipo I (transferência de elétron) e Tipo II (transferência de energia). Para a porfirina base livre $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, o Tipo II parece ser dominante, assim como para outras porfirinas (Sobolev, Jans e Rosenkranz, 2000), visto o maior rendimento quântico de produção de oxigênio singlete da porfirina base livre $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ ($\Phi_\Delta = 0,62$).

No entanto, para o fotossensibilizador metalado ZnC_4P , a presença do Zn e/ou do éter de coroa impede uma eficiência completa na transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular, pois o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete foi menor que o da base livre, $\Phi_\Delta = 0,46$. Sendo assim, concluímos que o processo Tipo I, neste caso, é o mecanismo de desativação dominante, o que leva à produção de outros ROS.

Os estudos espectroscópicos foram realizados no laboratório de Fotoquímica e Fotomedicina da FFCL-RP e sua publicação está anexada junta a esta Tese de doutorado, PELEGRINO, A.C. e col. Photophysical properties of crowned ether porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**. v.81, p.771-76, 2005.

Ambos os fármacos fotossensibilizadores parecem ser potencialmente eficientes para Terapia Fotodinâmica, o que justifica e respalda nossos estudos *in vitro*.

IV.1.7a Preparação da ZnC_4P e da H_2C_4P em meio lipossomal.

O efeito dos FS em sistemas biológicos não é governado apenas pelas suas propriedades fotofísicas, mas também pela especificidade de suas interações com biosistemas. Contudo, a localização preferencial do FS no tecido tumoral é fator determinante que afeta não só a terapia, mas também o mecanismo que leva a destruição do tumor.

Um dos principais objetivos dentro da TFD é o aumento da seletividade dos FS pelos tecidos tumorais. Na tentativa de aumentarmos esta seletividade, preparamos soluções lipossomais com nossos fármacos fotossensibilizadores, conforme descrito no item III.4.1.7.

Assim como descrito por Kremer(Kremer et al., 1977), observamos a formação de uma solução lipídica límpida quando alcançamos a concentração ideal de DPPC e lisofosfatidilcolina, para a incorporação da ZnC_4P e da H_2C_4P .

Observamos também que a velocidade de injeção e agitação influenciam diretamente no tamanho das vesículas formadas(Nunes , Sguilla e Tedesco, 2004b).

Foram realizados estudos para controle da estabilidade da formulação através de medidas de absorbância, nos quais observamos que não houve alteração significativa no espectro de absorção das suspensões lipossomais, o que indica a estabilidade do fármaco no meio em estudo por até duas semanas. Não obtivemos incorporação dos fármacos quando utilizamos colesterol na composição lipídica.

Após a incorporação dos fármacos nos lipossomas, houve mudança nos comprimentos de onda de absorção máximos de 8 nm para ambos os fármacos estudados. Assim o espectro de absorção da ZnC_4P (6 μM) e da H_2C_4P (6 μM) em meio lipossomal, figura 16, mostra uma absorção máxima a 432 nm (Soret-band) para ZnC_4P , e a 428 nm (Soret-band) para H_2C_4P , não ocorrendo mudanças em seus perfis espectrais em comparação aos espectros de meio orgânico, o que é freqüentemente observado para derivados porfirínicos(Wiehe et al., 2001).

Figura 16. Espectro de absorção normalizado para H₂C₄P (6 μM em meio lipossomal -----) e ZnC₄P (6 μM em meio lipossomal —)

Levando em consideração os estudos realizados anteriormente, onde autores relataram que os éteres de coroa encontram-se incorporados aos poros do tubo e que os lipídios ficam em posição perpendicular ao plano do éter (Hartgerink, Clark e Ghadiri, 1998); (Otto, Osifchin e Regen, 1999); (Voyer e Robitaille, 1995), podemos considerar que nossos fármacos encontram-se incorporados aos lipossomas e que, possivelmente, a associação dos éteres de coroa está induzindo a formação de nanotubos, formando os canais necessários para a alteração da homeostase celular como esperado (figura 17).

Figura 17. Figura demonstrativa da formação de canais de íons.

IV.1.7.b Preparação da ZnPc e o éter de coroa em meio lipossomal.

Uma das propostas de estudo do projeto para esta tese de doutorado foi o estudo de ftalocianinas ligadas covalentemente a éteres de coroa, com o objetivo de se estudar o sinergismo na ação da ftalocianina e o éter de coroa, visto que, como já escrito na introdução, as ftalocianinas mimetizam as porfirinas e também absorvem luz dentro da “janela terapêutica” onde a transparência do tecido biológico é elevada e a absorção desta irradiação por moléculas endógenas do sistema biológico é praticamente nula.

Contudo, por problemas na síntese, as ftalocianinas derivadas de éter de coroa não foram fornecidas pelo Grupo de Síntese Orgânica da Universidade do Vale do Paraíba, coordenado pelo Prof. Dr. Milton Beltrame Junior. Sendo assim,

foram realizados estudos em sistemas mistos contendo a zinco ftalocianina (ZnPc) e o éter de coroa. Estes estudos foram feitos em um sistema lipossomal no qual os compostos estão associados na formulação, conforme descrito no item III.4.1.7

Estes estudos permitiram com que esses sistemas fossem também avaliados *in vitro* quanto à alteração na homeostase intracelular de íons Na^+ e K^+ , o que permitiu uma análise geral da ação sinérgica dos mesmos, no processo apoptótico da célula tumoral.

Nas Figuras 18 e 19, respectivamente, estão apresentados os espectros de absorção para a ZnPc ($5\mu\text{M}$) em etanol, a partir de uma solução estoque de ZnPc em (DMF/DMSO), e os espectros da absorção para a ZnPc ($5\mu\text{M}$) em meio lipossomal e na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6.

Figura 18. Espectro de absorção normalizado da ZnPc ($5,0\mu\text{M}$) em etanol.

Figura 19: Espectro de absorção normalizado da ZnPC (5,0 μ M) em meio lipossomal na ausência (—) e na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 (16 μ M) (—).

O perfil do espectro de absorção para a ZnPC tanto em etanol quanto em meio lipossomal na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 foi idêntico ao observado para ZnPC na ausência de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 (Figuras 15 16). Entretanto, a incorporação da ZnPC aos DPPC e lysofosfatidilcolina leva a um deslocamento nas bandas (de 666 em etanol para 672 nm em DPPC). Este fato foi observado para a absorção nas bandas Q do espectro (600 a 700 nm), análogo ao descrito para outros compostos porfirínicos (Chatterjee e Srivastava, 2000). Além disto, um aumento do espalhamento foi encontrado no espectro de absorção, na região abaixo de 600 nm, para a ZnPC incorporada aos fosfolipídios.

A espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário para a ZnPC (5 μ M) em etanol e incorporada aos fosfolipídios na ausência e na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 (16 μ M) está apresentada nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

Figura 20 Espectro de emissão de fluorescência normalizado da ZnPC (5,0 μ M) em etanol. ($\lambda_{\text{exc}} = 610$ nm)

Figura 21. Espectro de emissão de fluorescência normalizado da ZnPC (5,0 μ M) incorporada aos fosfolipídios na ausência (—) e na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 (16 μ M) (—). (λ_{exc} = 610 nm)

A incorporação da ZnPC aos fosfolipídios resultou em um deslocamento para o vermelho na emissão máxima de fluorescência da ZnPC. Os máximos de fluorescência passaram de 678 nm para a ZnPC em meio orgânico a 682 nm para a ZnPC em meio lipossomal na ausência de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6, e a 685 nm para ZnPC em meio lipossomal na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 (Figura 21).

Os resultados obtidos indicaram que a incorporação no sistema lipossomal e a presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 não alteram significativamente as propriedades do fármaco fotossensibilizador ZnPC no estado estacionário. Estes são dados muito importantes para o desenvolvimento do lipossomo ZnPC/2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6, pois assim pode-se estudar a influência do éter de coroa no processo de despolarização da membrana plasmática das células J774-A.1.

IV.1.8 Estudos do potencial zeta e tamanho de partículas da Zinco Ftalocianina (ZnPC) na ausência e na presença do éter de coroa 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6.

A análise da distribuição do tamanho da ZnC₄P, H₂C₄P e ZnPC lipossomal na ausência e na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 foi realizada no

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP/USP da Prof^a D^{ra}. Maria Vitória Lopes Badra.Bentley, em um equipamento adquirido junto ao grupo Multiusuário (Processo Fapesp n° 04/09465-7).

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

As amostras foram submetidas sem diluições 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, conforme descrito no item III.4.1.8. Foram realizadas medidas de tamanho para as amostras dos lipossomas de ZnPC na ausência e na presença de 2-(Hydroxymethyl)-18-crown-6 e para ZnC₄P e H₂C₄P.

O potencial zeta é um indicador útil da carga superficial líquida da partícula, e assim pode ser usado para prever e controlar a estabilidade de suspensões e emulsões coloidais. Tanto o potencial zeta quanto o tamanho das partículas foram medidos 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 tabela 2 mostra os valores de tamanho das partículas e o potencial zeta encontrados nas amostras analisadas.

Os sistemas lipossomais preparados nesta etapa apresentaram estabilidade por um tempo aceitável (15 dias). Sendo assim, conclui-se que as partículas formadas possuem força suficiente para suprir a tendência natural à agregação.

A incorporação do complexo na formulação propiciou um aumento de carga na camada de repulsão eletrostática, o que ocasiona um aumento na estabilidade. Este fato pode ser observado nos resultados demonstrados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Tamanho das partículas e potencial zeta das preparações lipossomais

Lipossomos	Tamanho de partícula (nm)	Potencial Zeta (mV)
Vazio	$70,1 \pm 0,3$	-25,5
Éter de coroa	$88,6 \pm 0,4$	-28,2
ZnPC	$81,1 \pm 0,1$	-24,8
ZnPC e éter de coroa	$90,3 \pm 0,2$	-22,3
ZnC ₄ P	$150 \pm 0,2$	
H ₂ C ₄ P	$148 \pm 0,01$	

De acordo com os resultados mostrados na tabela 2, podemos observar que o lipossomo contendo a ZnPC e o éter de coroa apresentaram características semelhantes às do lipossomo sem o fármaco. Dessa forma, a associação destes dois fármacos em lipossomo não ocasionou mudanças significativas no que tange o tamanho das partículas e o potencial zeta.

Também foi realizado um estudo do tamanho de partícula e Potencial Zeta da ZnC₄P e H₂C₄P em meio lipossomal, onde as medidas do diâmetro médio das partículas com base em medidas de espalhamento de luz nos mostram que o tamanho médio das vesículas foi de 150 nm.

Essas soluções lipossomais de fármacos foram imprescindíveis para auxiliarem o processo de incorporação da ZnC₄P e H₂C₄P lipossomal nas culturas

celulares, pois a capacidade de interação das células com vesículas lipossomais de pequeno tamanho, como o lipossoma preparado neste trabalho, deve ser muito maior quando comparada aos lipossomas de tamanho próximo à dimensão celular.

Um estudo paralelo para avaliar a influência da concentração salina na estabilidade das formulações lipossomais foi realizado. Neste estudo pequenas alíquotas de NaCl (estoque) foram adicionadas à solução lipossomal resultando em uma variação da concentração de sal, como mostra a tabela 3. Após cada adição, o diâmetro médio do lipossoma foi novamente determinado com base em medidas de espalhamento de luz. Posteriormente, repetimos o mesmo procedimento para o sal KCl, utilizando-se as mesmas concentrações.

Tabela 3- Cálculo do diâmetro médio do lipossoma com base em medidas de espalhamento de luz.

Concentração sal	Lipos.ZnC ₄ P + NaCl (nm)	Lipos. ZnC ₄ P + KCl (nm)
0 mM	144,6 ± 0,3	152,6 ± 0,3
12 mM	145,2 ± 0,1	149,3 ± 0,2
50 mM	149,8 ± 0,2	153,9 ± 0,2
150 mM	147,3 ± 0,1	152,2 ± 0,3
180 mM	143,8 ± 0,2	153,6 ± 0,4

Esses estudos mostraram que tanto NaCl como o KCl não interferem no tamanho médio das vesículas lipossomais preparadas na presença do fármaco, e

estão de acordo com os estudos de Echegoyen(Echegoyen et al., 1988). No trabalho realizado por estes autores, foram preparados lipossomas formados por éteres de coroa ligados covalentemente ao colesterol, onde o éter de coroa se apresenta com um forte caráter hidrofílico e a cadeia de colesterol com um forte caráter lipofílico. Uma análise dos lipossomas aos quais o mesmo foi incorporado indicou que os éteres de coroa se situaram junto à cabeça polar dos fosfolipídios do lipossoma e que a parte pertencente ao colesterol se localizou preferencialmente na bicamada lipídica, isto é, junto à parte apolar dos fosfolipídios.

O mesmo tipo de comportamento é esperado para nossos fármacos, visto que a estrutura porfirínica da molécula apresenta um forte caráter apolar e deve permanecer entre a bicamada dos agregados lipossomais, ao passo que o ligante éter de coroa deve se localizar junto à cabeça polar dos fosfolipídios.

Os compostos descritos no trabalho de Echegoyen também foram avaliados frente à associação dos mesmos a íons Na^+ e K^+ por meio de uma solução homogênea dos respectivos sais, onde foi observado que esses íons de Na^+ e K^+ influenciaram muito pouco no tamanho final das suspensões lipossomais(Echegoyen et al., 1988). O mesmo comportamento foi observado em nosso trabalho para nossos compostos, o que reforça a idéia da localização dos mesmos nos lipossomas.

Essas análises foram primordiais para os futuros estudos em cultura celular, nos quais se propõe uma alteração na homeostase intracelular de íons Na^+ e K^+ ,

avaliando, assim, seu efeito no processo apoptótico das células tumorais quando associado ao processo fotodinâmico.

IV.2 Estudos envolvendo linhagem de células J774-A.1.

IV.2.1 Diagrama de crescimento da cultura celular

Para assegurar um crescimento fisiológico sadio e reprodutível da cultura de células, é necessário seguir uma metodologia especial. Basicamente, esta metodologia envolve tópicos como: local de trabalho adequado, técnicas assépticas para crescimento e manutenção de cultura, assepsia de materiais, controle bacteriológico de reagentes e meio de cultura etc(Filho e et al, 1994).

As maiorias dos estoques primários de culturas celulares são fornecidas por diferentes companhias existentes no mercado. Estes estoques primários de células são fornecidos na forma congelada ou na forma de células recém cultivadas. Além disso, juntamente com o lote de células, são fornecidas todas as informações necessárias referentes ao meio de cultura mais apropriado para crescimento, tempo de vida média das culturas, forma de estocagem, etc.

Entretanto, todo trabalho inicial com uma nova cultura de células deve ser acompanhado de controles básicos, sendo o mais importante deles o que nos fornece a relação de crescimento da cultura celular em função do tempo.

Embora existam diferentes tipos de cultura celular, em geral todas apresentam um diagrama de crescimento básico, onde é possível identificar ao menos três fases distintas de crescimento.

A primeira fase, conhecida como *fase preparatória*, consiste no período no qual não se observa um crescimento apreciável da cultura celular (0 a 5 %). Nesta fase as células se adaptam metabolicamente ao sistema de cultura, ou seja, meio, temperatura, recipiente, etc.

A segunda fase, conhecida como *fase logarítmica ou fase de crescimento*, representa a parte mais importante da cultura, onde usualmente encontra-se uma porcentagem de crescimento de 90 a 100%. Esta é sem dúvida a melhor fase para execução dos estudos em sistemas celulares, uma vez que a cultura encontra-se em plena atividade metabólica com número máximo de células saudáveis.

A terceira fase, conhecida como *platô*, é caracterizada por apresentar uma população elevada de células, onde geralmente existe uma redução drástica na porcentagem de crescimento (0 a 10 %). Geralmente, nesta última fase, as células não se apresentam fisiologicamente sadias e muitas estão mortas, sendo, portanto, desfavorável o desenvolvimento de estudos relacionados à atividade celular nesta fase.

Entretanto, para cada tipo diferente de cultura celular deve-se determinar precisamente seu diagrama de crescimento característico. Com o crescimento desta cultura, atinge-se a fase ideal, para preparo de outras subculturas, e assim sucessivamente.

A periodicidade na qual a cultura deve ser alimentada, o tempo ideal para troca de meio de cultura, ou mesmo a preparação de uma nova subcultura é determinada por fatores, como:

- 1) Variações bruscas no pH do meio, detectados visualmente pela mudança na cor do indicador presente no meio de cultura;
- 2) Altas concentrações celulares (observadas através do microscópio inverso), caracterizado por aglomeração celular. Em geral ocorre quando a cultura atingiu a fase de platô no diagrama celular;
- 3) Mudanças morfológicas, ou seja, tamanho, geometria das células, granulação ao redor dos núcleos etc.

As culturas celulares foram desenvolvidas em incubadora, termostatizadas a 37 °C e aeradas continuamente com 5.0 % de CO₂, controlando-se sempre o volume, profundidade e superfície de área ocupada pela cultura nos respectivos frascos.

A seguir, na Figura 22, apresentamos um exemplo típico de curva de crescimento para cultura celular de células J774A.1, realizado conforme metodologia descrita anteriormente.

Figura 22. Curva de crescimento da linhagem J774-A.1 até 67 horas

A curva de crescimento para a linhagem neoplásica J774-A.1 mostra que a partir de uma concentração celular de $0,13 \times 10^6$ células/mL, as células atingiram sua fase logarítmica de crescimento depois de 25 horas e o platô foi atingido após 45 horas com concentração celular de $1,4 \times 10^6$ células/mL.

Com base nos resultados obtidos para a curva de crescimento de cultura J774-A.1, e considerando-se a melhor fase para desenvolvimento dos estudos, como a fase logarítmica de crescimento (fase de plena atividade fisiológica), decidiu-se trabalhar sempre com culturas situadas entre $0,5$ a $1,3 \times 10^6$ células/mL, (ponto médio da fase logarítmica), respeitando-se o índice de 1 a 5 % de células, marcadas com azul de Tripan, (valor aceito como normal para estes tipos de cultura celular).

IV.2.2 Definição de parâmetros para os estudos de fototoxicidade.

Antes dos estudos de fototoxicidade, foi realizada uma série de experimentos com o intuito de definir parâmetros para se obter a melhor resposta dos fotossensibilizadores frente aos experimentos de fototoxicidade, *in vitro*.

- 1- Estudou-se a toxicidade dos fármacos em diferentes concentrações em meio homogêneo e micro heterogêneo (lipossomal) para se determinar a maior concentração não citotóxica;
- 2- Checou-se a viabilidade celular dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ nos diferentes meios fisiológicos em diferentes tempos de incubação (7 e 24 horas), para se determinar o meio no qual seria possível realizar um estudo de cinética de incorporação;
- 3- Analisou-se o efeito do soro bovino fetal (SBF) na incorporação dos fármacos ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e TPP em meio homogêneo e micro heterogêneo em células neoplásicas J774-A.1, com o intuito de verificar a influência da porcentagem de SBF na incorporação dos fármacos;
- 4- Desenvolveu-se método analítico para quantificação dos fármacos ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e TPP por espectrofluorometria;
- 5- Avaliou-se a cinética de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e TPP no meio fisiológico de cultura (DMEM com 10% de SBF).

Com esses estudos, definiu-se a concentração dos fármacos, o tempo de incubação ideal e a porcentagem de soro bovino fetal (SBF) a ser utilizada nos estudos *in vitro*, meio fisiológico, além de ter sido avaliada a cinética de incorporação dos mesmos.

IV.2.2.1 Toxicidade dos fármacos ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio homogêneo e micro heterogêneo sobre a linhagem de células J774-A.1 em meio Hank's

Antes da realização dos estudos de citotoxicidade, foram realizados estudos preliminares de toxicidade dos fármacos ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em diferentes concentrações na linhagem de células J774-A1 em meio Hank's, como descrito na seção III.4.2.2.1. Estes estudos permitiram não só o aprendizado das técnicas fotobiológicas de manipulação e trabalho *in vitro*, como também forneceram uma visão geral do comportamento dos compostos frente à sistemas biológicos, bem como dados com relação à toxicidade do composto. Foi observado que o aumento na concentração do fármaco no ambiente celular levou a uma maior toxicidade, resultados apresentados na tabela 4.

Tabela 4- Toxicidade dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e ZnC_4P em meio Hank's e lipossomal, na ausência de luz na linhagem de células J774-A.1

Fármaco fotossensibilizador	Porcentagem de morte em meio Hank's (estoque inicial DMSO).	Porcentagem de morte em relação ao controle em meio lipossomal.
$\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (2 μM)	1,6%	1,3%
$\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (4 μM)	4,9%	4,2%
$\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (6 μM)	12,4%	9,4%
ZnC_4P (2 μM)	3,2%	2,5%
ZnC_4P (4 μM)	5,4%	4,9%
ZnC_4P (6 μM)	19,8%	15,6%

Os resultados dos estudos de toxicidade no escuro *in vitro*, utilizando a linhagem de células J774.A-1 como modelo biológico, indicaram que a ZnC_4P em

meio lipossomal a 2, 4 e 6 μM apresenta uma porcentagem de morte da ordem de 2,5 %, 4,9% e 15,6 % respectivamente, enquanto que a base livre $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio lipossomal a 2, 4 e 6 μM apresentou uma porcentagem de morte da ordem 1,3 %, 4,2 % e 9,4%, respectivamente, para as células macróficas J774 A-1.

Já para os estudos *in vitro*, onde os fármacos fotossensibilizadores foram administrados inicialmente em meio homogêneo, observou-se uma maior toxicidade para ZnC_4P (2, 4 e 6 μM), que foi da ordem de 3,2 %, 5,4% e 19,8 %, respectivamente, em relação à base livre $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ (2, 4 e 6 μM), que foi da ordem de 1,6 %, 4,9 % e 12,4, respectivamente, na presença de células macrofágicas J774 A-1.

Estes resultados indicaram que ZnC_4P apresenta uma toxicidade no escuro um pouco maior quando comparada com a $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, porém os valores de toxicidade até a concentração de 4 μM estão dentro do valor basal, normalmente encontrado para este tipo de linhagem celular (<5%). Também foi observado que para os experimentos onde os fármacos fotossensibilizadores foram estudados em meio fisiológico Hank's (meio homogêneo), a toxicidade foi maior comparada à mesma concentração em meio lipossomal.

Sendo assim, adotamos a concentração de 4 μM para nossos fármacos, tanto em meio heterogêneo quanto em homogêneo, pois esta foi a maior concentração encontrada que não ultrapassou o nível basal de 5%.

IV.2.2.2 Viabilidade celular dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ nos diferentes meios fisiológicos.

Com o objetivo de se determinar qual o melhor ambiente para a realização dos estudos *in vitro*, a citotoxicidade das células J774-A.1 foi avaliada através da incubação dos fármacos com os diferentes meios: tampão fosfato (pH 7,4), tampão Hank's, meio de cultura (DMEM) sem soro fetal bovino (SBF) e com 1, 3 e 10 % de SBF, com tempos fixos de 7 e 24 horas. Foram adotados estes tempos de incubação porque estudos preliminares em meio fisiológico Hank's, descritos no item III.4.2.2.1.a, haviam mostrado que para a ZnC_4P , tanto em meio homogêneo quanto em meio heterogêneo, a maior taxa de incorporação ocorre com 7 horas de incubação.

Nestes experimentos, a citotoxicidade dos fármacos foi avaliada através do teste de MTT (descrito no item III.4.2.1.d), que monitora a atividade mitocondrial das células, em relação à viabilidade celular das células controle. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Porcentagem de células mortas após a incubação das células J774-A.1, por 7 e 24 horas, com os diferentes meios de cultura.

Meios	% de células mortas	
	7 horas	24 horas
Tampão fosfato	32,3	55,0
Hank's	16,0	45,0
Meio de cultura sem soro	18,0	40,0
DMEN c/ 1 % de serum	8,0	16,0
DMEN c/ 3 % de serum	7,0	15,0
DMEN c/ 10 % de serum	0,0	0,0

Os resultados obtidos indicaram que o melhor meio de cultura a ser utilizado foi o que contém 10 % de soro bovino fetal. A influência da porcentagem de soro bovino fetal na taxa de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores foi avaliada, uma vez que está estabelecido que a porcentagem de SBF pode interferir na taxa de incorporação e viabilidade celular(Richter et al., 1993).

IV.2.2.3 Efeito do SBF na incorporação dos fármacos fotossensibilizadores H_2C_4P , ZnC_4P e TPP em células neoplásicas J774-A.1.

Um dos maiores problemas presentes nos estudos *in vitro* e *in vivo* na TFD relaciona-se diretamente à habilidade do fármaco fotossensibilizador de acumular-se preferencialmente no tecido tumoral. A taxa de incorporação do fármaco na célula tumoral é altamente dependente de sua propriedade lipofílica. Os fármacos

fotossensibilizantes podem interagir com lipoproteínas e soro albuminas presentes no sangue. Para fármacos hidrofóbicos, prevalece a ligação à lipoproteína e para fármacos hidrofílicos, a interação com as soro albuminas (Richter et al., 1993).

Com o intuito de analisar o efeito do SBF sobre a taxa de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores H_2C_4P , ZnC_4P , realizou-se estudos na ausência e na presença de soro bovino fetal a 3% e 10%, conforme descrito no item III.4.2.2.2. Os fotossensibilizadores foram pré-incubados em meio completo DMEM contendo soro bovino fetal por 2 horas antes de sua utilização nos estudos *in vitro* com as células J774-A.1.

Um estudo comparativo com a TPP foi realizado por ser uma porfirina hidrofóbica e já descrita em muitos trabalhos na literatura como padrão para estudo de incorporação (Benoît, Didelon e Barberi-Heyob, 2006). Os demais fármacos fotossensibilizadores H_2C_4P , ZnC_4P , devido à presença do éter de coroa em sua estrutura, apresentam uma maior anfifilicidade, sendo esses estudos, portanto, essenciais ao trabalho. Dados descritos na literatura demonstram que para os diferentes tipos de fármacos fotossensibilizadores, existem diferentes mecanismos de incorporação e associação às células neoplásicas (Ball et al., 1999). Os resultados obtidos neste trabalho são apresentados nas figuras 23 a 25.

Figura 23. Variação da intensidade de Fluorescência para a ZnC_4P em DMEN com diferentes porcentagens de SBF, com λ de excitação fixa em 428 nm. (curva ■ para 0% de SBF, curva ■ para 3% de SBF e curva ■ para 10% de SBF).

Figura 24. Variação da intensidade de Fluorescência para a H_2C_4P em DMEN com diferentes porcentagens de SBF, com λ de excitação fixa em 424 nm (curva ■ para 0% de SBF, curva ■ para 3% de SBF e curva ■ para 10% de SBF).

De acordo com os resultados obtidos, apresentados nas figuras 23 e 24, observou-se que para os fármacos fotossensibilizadores H₂C₄P, ZnC₄P ocorreu um aumento na taxa de incorporação decorrente do aumento da porcentagem do SBF no meio DMEM. Esse comportamento foi diferente do observado normalmente para porfirinas lipofílicas administradas intra-venosamente, onde o mecanismo de incorporação ocorre por um processo de difusão passiva, e onde não se observa um aumento na taxa de incorporação com o aumento da concentração do SBF(Alberts et al., 2002).

Nos estudos com a TPP, os resultados foram análogos aos encontrados nos estudos de Alberts e col., que trabalharam com porfirinas lipofílicas onde não ocorreu um aumento na taxa de incorporação com o aumento da porcentagem do soro bovino fetal, o que era esperado considerando-se a estrutura da TPP (figura 25).

Figura 25. Variação da intensidade de Fluorescência para a TPP em DMEM com diferentes porcentagens de SBF com λ de excitação fixa em 418 nm, (curva ■ para 0% de SBF e curva ■ para 10% de SBF).

Tanto em meio DMEM na ausência do soro bovino fetal, quanto em sua presença, a taxa de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores anfifílicos H_2C_4P e ZnC_4P foi maior que do fármaco fotossensibilizador lipofílico TPP, (Figura 25).

O comportamento observado para os derivados éteres de coroa pode ser explicado considerando-se a mudança estrutural da porfirina ligada ao éter de coroa. O ligante axial provoca uma mudança em seu caráter lipofílico, tornando-a mais anfifílica, observando assim um aumento na taxa de incorporação do mesmo com o aumento da porcentagem de SBF. Este fato repercute diretamente na

resposta celular induzindo um aumento da atividade metabólica do sistema e, portanto, uma maior taxa de incorporação. Um aumento na atividade celular endocitótica explica o aumento na taxa de incorporação. Resultado análogo foi também observado nos estudos de Taylor e col., onde foi observado um aumento na atividade metabólica com o aumento do pH do meio de 7,4 para 8,0 (Taylor, 1962).

Com o intuito de estudar a influência do meio lipossomal na incorporação das células J774-A.1, adotou-se o mesmo protocolo descrito acima. No entanto, os fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P , H_2C_4P e TPP foram previamente incorporados a sistemas lipossomais. Porfirinas incorporadas a lipossomos unilamelares interagem facilmente com as lipoproteínas presentes no SBF, podendo as mesmas estar associadas aos três maiores componentes lipoprotéicos presentes no sangue (VLDL, HDL e LDL)(Richter et al., 1993).

A taxa de incorporação dos fotossensibilizadores pelas células J774-A.1 foi avaliada após a incubação dos mesmos em meio DMEM, na ausência e na presença do SBF a 3% e 10%. Os resultados estão apresentados nas figuras 26, 27.

Figura 26. Variação da intensidade de fluorescência para a ZnC₄P em diferentes porcentagens do SBF no meio de cultura celular, onde o SBF variou de 0, 3 e 10%, com λ de excitação fixa em 428 nm.

Figura 27. Variação da intensidade de fluorescência da H₂C₄P em meio lipossomal em diferentes porcentagens de SBF no meio de cultura celular, onde o SBF variou de 0, 3% e 10%, com λ de excitação fixa em 424 nm.

De acordo com a figura 23 e 24, pode-se observar que para os fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio lipossomal, não ocorreu uma variação na taxa de incorporação com o aumento da percentagem do soro bovino fetal, o que reforça a idéia da influência do ligante éter de coroa na taxa de incorporação. Como em meio lipossomal todos os fármacos em estudo apresentam forte caráter lipofílico (devido à incorporação do mesmo na dupla camada lipídica), não se observa o efeito detectado nos estudos em meio homogêneo.

No entanto, para os estudos realizados com a TPP em meio lipossomal (figura 28), observou-se que ocorreu uma variação na taxa de incorporação decorrente do aumento da porcentagem do SBF presente no meio de cultura celular, o que está de acordo com estudos descritos em literatura, onde diferentes fármacos fotossensibilizadores em diferentes meio de cultura celular apresentam diferentes mecanismos de incorporação (Siboni et al., 2002).

Figura 28. Variação da Intensidade de Fluorescência para a TPP em DMEM com diferentes porcentagens de SBF (curva ■ para 0% de SBF, curva ■ para 3% de SBF curva ■ para 10% de SBF), com λ de excitação fixa em 418 nm

Esses estudos comprovam que a variação de mecanismo de incorporação depende do veículo de administração utilizado, visto que quando os fármacos fotossensibilizadores anfifílicos H_2C_4P e ZnC_4P foram incorporados em lipossomos, não foi observada uma variação na taxa de incorporação em função da porcentagem de SBF. Porém, para o fotossensibilizador lipofílico TPP, foi observado um aumento na taxa de incorporação com o aumento da porcentagem de soro bovino fetal.

IV.2.2.4 Desenvolvimento de método analítico para quantificação dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e TPP por espectrofluorometria.

Com o intuito de quantificar a porcentagem de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores nos estudos de incorporação em linhagem neoplásica J774-A.1, desenvolvemos um método analítico baseado em técnicas espectrofluorimétricas, conforme descrito no item III.4.2.2.4.

Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de cada fotossensibilizador em estudo (ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e TPP, em meio homogêneo), sendo as mesmas armazenadas sob proteção da luz e em freezer por no máximo 30 dias.

Em uma cubeta de quartzo prepararam-se por diluições sucessivas, com auxílio de microseringas, soluções do fármaco dentro do intervalo de concentração de 0,01 a 2 μM para o meio em estudo.

Traçaram-se, então, os espectros de emissão na faixa de 550 nm a 750 nm para cada concentração com excitação fixa em 428 nm para ZnC_4P , 424 nm para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e 418 nm para TPP, variando-se as fendas de emissão e excitação a fim de se adequar à melhor resolução espectral para ambos os meios estudados, sendo estabelecidos 10 nm para a abertura da fenda de excitação e 5 nm para a de emissão como padrões.

O gráfico de emissão vs concentração permitiu estabelecer uma curva de calibração para o meio em estudo, obtendo por regressão linear a equação da reta correspondente à curva experimental apresentada a seguir nas figuras 29, 30 e 31.

A partir da equação da reta, calculou-se para cada amostra sua concentração, sempre mantendo a mesma condição do protocolo experimental utilizado na obtenção da curva de calibração.

Figura 29. Curva de calibração da ZnC_4P em etanol. Inseto: espectros de emissão de fluorescência da ZnC_4P em etanol, com excitação fixa em 428 nm, fenda de excitação de 10 nm e emissão de 5 nm. Equação: $y = 7,0737e^{10}x + 4104,9$, $R^2 = 0,995$

Figura 30. Curva de calibração da H₂C₄P em etanol. Inseto: espectros de emissão de fluorescência da H₂C₄P em etanol, com excitação fixa em 424 nm, fenda de excitação de 10 nm e emissão 5 nm. Equação: $y = 1,8 \cdot 10^5 x + 807,0$, $R^2 = 0,995$.

Figura 31. Curva de calibração da TPP em etanol. Inseto: espectros de emissão de fluorescência da TPP em etanol, com excitação fixa em 418 nm, fenda de excitação de 10 nm e emissão 5 nm. Equação: $y = 4,49e^{10}x + 1197,6$

IV.2.2.5 Cinética de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores H_2C_4P , ZnC_4P e TPP no meio de cultura (DMEM com 10% de SBF).

A porcentagem de incorporação da TPP, H_2C_4P e ZnC_4P em função do tempo de incubação foi avaliada para uma concentração fixa não citotóxica dos fármacos fotossensibilizadores (4 μM).

Esses estudos foram realizados com os fármacos em meio homogêneo, pois graças a experimentos comparativos preliminares de cinética de incorporação com o fármaco ZnC_4P em meio homogêneo e micro heterogêneo, conforme descrito no item III.4.2.2.1.a, ficou demonstrado que a taxa de incorporação em meio

homogêneo foi 3 vezes maior que a taxa de incorporação do mesmo em meio lipossomal, isso para 7 horas de incubação onde também foi observado a melhor relação de incorporação com viabilidade celular, o que está de acordo com os estudos de Richter e col, que demonstraram que derivados de benzoporfirina em solução lipossomal apresentam uma menor taxa de incorporação quando comparado com a solução aquosa do fotossensibilizador livre(Richter et al., 1993).

Figura 32. Porcentagem de incorporação, por tempo de incubação, a partir de uma solução 4 μ M de ■ ZnC₄P, ■ H₂C₄P e ■ TPP em meio de cultura DMEN com 10 % de SBF pela linhagem celular J774-A.1.

De acordo com a figura 32, podemos verificar que durante as primeiras 7 horas, os fármacos fotossensibilizadores anfifílicos ZnC₄P e H₂C₄P apresentaram um aumento na porcentagem de incorporação de forma linear decorrente do aumento do tempo de incubação na presença das células J774-A.1, caracterizado

por uma diferença significativa na intensidade de fluorescência do fotossensibilizador, após extração do mesmo em meio orgânico, a partir das diferentes culturas de células, e quantificada através do uso de uma curva de calibração para cada fármaco.

O platô foi alcançado com 7 horas de incubação para os fármacos fotossensibilizantes ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, onde observamos uma taxa de incorporação de 31% para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e 34% para ZnC_4P para meio DMEM com 10% de SBF.

Também observamos que a incorporação dos fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ foi significativamente maior que a incorporação do fármaco TPP, o que está de acordo com o aumento do caráter anfifílico desses fármacos devido à presença do ligante éter de coroa. A baixa incorporação do fotossensibilizador TPP foi semelhante àquela observada por Benoit (Stasio et al., 2005), que estudou a taxa de incorporação da TPP usando microscopia de fluorescência em células HT29.

Porém, a alta taxa de incorporação não é o único fator determinante para a atividade fotodinâmica. A localização subcelular dos fármacos nos sistemas *in vitro* é também muito importante. Na etapa seguinte, realizamos estudos de fototoxicidade na presença de luz, dentro dos parâmetros estabelecidos nos experimentos anteriores.

IV.2.3 Estudos fotobiológicos.

IV.2.3.1 Avaliação da fototoxicidade dos fármacos fotossensibilizadores H₂C₄P, ZnC₄P e TPP em células neoplásicas da linhagem J774-A.1.

No estudo de fototoxicidade, foi avaliado o efeito da luz monocromática, provinda de um sistema foto-polimerizador com filtro específico para selecionar a banda de 400 a 500 nm, sobre os fármacos fotossensibilizantes TPP, H₂C₄P e ZnC₄P na cultura celular (Células J774-A1), conforme descrito no item III.4.2.3.1. Neste experimento, as concentrações dos fotossensibilizadores foram fixadas em 4μM, sendo os mesmos incubados com aproximadamente 1x10⁶ células/mL, por um intervalo de tempo de 7 horas a 37°C em uma estufa de CO₂ em meio DMEM contendo 10% de serum. Após o período de incubação, o meio foi descartado e as células lavadas com tampão Hank's. A cultura celular em meio tampão Hank's foi submetida a 3 diferentes intensidades de irradiação (1, 3 e 5 J/cm²). Após a irradiação, as linhagens foram deixadas na estufa de CO₂ por um período de 24 horas, e então foi realizado o ensaio de MTT para a avaliação da viabilidade celular. Os dados encontrados por este teste foram tratados estatisticamente pelo método Students T-Test ANOVA com N=3 e P<0,05.

A figura 33 apresenta a fototoxicidade do ZnC₄P, H₂C₄P e TPP na presença de luz laser.

Figura 33. Porcentagem de viabilidade celular por dose de luz irradiada, onde as células J774-A.1 foram pré-incubadas com 4 μ M de ZnC_4P , $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e TPP em meio de cultura DMEN. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos irradiados foi determinada por one-way ANOVA, seguida pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias $\pm$ SEM (n=3). Valores de P. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001, p com relação ao controle.

Durante os experimentos, o controle celular foi incubado com DMEM com 10% de SBF e foi irradiado com foto polimerizador nas três diferentes potências.

Os resultados obtidos indicaram que a luz não afeta a viabilidade celular, pois não foi observada alteração na atividade basal da linhagem celular em estudo. Por outro lado, o uso da luz do foto polimerizador apresentou uma diminuição da porcentagem de células viáveis em relação ao aumento da dose irradiada, resultado

este também observado em outros estudos de fotossensibilizadores (Stasio et al., 2005).

Para os experimentos onde TPP foi utilizada, observou-se uma maior porcentagem de células viáveis em relação aos demais fármacos ($95,33 \pm 4$ % de células viáveis para uma dose de 1 Jcm^2 ; $90,5 \pm 4$ % de células viáveis para uma dose de 3 Jcm^2 ; $89,1 \pm 2$ % de células viáveis para uma dose de 5 Jcm^2). Já para os experimentos com a $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, observamos um efeito maior causado pela irradiação ($81,5 \pm 7,0$ % de células viáveis para uma dose de 1 Jcm^2 ; $73,5 \pm 1,5$ % de células viáveis para uma dose de 3 Jcm^2 ; $50,0 \pm 8,5$ % de células viáveis para uma dose de 5 Jcm^2) e para os experimentos com a ZnC_4P o efeito da irradiação foi ainda mais pronunciado ($67,5 \pm 3$ % de células viáveis para uma dose de 1 Jcm^2 ; $56,9 \pm 4$ % de células viáveis para uma dose de 3 Jcm^2 e $44,1 \pm 3$ % de células viáveis para uma dose de 5 Jcm^2).

Estes resultados estão de acordo com nossos estudos, pois fotossensibilizadores com maior caráter anfifílico apresentaram uma maior taxa de incorporação em relação ao fotossensibilizador hidrofóbico TPP.

Os experimentos de fotoinativação dos macrófagos (J774A-1) mostraram que o ZnC_4P foi o mais efetivo na inativação das células quando comparado com a $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$. Estes resultados estão de acordo com os estudos fotoquímicos e fotofísicos desses fármacos, onde observou-se um maior rendimento quântico tripleto para fotossensibilizador ZnC_4P do que o encontrado para o fotossensibilizador $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$.

Tal comportamento é esperado para metaloporfirinas, em geral com metais de transição, como, Zn, Cu, Ga, Si.

IV.2.3.2 Avaliação da fototoxicidade dos fármacos fotossensibilizadores em meio lipossomal.

Também realizamos estudos onde o efeito da luz foi avaliado sobre os fármacos fotossensibilizantes $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e ZnC_4P em meio lipossomal na cultura celular (células J774-A.1). Neste experimento, as concentrações dos fotossensibilizadores em meio lipossomal foram fixadas em $4\mu\text{M}$, sendo os mesmos incubados com aproximadamente 1×10^6 células/mL, por um intervalo de tempo de 7 horas a 37°C em uma estufa de CO_2 . Após o período de incubação, o meio foi descartado e as células lavadas com tampão Hank's. A cultura celular em meio tampão Hank's foi submetida a 3 diferentes intensidades de irradiação (1, 3 e 5 J/cm^2). Após a irradiação, as linhagens foram deixadas na estufa de CO_2 por um período de 24 horas, e então foi realizado o ensaio de MTT para a avaliação da viabilidade celular.

Os resultados de fototoxicidade do $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio lipossomal na ausência e na presença de diferentes intensidades de luz estão na figura 34 e foram comparados aos resultados de fototoxicidade do mesmo fotossensibilizador em meio homogêneo.

Figura 34. Porcentagem de células viáveis após serem incubadas por uma solução 4 μM $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio de cultura DMEN, e 1 μM $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ lipossomal em meio de cultura DMEN com 10 % de soro bovino fetal pela linhagem celular J774-A.1 e posteriormente irradiadas. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos irradiados foi determinada por one-way ANOVA, seguida pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias $\pm$ SEM (n=3). Valores de P. *p<0,05 e **p<0,01, p com relação ao controle.

Com base nos resultados encontrados, pode-se observar que embora a concentração do fármaco fotossensibilizador $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ em meio lipossomal seja menor (1 μM) que a dos estudos onde o fotossensibilizador em meio homogêneo (4

μM), estes apresentaram efeito fototóxico muito próximos. Estes resultados reforçam a idéia de que a localização subcelular dos fármacos em organelas aumenta a eficiência fotodinâmica (Ricchelli et al., 1991).

Para os estudos de fototoxicidade do fármaco fotossensibilizador ZnC_4P em meio lipossomal, também observou-se uma eficiência fotodinâmica, pois novamente, com uma menor concentração ($1\mu\text{M}$) do fármaco fotossensibilizador, observamos um efeito fototóxico da mesma ordem do fármaco fotossensibilizador provindo do estoque em DMSO de concentração final de $4\mu\text{M}$ para a intensidade de 5 Jcm^2 .

Figura 35. Porcentagem de células vivas após serem incubadas por uma solução $4\mu\text{M}$ ZnC_4P em meio de cultura DMEN, e $1\mu\text{M}$ ZnC_4P lipossomal em meio de cultura DMEN com 10 % de soro bovino fetal pela linhagem celular J774-A.1 e posteriormente irradiadas. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros

grupos irradiados foi determinada por one-way ANOVA, seguida pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias $\pm$ SEM (n=3). Valores de P. *p<0,05 e **p<0,01, p com relação ao controle.

Todos os resultados apresentados possuem significado estatístico (P<0,05) em relação ao controle, isso é, as 3 diferentes doses de luz testadas e aplicadas à células na presença dos fármacos H₂C₄P e ZnC₄P provocam morte celular.

Como os tecidos tumorais apresentam uma atividade metabólica acelerada, torna-se vantajoso o uso de sistemas lipossomais que oferecem a possibilidade de se controlar a biodistribuição do fármaco fotossensibilizador entre os tecidos tumorais e peritumorais. Sendo assim, com base em nossos resultados obtidos, torna-se viável também o estudo de nossos fármacos em meio lipossomal

Os experimentos de fotoinativação com os macrófagos (J774A-1) mostraram que o ZnC₄P em meio lipossomal foi mais efetivo na inativação das células quando comparado com o H₂C₄P em meio lipossomal (Figura 36).

Figura 36. Porcentagem de células vivas após serem incubadas por uma solução 1 μ M $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ lipossomal e ZnC_4P lipossomal em meio de cultura DMEN com 10 % de soro bovino fetal pela linhagem celular J774-A.1 e posteriormente irradiadas. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes. A análise da significância estatística entre o controle e os outros grupos irradiados foi determinada por one-way ANOVA, seguida pelo teste-t Newman-Keuls para comparações múltiplas. Os resultados obtidos representam as médias $\pm$ SEM (n=3). Valores de P. *p<0,05 e **p<0,01, p com relação ao controle.

Frente aos resultados encontrados e aos já conhecidos, como: que os lipossomos são facilmente incorporados por diferentes tipos de células de mamíferos; que uma vez suspensos em meio fisiológico, podem ser facilmente injetados em animais e que o transporte de fármacos fotossensibilizadores na corrente sangüínea via vesículas lipossomais apresenta uma maior retenção e seletividade da droga nos tecidos tumorais (Ricchelli et al., 1991), podemos concluir como um ponto favorável a incorporação de nossos fotossensibilizadores

em sistemas lipossomais antes de sua administração *in vivo* para maior eficiência do processo fotodinâmico.

Em todos os experimentos, tanto em meio DMEM quanto em meio lipossomal, os resultados estão de acordo com os estudos fotoquímicos e fotofísicos desses fármacos, onde a produção de oxigênio singlete do fotossensibilizador ZnC_4P foi maior que a do fotossensibilizador $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, apresentando assim um maior efeito fototóxico.

Estes estudos preliminares para os compostos ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, primeiramente realizados por nós (características fotofísicas e fotobiológicas), indicam importante potencial de aplicação deste derivado éter de coroa no uso da TFD.

IV.2.4. Estudo da influência do éter de coroa na membrana plasmática.

A membrana plasmática cumpre uma vasta gama de funções. A primeira, considerando-se a própria célula, é a estrutura que confere ao sistema individualidade, definindo meios intra e extracelular. Sua presença forma ambientes únicos e especializados, cuja composição e concentração molecular de íons são consequência de uma permeabilidade seletiva da mesma e dos diversos meios de comunicação através da membrana com o meio extra-celular.

Além de delimitar o ambiente celular, compartimentalizando moléculas, a membrana plasmática representa o primeiro elo de contato entre os meios intra e extracelular, viabilizando informações para o interior da célula, permitindo com que a mesma responda a inúmeros estímulos externos que podem, inclusive, influenciar em sua atividade e funções biológicas. Nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular a membrana plasmática participa de forma decisiva. É, por exemplo, através de componentes da membrana que células semelhantes podem se reconhecer levando ao processo de agregação e formação de tecidos.

As membranas celulares consistem em uma dupla camada contínua de lipídios com diferentes proteínas, onde carboidratos e nutrientes das mais diversas naturezas interagem das mais diversas maneiras. É justamente a dupla camada lipídica (figura 37) que confere estabilidade e flexibilidade, ao mesmo tempo, à membrana. Pode-se dizer, portanto, que os lipídios são os componentes que compõem a estrutura básica da membrana.

Figura 37. Figura esquemática da membrana plasmática

Como a membrana celular delimita o meio intra e extracelular, é necessário que formas de transporte e de comunicação sejam constantemente estabelecidas. Os transportes através da membrana podem ou não envolver gasto de energia, sendo classificados como ativo ou passivo, respectivamente. Exemplos de transporte passivo são as difusões simples (figura 38). As bombas de íons são exemplos de transportes ativos.

Figura 38. Figura esquemática do transporte passivo através da membrana.

Um dos objetivos de nosso trabalho nessa tese de doutorado foi a incorporação de éteres de coroa na membrana plasmática, pois estudos têm demonstrado que ao se incorporar éter de coroa na membrana plasmática, ocorre a formação de nanotubos ou nano poros. Os éteres de coroa possuem a capacidade de formar canais pela associação de moléculas idênticas, além de poderem adaptar-se à espessura da membrana plasmática, formando assim um novo canal iônico, específico para íons dependendo do tamanho da cavidade do éter de coroa(Otto , Osifchin e Regen, 1999; Voyer e Robitaille, 1995). Por exemplo: para o 18-crow-6 éter de coroa, forma-se um canal específico para íons potássio, e para o 15-crow-5 éter de coroa, um canal específico para íons sódio.

Quando presentes na membrana plasmática, esses canais são responsáveis pelas alterações na distribuição de íons entre a região interna e externa do sistema celular. Essa capacidade de transporte do éter de coroa através da membrana

plasmática pode ser muito útil no processo de ação fotodinâmica. Estudos de Specht sobre o mecanismo que desencadeia a morte da célula após a ação fotodinâmica demonstraram que a resposta celular é fruto de um dano nas proteínas que transportam íons sódio, potássio e cálcio na membrana plasmática, gerando um stress osmótico, que desencadeia uma sequência de outros eventos celulares(Specht e Rodgers, 1990b).

Sendo assim, a presença do éter de coroa na estrutura do fotossensibilizador ou concomitante ao fotossensibilizador, em associação não covalente num sistema vesicular, deve potencializar a ação fotodinâmica.

Já o monitoramento deste equilíbrio homeostático tem sido estudado nos últimos anos por técnicas espectrofluorimétricas altamente sensíveis, como as sondas de resposta lenta e sondas de resposta rápida. Sondas de resposta lenta demoram entre poucos segundos a vários minutos até atingirem o equilíbrio na partição e são adequadas para medir variações de potencial de membrana celular; as sondas de resposta rápida são adequadas para respostas de variação de potencial mais rápidas que ocorrem em nervos e músculos(ref Haugland 2002).

Sendo assim, o desequilíbrio da homeostase dos íons sódio e potássio, foi avaliado por sondas fluorescentes de resposta lenta, do tipo diSBA-C₂, que é um ânion lipofílico.

Figura 41. Representação da sonda incorporada à bicama fosfolipídica.

A formação de dímeros não fluorescentes da sonda diSBA-C₂ tem sido considerada como a principal causa na mudança de fluorescência, pois quando ocorre um aumento da concentração da sonda no citossol, diminui a fluorescência, fenômeno este observado quando ocorre hiperpolarização; quando ocorre uma diminuição da concentração da sonda no citossol, aumenta a fluorescência, fenômeno este observado na despolarização. Este comportamento celular frente às alterações na homeostase iônica é o fato principal que irá potencializar a TFD clássica nesta nova categoria de TFD dita Terapia Fotodinâmica Sinérgica.

IV.2.4.1 Estudos com a sonda fluorescente bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C₂, durante processo de hiperpolarização da membrana plasmática das células J774-A.1.

Nos estudos sobre o monitoramento da influência dos ligantes éter de coroa sobre a homeostase celular, utilizou-se o bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C₂, conforme descrito no item III.4.2.4.1, que é uma

sonda que não se acumula na mitocôndria, e é seletiva para o monitoramento do potencial elétrico trans-membrana(Plásek e Sigler, 1996).

A membrana celular de células eucarióticas possui um potencial de membrana da ordem de 50 a 70 mV, sendo que a concentração de potássio intracelular é de 140 mM, e de sódio é de 12 mM, e a concentração extracelular dos respectivos íons é de 4 mM para o potássio e 145 mM para o sódio, conforme demonstrado no esquema da Figura 39.

Sendo assim, ao adicionarmos alíquotas crescentes de íons sódio, o efeito que observamos é o de hiperpolarização da membrana, e ao adicionarmos alíquotas crescentes de potássio, observa-se o efeito contrário, ou seja: o processo de despolarização da membrana plasmática.

Figura 39. Concentração de íons sódio e potássio intra e extracelular.

A Figura 40 mostra o efeito do aumento da concentração externa de sódio, $[Na^+]$, na intensidade de fluorescência da linhagem de células J774-A.1 suspensas

em meio tamponado (Hank's), contendo 1 μM de di-SBA- C_2 . Observou-se uma diminuição sucessiva da intensidade de fluorescência, a medida em que se adicionou alíquotas de sódio, atingido uma máxima na supressão da fluorescência de 60% quando a concentração extracelular de sódio chegou a 180 mM, o que indicou que as células estavam em hiperpolarização.

Figura 40. Efeito na intensidade de fluorescência da sonda diSBA- C_2 (excitação em 500 nm) pelo acréscimo de íons sódio, na ausência do fármaco, medido através da sonda di-SBA- C_2 . A curva (-) refere-se à intensidade de fluorescência na ausência do sal e a curva (-) refere-se à emissão de fluorescência após a adição de íons sódio, até a concentração de 160 mM, à suspensão celular, ocorrendo assim hiperpolarização nas células J774-A.1

No entanto, quando as células foram pré-incubadas com ZnC_4P por 4 horas e em seguida incubadas com di-SBA- C_2 , conforme descrito no item III.4.2.4.1, e posteriormente tratadas com concentrações variadas e crescentes de íons sódio, a intensidade de emissão de fluorescência foi reduzida com uma supressão máxima de 37%, (figura 41).

Figura 41. Efeito na intensidade de fluorescência da sonda diSBA-C₂ (excitação em 500 nm) pelo acréscimo de íons sódio, na presença do fármaco ZnC₄P, medido através da sonda di-SBA-C₂. A curva (-) refere-se à intensidade de fluorescência na ausência do sal e a curva (-) refere-se à emissão de fluorescência após a adição de íons sódio, até a concentração de 160 mM, à suspensão celular, ocorrendo assim hiperpolarização nas células J774-A.1

Este comportamento observado foi devido à presença dos ligantes éteres de coroa ligados covalentemente ao fármaco fotossensibilizador ZnC₄P. Os nano canais criados permitiram um fluxo de íons sódio através da membrana plasmática, minimizando a diferença de potencial trans-membrana, com concomitante inibição da emissão de fluorescência. Estes resultados foram idênticos aos observados nos estudos realizados com monesin, um ionóforo clássico e específico para íons sódio. Nestes estudos, a adição crescente de NaCl (na faixa de 145 a 160 mM) levou à uma redução na intensidade de fluorescência da mesma ordem de magnitude da observada na presença do fármaco

fotossensibilizador, indicando claramente um efeito na hiperpolarização e comprovando a proposta de que o fármaco contendo os grupos éter de coroa podem atuar como fotossensibilizador e como ionóforo sinergicamente. O mesmo comportamento observado para o ionóforo monesin foi observado em outros estudos realizados por Fyles com ionóforos e canais trans-membrana(Fyles et al., 1993).

A Figura 42 apresenta de forma esquemática uma explicação para o efeito observado no qual o fármaco fotossensibilizador atua como um ionóforo indicado por um processo de hiperpolarização decorrente da adição de cloreto de sódio no meio celular. Este efeito ocorre diretamente sobre a bicamada lipídica da membrana plasmática.

Figura 42. Forma esquemática da incorporação do fotossensibilizador na bicamada lipídica. Formam-se nano-poros que afetam o transporte de íons sódio através da mesma.

Nos experimentos “*in vitro*” (na ausência do fármaco ZnC_4P) onde se variou a concentração de íons potássio extracelular, foi observado um aumento da

intensidade de emissão de fluorescência da sonda di-SBA-C₂ em resposta a um processo de despolarização (figura 42). Resultados similares a estes foram observados pela adição do ionóforo monesin, também específico para íons potássio.

Figura 43. Efeito na intensidade de fluorescência da sonda diSBA-C₂ (excitação em 500 nm) pelo acréscimo de monesin até a concentração de 48 μ M. A curva (-) refere-se à intensidade de fluorescência na ausência do monesin e a curva (-) refere-se à emissão de fluorescência após a adição do antibiótico monesin, até a concentração de 48 μ M, à suspensão celular, ocorre a despolarização nas células J774-A.1

No entanto, para experimentos onde as células foram incubadas como fármaco fotossensibilizador ZnC₄P, a variação na concentração de KCl na faixa de 4 mM a 150 mM não demonstrou efeito do fármaco, o que mostra a especificidade do 15-crow-5 para íons sódio.

Infelizmente, por problemas sintéticos, não foi possível a obtenção de uma porfirina ou uma ftalocianina ligada covalentemente à uma molécula de 18-crown-6 éter de coroa, a qual possibilitaria estudar a influência do éter de coroa nas medidas do potencial de membrana frente à alteração na homeostase de íons potássio comprovando, assim, a especificidade por íons potássio decorrente do tamanho da cavidade deste éter de coroa. Estudou-se, então, a influência do 18-crown-6 éter de coroa no processo de despolarização pela preparação de um complexo de associação em um sistema de liberação biomimético (lipossomal) contendo a ftalocianina e o 18-crown-6 éter de coroa. Embora esse sistema seja um sistema dinâmico, vários trabalhos na literatura comprovam e suportam a idéia do uso de sistemas lipossomais como sistema de veiculação compartilhado (Moghimi e Patel, 1989; New, 1990; Nunes, S. M., 1999).

IV.2.4.2 Estudos com a sonda fluorescente bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA-C₂, durante processo de despolarização da membrana plasmática das células J774-A.1.

Uma vez conhecido o mecanismo de resposta da sonda diSBA-C₂, utilizamos o protocolo de Rodgers (Specht e Rodgers, 1990b) para quantificar a diferença de potencial de membrana das células J774.A1. O procedimento de calibração utilizado baseou-se na despolarização das células, sendo que para a despolarização foi usado um ionóforo conhecido chamado monesin, que é um ionóforo para íons sódio e potássio, até a concentração de 48 µM.

Alternativamente, também adicionamos alíquotas de KCl (3mM) até alcançarmos a total despolarização (4,0 a 140,0 mM)(Specht e Rodgers, 1990b).

Assim como em estudos anteriores com a sonda diSBA-C₂ (Seligmann e Chused, 1985; Specht e Rodgers, 1990b), observou-se um aumento linear na mudança de intensidade de fluorescência (ΔF) versus o log da concentração na faixa de concentração de 4,0 a 100,0 mM de íons potássio ao meio extracelular, registrado e apresentado na figura 46.

Figura 44. Curva de calibração do potencial de membrana para as células J774-A.1 na ausência do éter de coroa.

A figura 44 indica o efeito do aumento da concentração de potássio extracelular, $[K^+]_o$, na intensidade de fluorescência das células J774-A.1 em solução Hank's contendo di-SBA-C₂ (0,5 μM). A concentração máxima alcançada $[K^+]_o$ foi de 140 mM. No entanto, para concentrações acima de 100

mM, foi observado um efeito do sal na resposta celular indicando a completa despolarização nesta concentração. Resultados análogos foram observados pela adição de monesin para a despolarização das células J774-A.1.

A figura 45 apresenta o efeito do 18-crow-6 éter de coroa na porcentagem de variação da diferença de potencial elétrico, para células tratadas previamente incubadas com o 18-crow-6 éter de coroa (16 μ M) em meio lipossomal.

Figura 45. Curva do potencial de membrana para células J774-A.1 previamente incubadas com éter de coroa.

O efeito do éter de coroa na mudança do potencial de membrana foi determinado seguindo protocolo descrito no item III.4.2.4. Observou-se um comportamento análogo ao anterior, onde a % ΔF aumenta de forma linear o log da concentração dos íons potássio até a concentração máxima de 100 mM.

Realizou-se o mesmo experimento, sendo que incubamos as células com ZnPc concomitantemente com o 18-crow-6 éter de coroa (16 μ M) em meio lipossomal, e pôde-se observar que a porcentagem de variação de fluorescência foi da mesma ordem. Na tabela 7 estão apresentados os valores da porcentagem de variação de fluorescência e a porcentagem de mudança do potencial de membrana.

Tabela 7- Porcentagem da variação de fluorescência e porcentagem da variação da diferença de potencial.

	%ΔF	%$\Delta\Psi$
Estudo com antibiótico (monesin)	18	81
Estudo com variação da concentração de K^+ .	22	100
Estudo com éter de coroa lipossomal.	8	53
Estudo com éter de coroa e ftalocianina lipossomal.	7	47

De acordo com estes resultados, pôde-se observar que nos estudos com o antibiótico monesin, não foi observada uma total despolarização. Esse comportamento já havia sido observado em estudos similares, onde concluiu-se que para ocorrer a despolarização total, foi necessária a presença de gramicidina (Waggoner , Sirkin e Tolles, 1975).

Também observou-se que a presença do éter de coroa diminui a porcentagem de variação da intensidade de fluorescência frente ao acréscimo de íons potássio. Esse comportamento repercute diretamente no processo de despolarização da membrana plasmática nesta linhagem de células J774-A.1, onde

observou-se que a formação de canais de íons potássio diminui a diferença de potencial elétrico trans-membrana, comprovando assim que o éter de coroa interfere de certa forma na homeostase celular, como esperado para um agente extra-celular.

Esses resultados indicaram que os ligantes éter de coroa, na estrutura do fármaco ou utilizados concomitantemente, corroboram com a ação fotodinâmica dos fotossensibilizadores. Em estudos sobre a ação dos fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica, observou-se um aumento da permeabilidade da membrana celular para íons potássio. Este fato é tido como um evento imediato da ação fotodinâmica. Portanto, os ligantes éter de coroa específicos para potássio podem e devem estar potencializando a ação fotodinâmica (Specht e Rodgers, 1990b; Specht e Rodgers, 1991a).

V. Conclusões:

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

A análise das propriedades espectroscópicas no estado estacionário e também resolvido no tempo da 5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)2,3,5,6-(tetrafluoro) fenil]porfirina (H_2C_4P), e da Zn(II)5,10,15,20-tetrakis[4-(1,4,7,10,13-pentaoxaciclopentadecane-2-aminometil)2,3,5,6-(tetrafluoro)fenil]-porfirinato (ZnC_4P), indicou que essas porfirinas possuem excelentes propriedades para a TFD.

Os resultados mostraram que as propriedades espectroscópicas destes compostos não diferem muito das dos compostos porfirínicos normalmente usados nos estudos clínicos da TFD (Batlle, 1993; Dougherty, 1984; Gouterman, 1978). Os mesmos indicaram estar ocorrendo, como esperado, um cruzamento inter-sistemas eficiente e concomitante à produção de estados excitados tripletes ativos na TFD. Na presença de oxigênio molecular, tem-se a produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio.

Os valores encontrados de rendimento quântico de produção do estado excitado triplete (Φ_T) para ZnC_4P foi de $0,73 \pm 0,06$ e para H_2C_4P foi de $0,62 \pm 0,05$. Para esta última, o processo de fotooxidação do Tipo II foi dominante, como observado para outras porfirinas (Sobolev, Jans e Rosenkranz, 2000), visto que

este comportamento leva à uma maior produção de oxigênio singlete da porfirina base livre $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ ($\Phi_{\Delta} = 0,62$).

No entanto, para o fotossensibilizador metalado ZnC_4P , os resultados mostraram que a presença do Zn impede uma eficiência completa na transferência de energia do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular, pois o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete foi menor, $\Phi_{\Delta} = 0,46$. Sendo assim, o processo Tipo I, neste caso, foi o mecanismo de desativação dominante, o que leva à produção de outros ROS. Ambos os valores foram altos o suficiente para causar dano nas células tumorais.

Nos estudos de citotoxicidade para diferentes concentrações dos fármacos fotossensibilizadores na ausência de luz, concluiu-se que a concentração ideal foi a de $4\mu\text{M}$, e nos estudos de viabilidade celular nos diferentes meios fisiológicos, observou-se que o meio DMEM com 10% de soro bovino fetal (SBF) foi o mais indicado para realizar o estudo de cinética de incorporação em relação ao tempo de incubação.

Nos estudos de cinética de incorporação do fotossensibilizador ZnC_4P em meio homogêneo e em meio micro heterogêneo, observou-se que o ápice de incorporação foi alcançado em 7 horas de incubação.

A estrutura química e a lipofilicidade dos fotossensibilizadores são os fatores que afetam o mecanismo responsável pela taxa de incorporação do fotossensibilizador. Observou-se que na presença de SBF (10%) no meio de

incubação, a taxa de incorporação dos fármacos fotossensibilizadores $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e ZnC_4P é diferente do padrão descrito para transporte passivo (difusão passiva).

O mesmo comportamento não foi observado para TPP (meio homogêneo), que apresentou um comportamento padrão de difusão passiva (Alberts et al., 2002).

Os estudos de incorporação, com os fármacos fotossensibilizadores em meio lipossomal, indicaram que para $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ e ZnC_4P não houve uma influência da concentração do SBF e que para estes fármacos, o mecanismo operante é do tipo mediado por receptores que ativam o processo de endocitose.

Nos estudos de toxicidade na presença de luz, os resultados mostraram que os fármacos fotossensibilizadores ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$, que apresentaram uma maior taxa de incorporação graças ao seu caráter anfifílico, apresentaram também uma maior eficiência fotodinâmica em comparação ao fotossensibilizador hidrofóbico TPP.

Estes estudos nos indicaram o importante potencial de aplicação dos derivados éter de coroa, ZnC_4P e $\text{H}_2\text{C}_4\text{P}$ no uso da TFD.

Nos estudos que permitiram avaliar o efeito do ligante éter de coroa quanto à alteração na homeostase intracelular de íons Na^+ e K^+ , utilizou-se a sonda fluorescente de resposta lenta bis-(ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetina oxonol, diSBA- C_2 .

Devido à presença dos ligantes éteres de coroa no fármaco fotossensibilizador ZnC_4P , observou-se que houve uma minimização da diferença

de potencial trans-membrana no efeito de hiperpolarização causado pela adição de NaCl. Esses resultados foram confirmados nos estudos com o ionóforo monesin, que comprovou a proposta de que o fármaco contendo os grupos éter de coroa pode atuar como fotossensibilizador e como ionóforo sinergicamente, modulando a atividade iônica celular.

Nos experimentos onde se variou a concentração de potássio extracelular, foi observado um aumento da intensidade de emissão de fluorescência da sonda di-SBA-C₂ em resposta a um processo de despolarização.

Na última etapa do trabalho, foram definidos parâmetros para quantificar a influência do 18-crown-6 éter de coroa, que é específico para íons potássio, no processo de despolarização. Concluiu-se que o éter de coroa minimiza a diferença de potencial da mesma ordem de magnitude de quando está associado à ZnPC na formulação lipossomal, da ordem de 50%, o que mostrou que a ZnPc não interfere na formação dos canais de potássio formados pelos 18-crow-6 éter de coroa.

Os resultados indicaram um importante potencial de aplicação do ligante éter de coroa associado à ZnPc no uso da TFD, visto que o éter de coroa não modificou as características fotofísicas e fotoquímicas dos fotossensibilizadores.

Por problemas encontrados na síntese, não foi possível isolar a ftalocianina conjugada ao éter de coroa. No entanto, os estudos realizados nesse trabalho com o éter de coroa associado à ftalocianina em sistemas heterogêneos demonstraram que esses sistemas influenciam no equilíbrio homeostático da membrana

plasmática, o que pode potencializar a ação fotodinâmica, comprovando assim a importância desses derivados.

VI. Referências Bibliográficas

AKITA, Y. et al. Enhancement of the photodynamic effects on human oral squamous cell carcinoma cell lines by treatment with calcipotriol. **Journal of Dermatological Science Supplement** , v.2, n.1, p.S57-S64, 2007.

ALBERTS, B. et al **Molecular Biology of the Cell**. 4th.ed. New York: Garland Publishing Co, ed. 3rd edition. 2002

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.

AMAND, B.; BENSASSON, R. Determination of triplet quantum yields by laser flash absorption spectroscopy. **Chemical Physics Letters** , v.34, p.44-48, 1975.

ANDERSON, R. R. **Photoimmunology-Tissue Optics and Photoimmunology**. John A.Parrish.ed. New York: Plenum Publishing Corporation, 1983

ARBOGAST, J. Photophysical Properties of C60. **Journal of Physical Chemistry** , v.95, p.11-15, 1991.

AULER, H.; BANZER, G. Untersuchungen uber die rolle der porphyrine bei geschwulstkranken menschen und tieren. **Z.Krebsforsch** , v.53, p.65-68, 1942.

BALL, D. J. et al. A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of differing charge. **Photochemistry and Photobiology** , v.69, p.390-96, 1999.

BANFI, S. et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** , v.12, p.4853-60, 2004.

BATLLE, A. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy--a model for carcinogenesis. **Journal of Photochemistry and Photobiology-B** , v.20, n.1, p.5-22, 1993.

BENAMOR, T.; JORI, G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** , v.30, p.915-25, 2000.

BENHUR, E.; DUBBELMAN, T. M.; VANSTEVENINCK, J. Phthalocyanine-induced photodynamic changes of cytoplasmic free calcium in Chinese hamster cells. **Photochemistry And Photobiology** , v.54, p.163-66, 1991.

BENOÎT, D. S.; DIDELON, J.; BARBERI-HEYOB, M. The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. **European Journal of Medicinal Chemistry** , v.40, p.1111-22, 2006.

BONNET, R. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers , eds. Philips D., P. O'Brien, S. Roberts. 2000

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews Articles** , v.24, p.19-33, 1995.

BONNETT, R. et al. Photophysical properties of meso-tetraphenylporphyrin and meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**. v.48, p.271-76, 1988.

BRASSEUR, N.; QUELLET, R.; LAMADELEINE, C. Water-soluble aluminium phthalocyanine-polymer conjugates for PDT: photodynamic activities and pharmacokinetics in tumour-bearing mice. **British Journal of Cancer** , v.80, n.10, p.1533-41, 1999.

BROWN, G. C. et al. A Value-Based Medicine Comparison of Interventions for Subfoveal Neovascular Macular Degeneration. **Ophthalmology** , 2007.

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

CAUVIN J. F. **Des bienfaits de l'insolation**, 1815 (doutorado), Universidade de Paris, França, 1815.

CHAN, W. S.; BRASSEUR, N.; LAMADELEINE, C. Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. **European Journal of Cancer** , v.33, n.11, p.1855-59, 1997.

CHATTERJEE, S.; SRIVASTAVA, T. S. Spectral investigations of the interaction of some porphyrins with bovine serum albumin. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** , v.4, p.147-57, 2000.

CHEN, Y. H.; LI, G. L.; PANDEY, R. K. Synthesis of bacteriochlorins and their potential utility in photodynamic therapy (PDT). **Current Organic Chemistry** , v.8, p.1105-34, 2004.

CHEUNG, R.; SOLONENKO, M.; BUSCH, T. M. Correlation of in vivo photosensitizer fluorescence and photodynamic-therapy-induced depth of necrosis in a murine tumor model. **Journal of Biomedical Optics** , v.8, n.2, p.248-52, 2003.

CLENNAN, E. L. New mechanistic and synthetic aspects of singlet oxygen chemistry. **Tetrahedron** , v.56, p.9151-79, 2000.

COHEN, L. B.; SALZBERG, B. M. Optical measurement of membrane potential. **Reviews of Physiology, Biochemistry & Pharmacology** , v.83, p.35-88, 1978.

COREY, E. J.; MEHROTRA, M. M.; KHAN, A. U. Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. **Biochemistry Biophysics Research Commun** , v.145, p.842-46, 1987.

COSTA, C. S. et al. Topical photodynamic therapy for Bowen's disease of the digit in epidermolysis bullosa. **British Journal of Dermatology** , v.153, n.3, p.672-74, 2005.

CRISTIAN, G. D. Analytical strategies for the measurement of lithium in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** , v.14, p.899-908, 1996.

DARAIO, M. E. et al. Carboxylated zinc-phthalocyanines-II. Dimerization and singlet molecular oxygen sensitization in hexadecyltrimethylammonium bromide micelles. **Photochemistry And Photobiology** , v.54, p.367-73, 1991.

DARAIO, M. E.; ARAMENDÍA, P. F.; SAN ROMÁN, E. interaction of singlet and triplet excited states with the same quencher in micelles. **Chemical Physics Letter** , v.204, p.415-19, 1993.

DARWENT, J. R. et al. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. **Coordination Chemistry Reviews** , v.44, p.83-126, 1982.

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

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

DEPAOLI, V. M.; DEPAOLI, S. H.; BORISSEVITCH, L. E. Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH2 associated with micelles and DNA. **Journal of Alloys and Compounds** , v.344, n.1-2, p.27-31, 2002.

DICKSON, E. F. G.; GOYAN, R. L.; POTTIER, R. H. New Directions in Photodynamic Therapy. **Cellular and Molecular Biology** , v.48, p.939-54, 2003.

DONNELLY, R. F. et al. Delivery of photosensitisers and light through mucus: Investigations into the potential use of photodynamic therapy for treatment of Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis pulmonary infection. **Journal of Controlled Release** , v.117, p.217-26, 2007.

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: Part II. **Seminars in Surgery and Oncology** , v.11, p.333-34, 1995.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. **Journal of the National Cancer Institute** , v.55, p.115-21, 1975.

DOUGHERTY, T. J.; POTTER, W. R. Of what value is a highly absorbing photosensitizer in PDT ? **Journal of Photochemistry and Photobiology** , v.8, p.223-25, 1991.

DUPUIS, B. et al. Photoinduced intramolecular charge-transfer systems based on porphyrin-viologen dyads for optical limiting. **Chemical Physics Letters** , v.300, p.169-76, 1999.

EATON, F. Reference Material for Fluorescence Measurement. **Pure and Applied Chemistry** , v.60, n.7, p.1107-14, 1988.

ECHEGOYEN, L. E. et al. Aggregation of steroidal lariat ethers-the first example of nonionic liposomes (niosomes) formed from neutral crow-ether compounds. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications** , p.836, 1988.

ERMOLENKO, L. P.; DELAIRE, J. A.; GIANNOTTI, C. Laser flash photolysis study of the mechanism of photooxidation of alkanes catalysed by decatungstate anion. **Journal Chemical Society** , v.2, p.25-30, 1997.

ESSER, P.; POHLMANN, B.; SCHARF, H. D. The photochemical-synthesis of fine chemicals with sunlight. **Angewandte Chemie International Edition** , v.33, p.2009-23, 1994.

FALK, J. E. **Porphyrins and Metalloporphyrins**. Amsterdam: Elsevier, ed. London and New York Frydman. 1964

FILHO, G.; ET AL **Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular**. 5.ed. Belo Horizonte: Guanabara Koogan SA, 1994

FOLEY, M. S. C. et al. Excited triplet state photophysics of the sulphonated aluminium phthahlocyanines bound to human serum albumin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , v.38, p.10-17, 1997.

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

FRESHNEY, R. I. **Animal Cell Culture-A Practical Approach**. London: IRC Press, 1986

FYLES, T. M. et al. Assembly of ion channel mimics from a modular constructions set. **Journal of Organic Chemistry** , v.58, p.7456, 1993.

GERDES, R. et al. Photooxidations of phenol, cyclopentadiene and citronellol with photosensitizers ionically bond at a polymeric ion exchanger. **Polymers For Advanced Technologies** , v.12, p.152-60, 2001.

GOMER, C. J. Photodynamic therapy in the treatment of malignancies. **Seminars in Hematology** , v.26, p.27-34, 1989.

GORMAN, A. et al. In vitro demonstration of the heavy-atom effect for photodynamic therapy. **Journal of the American Chemical Society** , v.126, p.10619-31, 2004.

GOUTERMAN, M. In *The Porphyrins*. In: DOLPHIN, D. **Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings**. New York: Academic Press, 1978.p. 1-165.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Advances in Photodynamic Theory. **Optics & Photonics News** , v.July, p.16-21, 1996.

HARTGERINK, J. D.; CLARK, T. D.; GHADIRI, M. R. Peptide nanotubes and beyond. **Chemistry - A European Journal** , v.4, p.1367-72, 1998.

HAUSMANN, W. Die senibilisierende wirkung des hematoporphyrins. **Biochemie Zeitung** , v.30, p.276-316, 1911.

HENDERSON, B. W. et al. Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. **Cancer Research** , v.60, p.525-29, 2000.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. How does photodynamic therapy work? **Photochemistry And Photobiology** , v.55, p.145-57, 1992.

HU, M.; BRASSEUR, N.; YILDIZ, S. Z. Hydroxyphthalocyanines as potential photodynamic agents for cancer therapy. **Journal of Medicinal Chemistry** , v.41, n.11, p.1789-802, 1998.

JAKOBSSON, E. Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters. **American Journal of Physiology - Cell Physiology** , v.238, p.C196-C206, 1980.

JORI, G. Tumor photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , v.36, p.87-93, 1996.

JUZENIENE, A.; NIELSEN, K. P.; MOAN, J. Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology** , v.25, p.7-28, 2006a.

KAISERMAN, I. et al. Cataract Surgery Is Associated with a Higher Rate of Photodynamic Therapy for Age-Related Macular Degeneration. **Ophthalmology** , v.114, n.2, p.278-82, 2007.

KELLY, J. F.; SNELL, M. E. Hematoporphyrin derivative: a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. **Journal of Urology** , v.115, p.150-51, 1976.

KOCHEVAR, I. E. et al. Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. **Biochimica Et Biophysica Acta** , v.1280, p.223-30, 1996.

KORBIER, J. Untersuchung von krebsgewebe im fluoreszenzerregenden licht. **Strahlentherapie** , v.41, p.510-18, 1931.

KREMER, J. M. H. et al. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection. **Biochemistry** , v.16, n.17, p.3932-35, 1977.

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

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Segunda Edição.ed. São Paulo: ed. Sarvier. 1995

LIMA, R. G. et al. Influence of ancillary ligands L in [Ru(L) (terpy) NP]³⁺ complex in the nitric oxide photo-release and its vasodilator activity based on visible light irradiation. **Inorganic Chemistry** , v.359, p.2543-49, 2006.

LIPSON, R. L.; GRAY, M. L.; BALDES, E. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Ninth Internat.Cancer Congr., Tokyo, Japan** , p.393, 1966.

LOEW, L. M. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity. In: **Potentiometric membrane dyes**. San Diego, CA: Academic Press, 1993.p. 150-160.

LOPES, N. P.; STARK, C. B. W.; HONG, H. A study of the effect of pH, solvent system, cone potential and the addition of crown ethers on the formation of the monensin protonated parent ion in electrospray mass spectrometry. **Analyst** , v.126, n.10, p.1630-32, 2001.

LUKYANETS, E. A. Near-Infrared Dyes for High Technology Applications. In: DAEHNE, S., RESCHGENDER, U., WOLFBEIS, O. S. **Near-Infrared Dyes for High Technology Applications**. Kluwer: Dordrecht, 1998.p. 307

LUKYANETS, E. A. Phthalocyanines as photosensitizers in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** , v.3, p.424-32, 1999.

LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Synthesis, Photophysical and Photobiological study of synergic photosensitizer: zinc-phthalocyanine with Ca²⁺ chelating agent. **Current Organic Chemistry** , 2006.

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

MACHADO, A. E. H. Photodynamic therapy: principles, potential of application and perspectives. **Química Nova** , v.23, p.237-42, 2000.

MAGDE, D. Absolute luminescence yield of cresyl violet. A standard for the red. **Journal Physical Chemistry** , v.83, p.696-99, 1979.

MCMURRAY, W. C.; BEGG, R. W. Effect of Valinomycin on Oxidative Phosphorylation. **Letters To The Editors** , p.546, 1959.

MERRILL, A. B. Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancer. **Current Oncology Reports** , v.4, p.87-96, 2002.

MEYER-BETZ, F. Untersuchungen uber die biologische (photodynamische) wirkung des hamatopotphyrins und anderer derivative des blut- und galenfarbstoffs. **Dtsch.Arch.Klin.Med.** v.112, p.476-503, 1913.

MICHAUDET, L.; RICHARD, P.; BOITREL, B. Synthesis and X-ray characterization of a new bis-crown ether porphyrin. **Tetrahedron Letters** , v.41, n.43, p.8289-92, 2000.

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

MOGHIMI, S. M.; PATEL, H. M. Serum opsonins and phagocytosis of saturated and unsaturated phospholipid liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta** , v.984, p.384-87, 1989.

MOORE, R. B. et al. A comparison of susceptibility to photodynamic treatment between endothelial and tumor cells in vitro and in vivo. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** , 2007.

MORGAN, J.; WHITAKER, J. E.; OSEROFF, A. R. GRP78 induction by calcium ionophore potentiates photodynamic therapy using the mitochondrial targeting dye Victoria Blue BO. **Photochemistry And Photobiology** , v.67, n.1, p.155-64, 1998.

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.

NEW, R. R. C. **Liposomes: a practical approach, The practical approach series.** New york: IRL Press, ed. Oxford. 1990

NICKON, A.; SILVERSMITH, E. F. **Organic Chemistry, the game: Modern coined terms and their origins.** New York: Pergamon Press, 1987

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 Medicine** , v.34, n.8, p.997-1005, 2003.

NUNES S. M. **Estudos Fotoquímicos e Fotofísicos das Interações entre Ftalocianinas e Lipossomos.**, Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto-SP ,1999.

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

NUNES S. M. T. **A potencialidade do uso de diferentes sistemas de liberação de framacos na terapia fotodinâmica: preparação e estudos fotofísicos.**2003,102f Tese (doutorado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto,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, p.273-84, 2004b.

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

OBOCHI, M. O. K.; BOYLE, R. W.; VAN LIER, J. E. Biological activities of phthalocyanines. XIII. The effects of human serum components on the in vitro uptake and photodynamic activity of zinc phthalocyanine. **Photochemistry And Photobiology** , v.57, n.4, p.634-40, 1993.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , v.39, p.1-18, 1997.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochemical & 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, 2006** 162 f. Tese (doutorado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto,2006.

OLIVEIRA, D. M. et al. Zinc phtahlocyanine/magnetic fluid complex: A Promising dual nanostrucutered system for cancer treatment. **Journal Of Nanoscience Et Nanotecnology** , v.6, n.8, p.2432-37, 2006.

OSTLER, R. B. et al. The effect of pH on the photophysics and photochemistry of di-sulphonated aluminum phthalocyanine. **Photochemistry and Photobiology**. v.71, p.397-404, 2000.

OTTO, S.; OSIFCHIN, M.; REGEN, S. L. Modular control over the selectivity of self-assembling and membrane-spanning ion conductors. **Journal of the American Chemical Society**, v.121, p.7276-77, 1999.

OWENS, J. W. et al. Photophysical properties of porphyrins, phthalocyanines and benzochlorins. **Inorganic Chemistry Acta**, v.279, p.226-31, 1998.

PANDEY, R. K. Recent advances in photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.4, p.368-73, 2000.

PANDEY, R. K. et al. Alkyl ether analogs of chlorophyll-a derivatives: Part1. Synthesis, photophysical properties and photodynamic efficacy. **Photochemistry And Photobiology**, v.64, p.194-204, 1996.

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

PEDERSEN, C. J. Ionic Complexes of Macrocyclic Polyethers. **Federation Proceedings**, v.27, n.6, p.1305-09, 1968.

PEDERSEN, C. J.; FRENSDORFF, H. K. Macrocyclic Polyethers and Their Complexes. **Angewandte Chemie International Edition**, v.11, p.16-25, 1972.

PELEGRINO, A. C. et al. Photophysical properties of crowned ether porphyrins. **Photochemistry And Photobiology**, v.81, p.771-76, 2005.

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

PLÁSEK, J.; SIGLER, K. Slow Fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p.101-24, 1996.

PLATT, J. R. In Radiation Biology. In: HOLLAENDER, A. **In Radiation Biology**. New York: McGraw-Hill Book Co, 1956. v.Vol III, cap.Chapter 2,p. 71-123.

POLICARD, A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de wood. **C.R.Soc.Biol.** v.91, p.1423-28, 1924.

PREGEL, M. J.; JULLIEN, L.; LEHN, J. M. Towards artificial ion channels-transport of alkali-metal ions across liposomal membranes by bouquet molecules. **Angewandte Chemie International Edition** , v.31, p.1637, 1992.

PRESTEGARD, J. H.; CHANSUNNEY, I. Proton Magnetic Resonance Studies of the Cation-Binding Properties of Nonactin. II. Comparison of the Sodium Ion, Potassium Ion, and Cesium Ion Complexes. **Journal of the American Chemical Society** , n.15, p.4440-46, 1970.

QIANG, Y. G.; ZHANG, X. P.; ICHIKAWA, K. Photodynamic therapy for malignant and non-malignant diseases: clinical investigation and application. **Chinese Medical Journal** , v.119, p.845-57, 2006.

RAAB, O. Über die wirkung fluoreszierender stoffe auf infusorien. **Zeitung Biologie** , v.39, p.524-46, 1900.

RANCAN, F. et al. Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , v.78, p.17-28, 2005.

REDDI, E. et al. Pharmacokinetic studies with Zn(II)-phthalocyanine in tumour-bearing mice. **British Journal Cancer** , v.56, p.597-600, 1987.

REDDI, E. et al. Liposome- or LDL-administered Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumors. I. Pharmacokinetic properties and phototherapeutic efficiency. **British Journal Cancer** , v.61, p.407-11, 1990.

RICCHELLI, F. et al. Liposomes as models to study the distribution of porphyrins in cell membranes. **Biochimica Et Biophysica Acta** , v.1065, p.42-48, 1991.

RICHTER, A. M. et al. Liposomal delivery of a photosensitizer, benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD), to tumor tissue in a mouse tumor model. **Photochemistry And Photobiology** , v.57, p.1000-06, 1993.

RINK, T. J. et al. Lymphocyte membrane potential assessed with fluorescent probes. **Biochimica Et Biophysica Acta** , v.595, p.15-30, 2005.

ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C.; TEDESCO, A. C. Nitric oxide release from the S-Nitrosothiols-Zinc Phthalocyanine complex by flash photolysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , v.36, p.587-94, 2003a.

ROTTA, J. C.; LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Nitric oxide release from the S-Nitrosothiols-Zinc Phthalocyanine complex by flash photolysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , v.36, p.587-94, 2003b.

ROTTENBERG, H. The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles and vesicles. **Methods in Enzymology** , v.55, p.547-69, 1979.

SCHIMIDT, R.; DODESCHEIM, M. Time-resolved measurement of $O_2 (^1g^+)$ in solution - phosphorescence from an upper excited-state. **Journal of Physical Chemistry** , n.98, p.2874-76, 1994.

SCHNEIDER, R. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** , n.13, p.2799-808, 2005.

SELBO, P. K.; HOGSET, A.; PRASMICKAITE, L. Photochemical internalisation: A novel drug delivery system. **Tumor Biology** , v.23, n.2, p.103-12, 2002.

SELIGMANN, W. H. A. B. E.; CHUSED, T. M. Voltage sensitive cyanine dye fluorescence signals in lymphocytes: plasma membrane and mitochondrial components. **Journal of Cellular Physiology** , v.125, p.61-71, 1985.

SELMAN, S. H. Photodynamic therapy for prostate cancer: One urologist's perspective. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** , v.4, n.1, p.26-30, 2007.

SHAPIRO, H. M. Methods in Cell Biology. In: **Structure et ultrastructure des sols et des organismes vivants**. San Diego, CA: Academic Press, 1994.cap.41,p. 121-133.

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

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VANLIER, J. E. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. **Methods in Enzymology** , v.319, p.376-400, 2000.

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

SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , v.33, p.869-80, 2000.

SIBONI, G. et al. The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalisation mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. **Photochemistry and Photobiology**. p.483-91, 2002.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Photodynamic therapy: pharmacological aspects, applications and news from medications development. **Química Nova** , v.25, p.801-07, 2002.

SOBOLEV, A. S.; JANS, D. A.; ROSENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. **Progress in Biophysics & Molecular Biology** , v.73, p.51-90, 2000.

SPECHT, K. G.; RODGERS, A. J. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action. **Photochemistry And Photobiology** , v.51, p.319-24, 1990a.

SPECHT, K. G.; RODGERS, A. J. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action. **Photochemistry And Photobiology** , v.51, p.319-24, 1990b.

SPECHT, K. G.; RODGERS, A. J. Plasma membrane depolarization and calcium influx during cell injury by photodynamic action. **Biochimica Et Biophysica Acta** , v.1070, p.60-68, 1991a.

SPECHT, K. G.; RODGERS, A. J. Plasma membrane depolarization and calcium influx during cell injury by photodynamic action. **Biochim Biophys Acta** , v.1070, p.60-68, 1991b.

SPIKES, J. Photosensitizing properties of porphyrin in model cell systems. In: PLENUM PRESS. **Porphyrins in Tumour Phototherapy**. New York: 1984a.p. 51-60.

SPIKES, J. D. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences. In: BERGASSON, R., JORI, G., LAND, E. J., TRUSCOTT, T. G. **Primary photoprocesses in biology and medicine**. New York: 1985.p. 209-227.

SPIKES, J. D. Photobiology of porphyrins. **Progress in Clinical and Biological Research** , v.170, p.60-68, 1984b.

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.

STASIO, B. D. et al. The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. **European Journal of Medicinal Chemistry** , v.im press, 2005.

TAKEUCHI, Y.; KUROHANE, K.; ICHIKAWA, K. Induction of intensive tumor suppression by antiangiogenic photodynamic therapy using polycation-modified liposomal photosensitizer. **Cancer** , v.97, n.8, p.2027-34, 2003.

TAPPEINER, H. V.; JESIONEK, A. Therapeutische Versuche mit fluoreszirenden stoffen. **Muench Med.Wochenschr** , v.47, p.2042-44, 1903.

TAPPEINER, H. V.; JODLBAUER, A. Die sensibilisierende wirkung fluorescierender substanzen: Gesam melte untersuchugen uber die photodynamische erscheinung. In: **F.C.W.Vogel**. Leipzig, Germany: 1907.p. 1-210.

TAYLOR, A. C. Responses of cells to pH changes in the medium. **Journal of Cell Biology** , p.201-09, 1962.

TEDESCO, A. C. et al. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy. **Journal of controlled release** , v.89, n.261, p.269, 2003.

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, 2003a.

TEDESCO, A. C. et al. Binding and Photophysical studies of bicompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: a new candidate for cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** , v.310, p.2838-40, 2007.

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, n.2, p.187-96, 2003b.

THOMAS, S. M. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnos and Photodynamic Therapy** , v.1, p.43-48, 2004.

TRIESSCHEIJIN, M. et al. Photodynamic therapy in oncology. **Oncologist** , v.11, p.1034-44, 2006.

TSUKUBE, H. **Cations Binding by Macrocycles**. Y. Incue, G.W. Gokel.ed. New York: Marcel Decker, 1990

TSUKUBE, H. **Crown Ethers and Analogous Compounds**. Amsterdam: Elsevier, ed. M.Hiraoka. 1992

TSUKUBE, H.; YAMADA, T.; SHINODA, S. Crown ether strategy toward chemical activation of biological protein functions. **Journal of Heterocyclic Chemistry** , v.38, n.6, p.1401-08, 2001.

TURCHIELLO, R. et al. 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, p.1-6, 2003.

TURRO, N. J. **Modern molecular photochemistry**. California: Benjamin in/Cummings Pub. Co., ed. Menlo Park. 1978

VALDUGA, G. et al. The production of singlet molecular oxygen by zinc(II) phthalocyanine in ethanol and in unilamellar vesicles. Chemical quenching and phosphorescence studies. **Photochemistry And Photobiology** , v.48, n.1, p.1-5, 1988.

VAN DER MAULEN, F. W. et al. Photodynamic destruction of Haemophilus parainfluenzae by endogenously produced porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , v.40, n.3, p.204-08, 2007.

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.

VANVEGEL, F. C. J. M.; VERBOOM, W.; REINHOUT, D. N. Metallomacrocycles: Supramolecular Chemistry with Hard and Soft Metal Cations in Action. **American Chemical Society** , v.94, n.2, p.279-99, 1994.

VARNES, M. E.; BAYNE, M. T.; BRIGHT, G. R. Reduction of intracellular pH is not the mechanism for the synergistic interaction between photodynamic therapy and nigericin. **Photochemistry And Photobiology** , v.64, n.5, p.853-58, 1996.

VIOLA, A. et al. ESR studies of a series of phthalocyanines. Mechanism of phototoxicity comparative quantitation of O₂ - using ESR - spin trapping and cytochrome c reduction techniques. **Free Radical Research** , v.28, p.517-32, 1998.

VISTICA, D. T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: Acritical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research** , v.51, p.2515-20, 1991.

VOYER, N.; ROBITAILLE, M. A novel functional artificial ion-channel. **Journal of the American Chemical Society** , v.117, p.6599-600, 1995.

WAGGONER, A. S. Optical probes of membrane potential. **Journal of Membrane Biology** , v.27, p.317-34, 1976.

WAGGONER, A. S.; SIRKIN, D. W.; TOLLES, R. L. Rate of membrane penetration of potential-sensitive dyes. **Biophysical Journal** , p.15, 1975.

WIEHE, A. et al. Lead structures for applications in photodynamic therapy. Part 1: Synthesis and variation of m-THPC (Temoporfin) related amphiphilic A2BC-type porphyrins. **Tetrahedron** , v.61, p.5535-64, 2002.

WIEHE, A. et al. Hydrophilicity vs hydrophobicity - varying the amphiphilic structure of porphyrins related to the photosensitizer m-THPC. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** , v.5, p.758-61, 2001.

WILSON, D. B. Cellular Transport Mechanisms. **Annual Review of Biochemistry** , v.47, p.933-65, 1978.

XU, H. et al. Effect of host-guest interactions on the photophysical properties of a monocrown ether substituted phthalocyanine. **Materials Science and Engineering C** , v.10, p.71-74, 1999.

XU, H. et al. Aspects of metal phthalocyanine photosensitization systems for light energy conversion. **Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry** , v.65, p.267-76, 1992.

YAMADA, T. et al. Cytochrome c-crown ether complexes as a new type of biocatalysts effective in methanol. **Tetrahedron Letters** , v.40, p.6967-70, 1999.

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.