UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de
ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas

Angelo Roncalli Alves e Silva

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientado: Angelo Roncalli Alves e Silva

Orientador: prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco

Ribeirão Preto

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves e Silva, Angelo Roncalli

Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas, 2010.

123 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.

Orientador: Tedesco, Antônio Cláudio.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Ciclodextrinas. 3. Lipossomas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Angelo Roncalli Alves e Silva

Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador: Antônio Cláudio Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

A Deus que apesar de todas as adversidades me ajuda a seguir o caminho do amor da verdade, justiça e da dignidade.

Aos meus filhos, por eles existirem, pois são eles a razão da busca incessante por uma vida melhor.

À minha Esposa, amiga e companheira, por ter suportado todas as minhas angústias e ter caminhado comigo nos momentos mais difíceis.

À minha Mãe Maria Creusa Alves e Silva, pela ajuda emocional e apoio sempre constante de Mãe maravilhosa.

À minha Sogra Maria do Socorro Lopes, pelas orações e pela ajuda imediata quando mais precisamos.

A toda minha família que de uma forma ou de outra contribuiu para o meu crescimento profissional.

A Tia Aldeiza e ao Tio Laércio, pelo apoio oferecido, reunido a família para nos ajudar. Obrigado por tudo que vocês já fizeram por nós.

Ao professor Dr. Antônio Cláudio Tedesco pela paciência dispensada, pelos ensinamentos de sabedoria que levarei por toda minha vida acadêmica.

Aos meu amigo Fernando Lucas Primo, que possui duas das virtudes que mais admiro sinceridade e humildade.

A Marigilson Pontes e a sua esposa que me acolheram com muito carinho em sua casa.

Aos colegas de pós-graduação Daniela Maranhão, Patrícia, Paula, Marcilene, Gisele Carol, André e a todos os alunos de iniciação científica que conviveram comigo durante esse período de aprendizagem e crescimento.

As funcionárias da secretaria de pós-graduação, pela dedicação, paciência e simpatia no atendimento e dúvidas solucionadas, durante este período.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro concedido.

In memória

Ao meu pai Francisco das Chagas e Silva que,
nos últimos dias de sua vida,
não pode contar com a presença do seu filho.

***“O farmacêutico faz misturas agradáveis,
compõe unguentos úteis à saúde,
e seu trabalho não terminará,
até que a paz divina
se estenda sobre a face da terra”
Eclesiástico 38, 7-8***

RESUMO

SILVA, A. R **Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e indocianina verde em lipossomas**. 2010. 123f Tese de (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os benefícios gerados pela luz do sol foram observados desde a origem da humanidade. A terapia fotodinâmica é a mais nova modalidade de tratamento com luz, que envolve a administração do fármaco fotossensível, o qual se deposita preferencialmente nas células que se deseja a ação, seguido por seletiva iluminação da lesão com luz na região do visível. A ftalocianina de cloro-alumínio (AICIPc) e a indocianina verde são apontados como potenciais fármacos nesta terapia, sendo bastante utilizados atualmente. Foram preparados complexos de ciclodextrinas de ftalocianina de cloro-alumínio e hidroxipropil-beta ciclodextrina e beta-ciclodextrina, incorporados em lipossomas com a indocianina verde, com o propósito de avaliar o sinergismo da ação, proporcionado pela associação de sistemas de liberação e de fármacos fotossensíveis, na terapia fotodinâmica. Quando avaliado isoladamente os complexos de ftalocianina e ciclodextrinas demonstraram valores diferentes da constante de associação demonstrando maior complexação com hidroxipropil-beta ciclodextrina. No entanto, os derivados de ciclodextrinas estudados melhoraram as propriedades fotofísicas do fármaco. Na avaliação das propriedades fotobiológicas, nenhuma toxicidade foi observada para a ftalocianina complexada com ciclodextrinas nem com lipossomas. Na avaliação do complexo de ftalocianina de cloro-alumínio/ciclodextrinas na presença de luz, houve um alto índice de morte celular. No caso da associação dos complexos de AICIPc incorporados nos lipossomas juntamente com a ICV as preparações também demonstraram que as modificações geradas pela incorporação dos fármacos fotossensíveis favoreceram as propriedades espectroscópicas necessárias para a ação dos fármacos na PDT, com conseqüente redução da agregação e alterações significativas nas propriedades fotofísicas e fotobiológicas dos fármacos. Os complexos de ciclodextrinas incorporados nos lipossomas com indocianina verde se apresentaram estáveis como sistemas de liberação, após liofilização, garantindo a característica de vesícula unilamelar pequena. Neste trabalho observa-se claramente o sinergismo garantido por associação dos dois fármacos fotossensíveis e de sistemas de liberação sugerindo uma nova área de pesquisa na terapia fotodinâmica.

Palavras chave: Terapia fotodinâmica; fármacos fotossensíveis; sistemas de liberação de fármacos

ABSTRACT

SILVA, A. R **Photophysical, photochemical and photobiological studies of aluminum chloride phthalocyanine and indocyanine green complexes in liposomes** 2010. 123f Thesis de (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The benefits generated by sunlight were observed from the origin of humanity. Photodynamic therapy is the new form treatment of light, which involves the administration of the photosensitizer drug which is targeting preferentially in diseased cells, followed by selective illumination of the lesion with visible light. The aluminum chloride phthalocyanine and indocyanine green are studied as potential drugs this therapy and often used. Were development complex of hydroxypropyl-beta cyclodextrin and beta-cyclodextrin with aluminum chloride phthalocyanine entrapment in liposomes with indocyanine green in order to studied the synergism of action, provided by association of both release and photosensitizer drugs, in photodynamic therapy. Complexes of phthalocyanine with different cyclodextrins derivatives showed different values of the association constant showing greater complexation with hydroxypropyl-beta cyclodextrin. However the derivatives of cyclodextrins studied improved the drug photophysical properties. In evaluating the photobiological properties, no toxicity was observed for phthalocyanines complexed with cyclodextrins or liposomes. Although the evaluation of phthalocyanine complex excited by light, showed a higher rate of cell death. When the complexes were incorporated in liposomes plus indocyanine green photosensitizer drugs improved the spectroscopic properties necessary for the action of drugs in PDT reduced aggregation and significant improved in the photophysical and photobiological properties of drugs. Complexes of cyclodextrins incorporated in liposomes with indocyanine green showed stable drug delivery systems, after freeze-drying and keeping a small unilamellar vesicle. This work showed that there is clearly synergism by the association two photosensitizers and drug delivery systems and represents a great contribution for a new area of research in photodynamic therapy.

Keywords: Photodynamic therapy; photosensitizers; drug delivery systems

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Jablonski {Oliveira 2006 184 /id}.....	3
Figura 2: Estruturas moleculares de fármacos fotossensíveis aprovados para aplicação clínica: a) Visudyne®, b) Foscan®, c) Levulan® e d) Metvix®.....	6
Figura 3. Estruturas moleculares básicas dos três tipos de cianinas	8
Figura 4. Representação da estrutura molecular da ICV (a) e AlCIPc (b)	9
Figura 5. Ilustração do Epitélio Pigmentar da Retina (EPR).....	14
Figura 6. Representação de um lipossoma unilamelar.....	19
Figura 7. Representação esquemática das principais ciclodextrinas naturais.....	22
Figura 8: Representação esquemática de um sistema de fotólise por pulso de laser (laser Nd-YAG) utilizado nos experimentos (PRIMO, F. L., 2009).....	37
Figura 9: Micrografias das células J774-A em cultura de monocamadas, registradas a partir de um microscópio Axiovert 40 CFL com objetiva Ph 1 10x/0,25 (A) e 20x/0,25 (B) com câmera acoplada 7.2 Mpixels.	42
Figura 10: Redução do MTT para o sal de Formazam redutase mitocondrial.....	43
Figura 11: Sistema laser <i>Eagle</i> com $\lambda = 650$ nm utilizado nos experimentos de fototoxicidade.	45
Figura 12: Sistema Fotocoagulador laser FTC 1200 com $\lambda = 810$ nm utilizado nos experimentos de fototoxicidade.....	46
Figura 13: Espectros de emissão de fluorescência para (●) AlCIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de emissão em 680 nm em etanol/tampão na relação (1,5 mL : 0,5 mL).....	48
Figura 14: Espectros de emissão de fluorescência para (●) AlCIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de emissão em 680 nm em etanol/tampão na relação (1,4 mL : 0,6 mL).....	49
Figura 15: Espectros de emissão de fluorescência para (●) AlCIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD com concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de emissão em 680 nm em etanol/tampão na relação (1,3 mL : 0,7 mL).....	49
Figura 16: Espectros de absorção para AlCIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e, com comprimento de onda de absorção em 675 nm em etanol/tampão nas relações (●) 1,5 mL : 0,5 mL; (●) 1,4 mL : 0,6 mL; (●) 1,3 mL : 0,7 mL respectivamente.	50
Figura 17: Espectros de absorção para (●) AlCIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de absorção em 675 nm em etanol/tampão na relação (1,5 mL : 0,5 mL).....	50

- Figura 18:** Espectros de absorção para (●) AICIPc na concentração de 6,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de 2,5 mmol.L^{-1} , com comprimento de onda de absorção em 675 nm em etanol/tampão na relação (1,4 mL : 0,6 mL)..... 51
- Figura 19:** Espectros de absorção para (●) AICIPc na concentração de 6,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de 2,5 mmol.L^{-1} , com comprimento de onda de absorção em 675 nm em etanol/tampão na relação (1,3 mL : 0,7 mL)..... 51
- Figura 20:** Influência da emissão de fluorescência da AICIPc livre em função dela complexada com β -CD em etanol/tampão na razão 3:1 em relação ao inverso do quadrado de concentrações crescentes de β -CD (25 mmol.L^{-1} a 300 mmol.L^{-1}) $r^2 = 0,9995$ 54
- Figura 21:** Estudo de citotoxicidade após 4 horas de incubação em células neoplásicas de macrófagos J774-A1. β -CD = AICIPc/ β -CD; Hp-CD = AICIPc/HP- β -CD, (AICIPc na concentração de 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e CD de 2,5 mmol.L^{-1}),. Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey t -teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$ 60
- Figura 22** Efeito da aplicação de laser na viabilidade celular em células neoplásicas de macrófagos J774-A1, após 4 horas de incubação do complexo AICIPc/ β -CD e CT = células encubadas com a β -CD sem fármaco e irradiadas com 70 mJ.cm^{-2} . As células foram expostas ao aumento da dose de luz 70, 140 e 700 mJ.cm^{-2} . Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey t -teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$ 62
- Figura 23:** Efeito da aplicação de laser na viabilidade celular em células neoplásicas de macrófagos J774-A1, após 4 horas de incubação do complexo AICIPc/HP- β -CD e CT = células encubadas com a β -CD sem fármaco e irradiadas com 70 mJ.cm^{-2} . As células foram expostas ao aumento da dose de luz 70, 140 e 700 mJ.cm^{-2} . Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey t -teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$ 63
- Figura 24:** Espectro de absorção da ICV (10,0 μM) em PBS, pH 7.4(–) e na presença de lipossomas (–). 66
- Figura 25:** Espectro de absorção normalizado da ALCLPC (10,0 μM) em Etanol (–) e na presença de lipossomas (–). 67
- Figura 26:** Espectro de emissão de fluorescência normalizado da ICV(10,0 μM) em PBS pH 7.4(–) e na presença de lipossomas (–). 68
- Figura 27:** Espectro de emissão de fluorescência normalizado da AICIPc (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em etanol (–) e na presença de lipossomas (–). 68
- Figura 28:** Espectro de absorção de AICIPc e ICV (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) na presença de lipossomas 69
- Figura 29:** Curva de decaimento e ajuste exponencial para o fármaco fotossensível clássico AICIPc em etanol. 72
- Figura 30:** Curva de decaimento e ajuste exponencial para a ICV em lipossoma.... 72

Figura 31: Curva de decaimento e ajuste exponencial para a ICV/AICIPc em lipossoma.	72
Figura 32: Curva de decaimento e ajuste exponencial para a ICV/AICIPc/HP- β -CD em lipossoma.	73
Figura 33: Estudo de supressão de fluorescência da BSA (1mg/mL) pela ICV na faixa de 300 a 500 nm. Concentração da ICV (mol.L^{-1}) aumenta do topo para a base: $0,5 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $1,5 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $2,5 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $3,5 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $4,5 \times 10^{-6}$	79
Figura 34: Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela ICV associada com HP- β -CD na faixa de 300 a 500 nm. Concentração da ICV (mol.L^{-1}) aumenta do topo para a base: $0,5 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $1,5 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $2,5 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $3,5 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $4,5 \times 10^{-6}$	79
Figura 35: Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela ICV incorporada em lipossomas na faixa de 300 a 500 nm. Concentração da ICV (mol.L^{-1}) aumenta do topo para a base: $0,5 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $1,5 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $2,5 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $3,5 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $4,5 \times 10^{-6}$	80
Figura 36: Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela AICIPc associada com HP- β -CD na faixa de 300 a 500 nm. Concentração da AICIPc (mol.L^{-1}) aumenta do topo para a base: $1,0 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $6,0 \times 10^{-6}$; $7,0 \times 10^{-6}$; $8,0 \times 10^{-6}$	80
Figura 37 : Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela AICIPc e ICV incorporada em lipossomas na faixa de 300 a 500 nm. Com as concentrações para ambos os fármacos aumenta do topo para a base: $1,0 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $6,0 \times 10^{-6}$; $7,0 \times 10^{-6}$; $8,0 \times 10^{-6}$	81
Figura 38: Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela ICV e AICIPc/ciclodextrinas incorporados em lipossomas na faixa de 300 a 500 nm. Com as concentrações para ambos os fármacos aumenta do topo para a base: $1,0 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $6,0 \times 10^{-6}$; $7,0 \times 10^{-6}$; $8,0 \times 10^{-6}$	81
Figura 39: Gráfico de duplo logaritmo de supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) por ICV tendo como valor de K_b $4,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ com $r^2 = 0,995$	82
Figura 40: Gráfico de duplo logaritmo de supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) por ICV/HP-B-CD tendo como valor de K_b $1,07 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ com $r^2 = 0,998$..	82
Figura 41: Estrutura química do colesterol.....	88
Figura 42: Representação gráfica da curva analítica da solução d e ICV em concentrações de 0,5 a $1,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método espectrofotométrico na região do visível a 794 nm.	92
Figura 43: Representação gráfica da curva analítica da solução de AICIPc em concentrações de 0,6 a $1,9 \mu\text{g/mL}$ pelo método espectrofotométrico na região do visível a 678 nm.	94
Figura 44: Representação gráfica do estudo de especificidade da AICIPc (a) em relação aos constituintes dos lipossomas e ICV (•) em DMSO.....	95

Figura 45: Estudo de citotoxicidade após 4 horas de incubação em macrófagos J774-A1. ICV = Indocianina verde; Pc = AICIPc e ICV/PC = Indocianina verde e AICIPc nas concentrações de $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (a); $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (b) e $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (c) . Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,01$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$ 98

Figura 46: Estudo de citotoxicidade após 4 horas de incubação em células neoplásicas de macrófagos J774-A1. L = lipossomas com ICV e AICIPc; Lb = lipossomas com ICV e AICIPc/ β -CD e Lh = lipossomas com ICV e AICIPc/Hp- β -CD nas concentrações de $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$ 99

Figura 47 Efeito da aplicação de laser na viabilidade celular em linhagem de células J774-A, após 4 horas de incubação, comparando-se a influência do tipo de ciclodextrina, (●) Lb ou (●) Lhp, complexada com AICIPc, incorporada no lipossoma com a ICV. CT = células na presença de β -CD. As células foram expostas ao aumento da dose de luz 70, 140 e 700 mJ.cm^{-2} . Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$ 101

Figura 48 Porcentagem de células J774 vivas, após serem submetidas com aplicação de 3 minutos do Fotocoagulador laser FTC 1200 com dose de 48 J/cm^2 nas amostras **L** (Lip+ICV + AICIPc); **Lb** (Lip+ β -CD/AICIPc+ICV); **Lhp** (Lip+Hp- β -CD/AICIPc + ICV) com significância estatística determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$ 103

Figura 49 Porcentagem de células J774-A1 vivas após 4 horas de incubação com AICIPc complexada irradiadas com Fotocoagulador laser FTC 1200 em 810 nm (●) ou com Fotocoagulador laser FTC 1200 em 810 nm com dose de 48 J/cm^2 e em seguida com laser de diodo Eagle a 650 nm com dose 140 mJ.cm^{-2} (●), em meio de cultura com 1% de SFB e incorporada aos Lipossomas. Significância estatística determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$ 104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Indicação de tratamento para NVC.....	15
Tabela 2. Exemplos de lipídios formadores de bicamadas utilizados na preparação de fármacos na forma encapsulada em lipossomas.	20
Tabela 3: Características físicas das ciclodextrinas	24
Tabela 4. Determinação das constantes de associação dos complexos AICIPc/ β -CD e AICIPc/HP- β -CD em mistura etanol/tampão na relação 3:1	55
Tabela 5 Valores de rendimento quântico de produção do oxigênio singlete	56
Tabela 6 Rendimento quântico de fluorescência da ZnPc em etanol e AICIPc associada com ciclodextrinas (β -CD e HP- β -CD) em mistura etanol/PBS 3:1.....	58
Tabela 7. Tempos de vida de fluorescência (τ_s), Amplitude relativa (A) para a AICIPc em etanol e com ICV incorporados aos lipossomas na ausência e na presença de ciclodextrinas.....	73
Tabela 8 Tempos de vida da espécie transiente triplete (τ_T) e amplitude relativa (A) para o fármaco fotossensível AICIPc mais o fármaco ICV em cada ambiente químico estudado com leitura em 480 nm e excitação em 355 nm.....	76
Tabela 9 Constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) de diferentes.....	83
Tabela 10 Variação do tamanho dos lipossomas após incorporação com os fármacos durante quatro semanas.....	86
Tabela 11: Influência da presença da ICV, AICIPc e ciclodextrinas no tamanho e potencial zeta do lipossoma	87
Tabela 12 Influência da liofilização no tamanho e no potencial Zeta.....	88
Tabela 13: Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de ICV	91
Tabela 14: Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de AICIPc	93
Tabela 15: Determinação da concentração da AICIPc no lipossoma a partir da concentração inicial adicionada de $22 \mu\text{mol.L}^{-1}$	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EROS – Espécies reativas de oxigênio
PBS – Phosphate Buffer saline
 S_1 – Estado singlete excitado
 S_0 – Estado fundamental
 T_1 – Primeiro estado triplete excitado
 $O_2 (^3\Sigma g^-)$ – Oxigênio no estado fundamental
 $O_2 (^1\Delta g)$ – Oxigênio no estado excitado singlete
 Φ_Δ - Rendimento quântico de oxigênio singlete
 Φ_F – Rendimento quântico de fluorescência
 τ_S – Tempo de vida do estado singlete excitado
 τ_T – Tempo de vida do estado triplete excitado
HpD – Derivados de hematoporfirinas
PpIX – Protoporfirina
HEME – protoporfirina III mais ferro $^{2+}$
EMEA – European Medical Agency
CPHA - Canadian Public Healthy Agency
IR – Infravermelho
UV – Ultravioleta
D.O. – Densidade óptica
DMRI – Degeneração macular relacionada à idade
ICV – Indocianina verde
DPPC – Dipalmitoil-fosfatidil-colina
TPPS₃ e TPPS₄ –fenilporfirinas Tri e tetrasulfonatadas
AlClPcS₃ e AlClPcS₄ – ftalocianinas de cloro alumínio tri e tetrasulfonatadas
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
HDL – Lipoproteína de alta densidade
VLDL – Lipoproteína de baixíssima densidade
AlClPc ftalocianina de cloro-alumínio
ZnPc – Ftalocianina de Zinco
AlClPc – Cloro alumínio ftalocianina
FS – Fármaco fotossensível

apoB/E – Apolipoproteínas

ALA – Ácido amino levulínico

ANOVA – Análise de variância

HaCaT – linhagem de queratinócitos humanos imortalizada

MNVC – membrana coroidal neovascular

NVC – Neovascularização da coróide

EPR – Epitélio pigmentar da retina

MPS - Macular Photocoagulation Study

LPS – Lipopolissacarídeos

ALT – Ácidos lipoteicóicos

HIV - Human Immunodeficiency Virus

SLC – Sistema de liberação controlada

SFM – Sistema fagocitário mononuclear

CD – ciclodextrinas

β -CD – Beta-ciclodextrinas

HP- β -CD – Hidroxipropil-beta-ciclodextrinas

AICIPc/ β -CD – Complexos de ftalocianina de cloro-alumínio e beta ciclodextrinas

AICIPc/HP- β -CD – complexos ftalocianina de cloro-alumínio e hidroxipropil beta ciclodextrinas

BSA – Albumina de sor bovina

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

SFB – Soro fetal bovino

MTT - 3-[(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio brometo]

MLV – Vesículas multilamelares

SUV – Vesículas unilamelares pequenas

FDA Food and Drug Administration

CNPq Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento

FCFRP/USP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)	1
1.2 Fármaco fotossensível	5
1.2.1 Cianinas e indocianina verde	7
1.2.2 Ftalocianinas e Ftalocianina de cloro-alumínio	9
1.3. Areas de atuação da TFD	11
1.3.1 Mecanismos de ação em células neoplásicas	11
1.3.2. Mecanismo de ação na psoríase	12
1.3.3 TFD na Degeneração Macular Relacionada com a Idade (DMRI)	13
1.3.4. Atividade Antimicrobiana	16
1.4. Sistema de liberação em Terapia Fotodinâmica	17
1.4.1 Lipossomas	19
1.4.2 Ciclodextrinas	22
2. Objetivos	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. Material e Métodos	27
3.1 Material	27
3.2 Equipamentos	27
3.3 Metodos	30
3.3.1 Preparação das amostras	30
3.3.1 a) Preparação dos complexos de ciclodextrinas	30
3.3.1 b) Preparação dos lipossomas	30
3.3.2. Avaliação do comportamento espectroscópico do complexo AICIPc/CD e determinação da constante de associação.	32
3.3.3. Estudos Fotofísicos da AICIPc com ciclodextrinas	33
3.3.3.1. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete da AICIPc na presença de ciclodextrinas (ϕ_{Δ})	33
3.3.3.2. Determinação do rendimento quântico de fluorescência da AICIPc na presença de ciclodextrinas (β -CD, HP- β -CD).	34
3.3.3.3 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ICV e da AICIPc em PBSpH = 7,4 e na presença de lipossomas.	35

3.3.4 Determinação da constante de ligação (K_b) e do número de sítios de ligação da ICV e AICIPc a albumina bovina (BSA).	35
3.3.5 Estudos Fotofísicos dos lipossomas	36
3.3.5.1 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ICV e AICIPc em PBS e em lipossomas	36
3.3.5.2 Determinação do tempo de vida do estado excitado triplete da AICIPc e associação AICIPc e ICV em lipossomas.	37
3.3.6 Estudos do tamanho das vesículas lipossomais contendo ICV, AICIPc e ICV/AICIPc.	38
3.3.7 Determinação da eficiência de encapsulação.	39
3.3.7.1 Determinação das curvas analíticas para ICV e AICIPc em DMSO	39
3.3.7.2 Determinação da concentração de AICIPc nos lipossomas por espectrofotometria.	40
3.3.8 Estudos <i>in vitro</i> envolvendo células neoplásicas.	41
3.3.8.1 Diagrama de crescimento da cultura celular	41
3.3.8.2 Crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas	41
3.3.8.3 Determinação da viabilidade celular.	42
3.3.8.4 Estudos de Citotoxicidade	44
3.3.8.5 Estudos de fototoxicidade	44
4. Resultados e Discussão	47
4.1. Estudo e caracterização do complexo de AICIPc com ciclodextrinas.	47
4.1.1 Avaliação do comportamento espectroscópico da interação AICIPc/CD na mistura de solventes etanol/PBS.	47
4.1.2. Estudo da constante de associação AICIPc e ciclodextrinas.	53
4.2. Estudos Fotofísicos de AICIPc com ciclodextrinas	55
4.2.1 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete, da AICIPc com ciclodextrinas.	55
4.2.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência da AICIPc na presença de ciclodextrinas (β -CD e HP- β -CD).	57
4.3 Estudo da viabilidade celular da AICIPc e ciclodextrinas	59
4.3.1 Estudo de viabilidade celular, dos complexos de AICIPc, na ausência de luz para células J774-A.	60
4.3.2 Estudo de viabilidade celular, dos complexos de AICIPc, na presença de luz para células J774-A.	61
4.4. Estudos Fotofísicos, de AICIPc em Lipossomas	64
4.4.1 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ICV e da ALCLPC em PBS pH = 7,4 incorporado em lipossomas.	64

4.4.2 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ICV e AICIPc em tampão e meio lipossomal.....	70
4.4.3) Determinação do tempo de vida do estado excitado triplete da AICIPc e associação AICIPc e ICV em lipossomas.....	75
4.5 Determinação da constante de ligação (K_b) e do número de sítios de ligação da ICVe AICIPc.....	77
4.6 Estudo do tamanho de Vesícula da ICVe AICIPc em lipossomas.	84
4.7 Determinação da eficiência de encapsulação.	89
4.7.1 Determinação das curvas analíticas para ICV e AICIPc em DMSO	89
4.7.2 Determinação da Especificidade para AICIPc em lipossomas com ICV.....	94
4.7.3 Determinação da concentração para AICIPc em lipossomas.	95
4.8 Estudos de citotoxicidade.....	96
4.8.1 Avaliação da citotoxicidade na ausência de luz	97
4.8.2 Toxicidade da AICIPc livre e complexada com ciclodextrinas, ICV incorporados em lipossomas na presença de luz.....	100
5. Conclusões	106
Referências	107

1. Introdução

1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

Os benefícios gerados pela luz do sol tem sido observados desde a origem da humanidade. Herodotus século VI a.C. relatou estes benefícios no crescimento ósseo; Hipócrates em 460-375 a.C. defendia o uso da helioterapia (tratamento das doenças pela luz do sol) em diversas patologias, mostrando os benefícios deste tipo de tratamento.

A Fototerapia é caracterizada pela utilização de luz visível ou visível próximo ao infravermelho no tratamento de doenças. Essencialmente essa terapia envolve transições eletrônicas aos fármacos fotossensíveis as quais induzem reações fotoquímicas, que podem resultar em uma cadeia de reações na ausência de luz (no escuro), gerando produtos que induzem ação terapêutica. A fototerapia é subdividida em duas categorias principais: a) Direta, quando há aplicação da luz diretamente no local da lesão, sem a participação do fármaco fotossensível (FS). Esta luz aplicada é absorvida por moléculas endógenas presentes no organismo, que sob o efeito da luz sofrem alterações, garantindo o efeito desejado; b) Na forma indireta há participação do FS que, administrado antes da irradiação, absorve a luz emitida. Este, por sua vez, após uma série de eventos, é indutor da ação fotodinâmica no organismo (VIA e MAGNO, 2001).

Apesar do conceito da morte celular induzida pela interação da luz com fármacos fotossensíveis ter sido reconhecido há mais de cem anos, os estudos sistemáticos das reações de fotossensibilização foram iniciados apenas no final do século XIX por Oscar Raab (RAAB, 1900). Este pesquisador investigou o efeito dos corantes eosina e acridina sobre o paramécio e percebeu que, em presença de luz, esse microorganismo é rapidamente inativado. Em 1903, Tappeiner empregou uma solução de eosina e luz para tratar câncer de pele observando uma redução no tamanho do tumor (TRIESSCHEIJN et al., 2006a).

Meyer-Betz, em 1912, estudou o efeito fotodinâmico de porfirinas em humanos. Este pesquisador injetou em si mesmo 200 mg de hematoporfirina (HP). A

subseqüente exposição de pequenas regiões da pele de seu braço à luz visível induziu a formação de eritema solar, indicando que a HP possui um efeito fototóxico (STERNBERG et al., 1998). Durante a década de setenta deu-se início a elucidação dos efeitos citotóxicos da terapia fotodinâmica (TFD) (KELLY e SNELL, 1976; CHANG E DOUGHERTY, 1978). Recentemente, estudos demonstraram a eficácia da meso-tetra-hydroxifenil-clorina (mTHPC) em TFD, no tratamento em pacientes com carcinoma, em células basais (TRIESSCHEIJN et al., 2006b).

A TFD é uma modalidade de fototerapia na qual um composto "atóxico", denominado de fármaco fotossensível é administrado topicamente ou por via endovenosa, e subseqüentemente ativado por exposição à luz visível, para produzir efeito citotóxico. Inicialmente usada no tratamento do câncer, a TFD é considerada uma técnica pouco invasiva, podendo ser aplicada repetidamente no mesmo local e ser ao mesmo tempo utilizada em pacientes que fazem uso das terapias convencionais como quimioterapia, radioterapia ou cirurgia (KUBLER et al., 2005). Diante do seu reconhecimento por parte do FDA (Food and Drug Administration), o interesse pelo uso da TFD tem aumentado, não apenas para o tratamento de câncer, mas como uma terapia eficaz para o tratamento de diversas doenças, incluindo psoríase (BOEHNCKE et al., 2000).

O uso da Terapia Fotodinâmica no Brasil tem como uma das pioneiras a Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Desde 1995, esta forma de terapia vem sendo aperfeiçoada pelo grupo de Pesquisa em Fotobiologia e Fotomedicina da FFCLRP-USP, o qual desenvolve trabalhos que avaliam as propriedades fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas de novos sistemas de liberação de fármacos fotossensíveis aplicados à TFD (PRIMO et al., 2008; SIMIONI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2006). A atividade fotodinâmica do fármaco fotossensível é baseada nas reações fotooxidativas, que induzem múltiplas e consecutivas reações no organismo. Essas reações são relacionadas a processos fotoquímicos e fotofísicos após o fármaco fotossensível sofrer excitação.

O fundamento da TFD está relacionado aos mecanismos de transferência e absorção de energia. Após absorção de luz, o fármaco fotossensível que se encontra em seu estado fundamental (S_0) com seus elétrons com spins opostos em um orbital de menor energia, sofre uma transição, para o estado singlete excitado (S_1). Este estado excitado possui tempo de vida curta, em torno de nanosegundos, podendo retornar ao estado S_0 por um processo radiativo, emitindo um fóton

(fluorescência) ou por conversão interna com perda de energia na forma de calor (processo não radiativo). O estado excitado singlete pode também submeter-se ao processo de cruzamento intersistemas por meio da inversão do spin do elétron excitado gerando o estado triplete excitado ($^3\text{FS}^*$) com tempo de vida maior, microssegundos. (CASTANO et al., 2004), como ilustrado na Figura 1, pelo diagrama de Jablonski.

Figura 1: Diagrama de Jablonski {Oliveira 2006 184 /id}

$h\nu$ - absorção de luz

S_n - estado excitado singlete superior

IC - conversão interna

k_p – fosforescência

S_0 – estado singlete fundamental

k_f – fluorescência

T_n – estado excitado triplete superior

ISC – cruzamento intersistema

O estado triplete pode reagir de duas maneiras, definidas como mecanismo do tipo I e mecanismo do tipo II (CASTANO, et al., 2004). O mecanismo do tipo I está relacionado com abstração do átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o estado excitado do FS e um substrato biológico, um solvente ou outra molécula do FS no estado fundamental, produzindo radicais livres. Esses radicais livres são geralmente altamente reativos podendo prontamente interagir com o oxigênio molecular gerando espécies reativas de oxigênio (EROS) como anions superóxidos, radicais hidroxil ou mesmo causar danos biológicos irreparáveis. Essas reações produzem danos oxidativos, que são expressos eventualmente como lesões biológicas (SHARMAN et al., 1999).

Mecanismo de ação do triplete do tipo I

- Mecanismo do tipo I

Onde FS = fármaco fotossensível e $\text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$ oxigênio no estado fundamental

No mecanismo do tipo II, a energia é transferida do fármaco fotossensível, no estado triplete, ao oxigênio no estado fundamental $\text{O}_2 (^3\Sigma_g^-)$ para gerar o oxigênio no estado singlete $\text{O}_2 (^1\Delta_g)$. Devido a sua alta reatividade o oxigênio singlete pode reagir com um grande número de substratos biológicos (NEVRELOVÁ et al., 2005). Acredita-se que o mecanismo de foto-oxidação do tipo II seja o principal responsável pela destruição das células do câncer (TAKEMURA et al., 1992).

Mecanismo de ação do triplete do tipo II

A Terapia Fotodinâmica surge como alternativa no tratamento de inúmeras doenças, pois possui a grande vantagem de ser eficiente sem provocar toxicidade a regiões adjacentes ao local de ação. Com a combinação de luz visível, um corante, chamado de fármaco fotossensível, e a presença de oxigênio ocorre a ação terapêutica (STEENVOORDEN e VAN HENEGOUWEN, 1997; STERNBERG e DOLPHIN, 1993). O agente ou a luz isoladamente, não apresentam citotoxicidade para o tecido. Entretanto, a combinação dos dois na presença de oxigênio, leva a morte celular com consequente destruição do tecido (CASTANO et al., 2004).

1.2 Fármaco fotossensível

Atualmente existem vários fármacos fotossensíveis, dentre eles, as porfirinas, ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas estão entre os mais estudados para TFD.

Os primeiros fármacos fotossensíveis utilizados na TFD foram eosina e acridina, que logo caíram em desuso devido a uma alta toxicidade (SIMPLICIO et al., 2002; BONETT, 2000). Entretanto, o grande avanço da TFD com fármacos fotossensíveis se deu com os derivados da hematoporfirina (HpD) e a primeira publicação sobre estes derivados foi um estudo clínico com HpD em carcinoma de bexiga demonstrando a afinidade desta substância por tecidos malignos e com início de malignidade, bem como a destruição do tumor (KELLY e SNELL, 1976). Outro estudo, envolvendo 25 pacientes com lesões malignas em tecidos cutâneo e subcutâneo, incluindo carcinomas de cólon, próstata, endométrio, demonstrou a atividade da hematoporfirina em todos os tecidos estudados (CHANG e DOUGHERTY, 1978).

A descoberta da primeira geração de fármacos fotossensíveis derivados da hematoporfirina, junto com suas variações comerciais denominadas Fotofrin®, Fotosan®, Fotogen® e Fotocarcinorin® (ISHII et al., 2005; BELLNIER et al., 2003; CHALEIX et al., 2003; DOUGHERTY, 1984), promoveu um grande avanço para este tipo de terapia. No entanto, com o propósito de aumentar a seletividade a órgãos específicos e a atividade fotodinâmica, houve a necessidade do desenvolvimento da segunda geração de fármacos fotossensíveis, geralmente formada por substâncias simples, não necessariamente compostos porfirínicos, com maior atividade e seletividade em relação à primeira geração (MARANHO, 2009; MOREIRA et al., 2008). A terceira geração dos fármacos fotossensíveis tem um mecanismo de direcionamento, como por exemplo, por ataque covalente a anticorpos monoclonais (BONNETT, 2000), que promovem uma maior concentração da substância no local de ação.

Em virtude dos bons resultados obtidos em estudos clínicos, o Photofrin® já foi aprovado pelos órgãos de saúde em mais de 40 países para tratamento de diversos tipos de câncer (BROWN et al., 2004). Atualmente, mais três compostos aprovados pelo FDA estão sendo empregados na TFD: o Visudyne® (verteporfina ou monoácido derivado de benzoporfirina) para o tratamento de degeneração

macular, o Levulan® (ácido aminolevulínico) no tratamento da queratose actínica e o Metvix® (aminolevulinato de metila) no tratamento de queratose actínica e carcinoma basocelular (Figura 2) (SHAH et al., 2009; BARRY e KEOHANE, 2005; JEFFES, 2002). Estes dois últimos são pró-fármacos, precursores da Protoporfirina IX (PpIX), um fármaco fotossensível endógeno, sintetizado a partir do ciclo HEME. É importante ressaltar que o Visudyne® foi recentemente aprovado pela EMEA (European Medical Agency) e a CPHA (Canadian Public Healthy Agency) para o tratamento de degeneração macular (NYMAN e HYNNINEN, 2004). Além disso, outros compostos estão sendo estudados em testes clínicos de fase I, II e III, para aplicações em diversos tipos de câncer (NYMAN e HYNNINEN, 2004).

Figura 2: Estruturas moleculares de fármacos fotossensíveis aprovados para aplicação clínica: a) Visudyne®, b) Foscan®, c) Levulan® e d) Metvix®.

Os fármacos de primeira geração são geralmente misturas complexas que possuem baixa seletividade ao local de ação, possuem baixo coeficiente de excitação, necessitando de alta concentração do fármaco para obtenção de uma resposta fototerapêutica satisfatória; a absorção máxima ocorre em comprimento de

onda relativamente baixo, gerando uma baixa penetração de luz nos tecidos; por último, se acumulam em concentrações altas na pele, gerando uma alta sensibilidade cutânea à luz (CASTANO et al., 2004; KONAN e ALLEMANN, 2002). Além destes fatores, observa-se que vários destes fármacos quando em meio aquoso sofrem dimerização e posteriormente agregação. Esta agregação reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar a produção de oxigênio singlete e outras espécies reativas. Desse modo, é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solubilizado e na forma monomérica (SIMPLICIO et al., 2002), para um bom efeito terapêutico.

O derivado da hematoporfirina conhecido por Photofrin foi o primeiro fármaco fotossensível a ser estudado com detalhes e utilizado na década de 80 (BATLLE, 1993). Embora tais compostos tenham atingido a etapa clínica de estudos científicos, outro problema encontrado no uso destes derivados diz respeito à sua absorção máxima de luz em comprimento de onda na região de 600 nm, usualmente de baixa penetração nos tecidos humanos, além de possuírem variação na sua composição, com grande dificuldade de se isolar um único composto ((Anderson, 1983); KESSEL e SCHNECKENBURGER, 1989).

1.2.1 Cianinas e indocianina verde

As cianinas são corantes pertencentes à classe do grupo das polimetinas, utilizados como sondas fluorescentes, principalmente em áreas médicas. Sua estrutura geral é composta por um número ímpar de grupos metina (CH), ligados de forma alternada por ligações simples e duplas. Dependendo da sua estrutura, as cianinas apresentam um espectro eletromagnético com bandas de absorção combinando a região do IR ao UV (MISHRA et al., 2000), podendo ser classificadas em três tipos (Figura 3). Ultimamente tem crescido o interesse nestes compostos, devido à hipertermia provocada após excitação com laser em TFD, ou associado a outros compostos (triancinolona) mostrando melhor ação no tratamento em pacientes com neovascularização na degeneração macular relacionada à idade (DMRI) (AREVALO et al., 2005). Este aspecto sugere ação sinérgica da ICV quando associada a outros fármacos.

Figura 3. Estruturas moleculares básicas dos três tipos de cianinas

A indocianina verde (ICV) é um derivado aniônico indotricarbocianina não tóxico com peso molecular de 774,96 g composto de duas estruturas policíclicas (bezoindotricarbocianina) totalmente lipofílicas, ligadas por uma cadeia carbônica (DESMETTRE et al., 2000). Devido aos grupos sulfônicos possuírem carga negativa, esta substância apresenta anfifilia e boa solubilidade em água e metanol. Esta solubilidade em água propicia uma boa característica para aplicação da ICV como fármaco fotossensível, pois permitir uma relativa estabilidade do fármaco quando em solução aquosa, podendo ser administrada com certa rapidez por via intravenosa (COSTA et al., 2001). Outra característica importante é que a ICV é uma molécula relativamente grande, possui capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas como albuminas, globulinas e principalmente a α -lipoproteínas, permitindo melhorar a penetração de pigmentos nas regiões oculares, em hemorragias e fluidos, exibindo retenção seletiva nos neovasos anormais da coróide e ao redor destes, não interagindo com os espaços epiteliais (MORDON et al., 1998).

Figura 4. Representação da estrutura molecular da ICV (a) e AlClPc (b)

A ICV, Figura 4(a), possui absorção máxima entre 700-800 nm (BAUMLER et al., 1999). Esta região de absorção permite que o feixe de luz penetre de forma adequada nos tecidos sem sofrer interferências dos constituintes do sangue, garantindo maior capacidade de ativação do fármaco.

Apesar de inúmeras vantagens a ICV apresenta características que reduzem sua eficiência na TFD, que são o seu alto grau de dimerização e o baixo rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (aproximadamente 0.120) (JORGE et al., 2002).

1.2.2 Ftalocianinas e Ftalocianina de cloro-alumínio

De uma maneira geral, as ftalocianinas (tetraazatetrabenzoporfirina) são compostos sintéticos semelhantes às porfirinas naturais, ou seja, são compostos heterocíclicos planares em sistemas aromáticos, apresentando propriedades químicas e físicas (em especial sua solubilidade) alteradas através da adição de substituintes periféricos ao macrociclo, levando na maioria das vezes a compostos com uma maior estabilidade e pureza quando comparadas aos derivados não substituídos (SPIKES, 1986).

As ftalocianinas, Figura 4(b), são corantes sintéticos semelhantes às porfirinas e estruturalmente consideradas azaporfirinas (SPIKES, 1986). Consideradas fármacos fotossensíveis de segunda geração, certas ftalocianinas têm mostrado resultados promissores em terapia fotodinâmica, em indicações específicas, pois possuem banda espectral de absorção em região de boa

penetração da luz nos tecidos (650 nm a 700 nm) (MOREIRA et al., 2008; FABRIS et al., 2005). As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são muito dependentes do íon metálico presente no centro do macrociclo. Um rendimento quântico do estado triplete e um tempo de vida deste estado triplete altos, são essenciais para ação fotodinâmica. Estes comportamentos podem ser obtidos pela ligação de metais como zinco e alumínio (NYOKONG, 2006). Por esse motivo, utiliza-se a associação com zinco e alumínio, formando-se, por exemplo, os complexos, alocianina de zinco e de alumínio, respectivamente. Estes agentes apresentam uma meia vida relativamente longa nos estados singlete e triplete, que produzem campos quânticos mais altos e, portanto, reagindo por mais tempo com os substratos celulares (DURMUS et al., 2008; OWENS et al., 1998; RUCH et al., 1996). Entre as metalo-ftalocianinas a de zinco e alumínio são as que apresentam as propriedades fotofísicas mais favoráveis quando veiculadas em sistemas de liberação adequados como lipossomas (NUNES et al., 2004). Possuem a vantagem de se acumularem nos órgãos alvo e possuírem uma rápida eliminação, com quase nenhuma fluorescência, observada em células 24 h depois de administração do fármaco (LONGO et al., 2009).

Há trabalhos que mostram a combinação de diferentes moléculas de FS em um mesmo sistema de liberação. Estes FS podem agir de forma clássica e ao mesmo tempo induzir mudanças na homeostase iônica celular como, por exemplo, a Ftalocianina de zinco (ZnPc) associada ao quelante Ca^{2+} , porfirinas e ftalocianinas associadas a moléculas de éteres de coroa que atuam diretamente na homeostase de Na^+ e K^+ . Essas ações geram mudanças diretas no potencial de membrana e ação fotoquímica, resultando na morte celular (LUNARDI et al., 2007; PELEGRINO et al., 2005).

O interesse pela combinação de diferentes espécies reativas, de FS ou até mesmo a combinação de terapias tem sido crescente. Este conceito de sinergismo na TDF já é trabalhado, por exemplo, na utilização de terapias conjuntas, como: hipertermia e TFD, a eletroquimioterapia e TFD, ou através do uso combinando fármacos fotossensíveis, que atuem por diferentes mecanismos, com localização biológica diferentes, como por exemplo, as porfirinas e ftalocianinas com propriedades quelantes (LUNARDI e TEDESCO, 2005). No caso deste trabalho tem-se a associação de um fármaco fotossensível cloroalumínio ftalocianina através da

sua ação fotoquímica e a indocianina verde através da hipertermia, para uso na TFD.

1.3. Areas de atuação da TFD

1.3.1 Mecanismos de ação em células neoplásicas

A utilização da TFD no tratamento de câncer é particularmente devido à sua dupla seletividade. O FS localiza-se preferencialmente no tecido maligno e a luz é especialmente focada na região neoplásica.

Várias são as propostas que explicam a acumulação do FS na região do tumor (HAMBLIN e NEWMAN, 1994a; HAMBLIN e NEWMAN, 1994b). Uma delas é que a maioria dos FS, quando injetados na circulação sanguínea, comporta-se como macromoléculas, devido à ligação a grandes proteínas do plasma ou à formação de agregados intermoleculares de tamanho similar. Outro aspecto importante é que o endotélio que irriga a região tumoral possui a permeabilidade aumentada para macromoléculas, portanto os FS extravasam da circulação acumulando-se nos tecidos tumorais (HAMBLEY, 2008).

A retenção dos FS no tecido neoplásico, segundo Roberts e Hasan (ROBERTS e HASAN, 1992), acontece devido à drenagem linfática nessa região ser pouco desenvolvida ou está comprometida. Outra teoria está relacionada à ligação dos FS a lipoproteínas, principalmente LDL. Como as células de câncer têm a expressão de receptores de LDL (apoB/E) aumentada, devido à grande necessidade de colesterol, para a biosíntese de lipídios da membrana, em função de sua rápida proliferação, os FS seriam transportados para a região do tumor juntamente com essas lipoproteínas (SOLBAN et al., 2006), acumulando-se nessa região. A infiltração de macrófagos nos tumores sólidos é outra proposta utilizada para explicar a acumulação dos FS nos tecidos neoplásicos (HAMBLIN e NEWMAN, 1994b), pois os macrófagos encontrados associados ao tumor apresentam maior quantidade de FS que as células neoplásicas (KORBELIK e KROSL, 1995). Isso se deve ao processo de fagocitose, por macrófagos, de agregados de FS ou

lipoproteínas alteradas pela ligação ao FS (HAMBLIN e NEWMAN, 1994a). Outro fator determinante na seletividade da TFD é a exposição da região tumoral à luz. Para que as espécies reativas responsáveis pela citotoxicidade da TFD sejam geradas, o FS deve ser seletivamente irradiado com luz na mesma faixa de comprimento de onda correspondente ao seu máximo de absorção (TAPAJOS et al., 2008). Assim, após a administração do FS, somente a lesão neoplásica é irradiada, sendo o oxigênio singlete e as outras espécies reativas de oxigênio formadas apenas nessa região. O principal agente citotóxico da TFD, o oxigênio singlete, tem pequena capacidade de difusão, aproximadamente 0,01 a 0,02 μm nas células durante seu curto tempo de vida (10^{-6} a 10^{-9} segundos) (MOAN e BERG, 1991), o que restringe as reações fotodinâmicas à região de irradiação e localização do FS.

1.3.2. Mecanismo de ação na psoríase

Outra área de atuação da TFD é no tratamento da psoríase. Através dos derivados de benzoporfirínicos e porfírenos, observam-se possíveis agentes que podem atuar neste seguimento (BONNETT, 2000).

Psoríase é uma doença inflamatória da pele, de forma crônica, que acomete aproximadamente 2,5% dos caucasianos e 1,3% dos negros na população americana (TANDON et al., 2008). Estima-se que a prevalência dessa doença no mundo esteja em torno de 0,6% a 4,8% (NEIMANN et al., 2006).

A psoríase possui uma patogênese que inclui alteração da diferenciação, aumento da proliferação de queratinócitos, e infiltração das células T (SMITS et al., 2006). Essa doença é mediada por fatores genéticos e imunológicos, com a participação direta de citocinas, que são proteínas produzidas por muitos tipos celulares, que modulam a função de outras células. As citocinas promovem a ativação de outros componentes do sistema imunológico e outro subgrupo de linfócitos, os linfócitos B, que, por sua vez, se encarregam de produzir anticorpos específicos para aquele antígeno (SMITS et al., 2006).

Nos Estados Unidos o ácido amino levulínico (ALA) usado na TFD foi aprovado pelo FDA para queratose actínica. O ALA por si só não é um fármaco fotossensível, mas funciona como um pró-fármaco que é transformado em um

potente derivado porfirínico endógeno, protoporfirina IX (PpIX), pela via biosintética do grupo heme. A protoporfirina IX pode ser ativada por luz azul ou vermelha para provocar destruição dos tecidos (GOLD e GOLDMAN, 2004; KURWA e BARLOW, 1999).

Avaliando a expressão de citocinas em cultura de queratinócitos humanos imortalizados linhagem HaCaT demonstrou que, após TFD, com a utilização de ALA e variando as concentrações de fármaco e de luz, foi possível determinar a dose de luz e concentração de fármaco necessárias, para expressão de citocinas responsáveis por reduzir o efeito inflamatório e atuar terapeuticamente na psoríase (BYUN et al., 2009).

1.3.3 TFD na Degeneração Macular Relacionada com a Idade (DMRI)

A Degeneração Macular Relacionada com a Idade é uma condição degenerativa da região central da retina rica em cones, denominada mácula, sendo subdividida em duas formas, a exudativa e a não exudativa. A forma não exudativa, seca, geográfica, ou não neovascular é caracterizada pela presença de área atrófica, onde se observam grandes vasos da coróide e ausência de membrana coroidal neovascular (MCNV). Esta forma é inicialmente identificada por distorções na região central da retina mais dedicada para a visão de alta definição. Nesta região aparecem manchas amareladas que se depositam, denominadas drusas. Acomete aproximadamente 90 % dos pacientes, possui uma progressão da doença e uma redução da acuidade visual relativamente lenta (PENFOLD e PROVIS, 2005).

A forma neovascular ou exudativa acomete aproximadamente 10 % da população, embora mais rara, é responsável por 90 % da perda severa da visão provocada pela destruição de fotorreceptores (cones e bastonetes presentes no epitélio pigmentar da retina), agravada pelo aparecimento de neovascularização da coróide (NVC) tendo como aspecto importante a presença de exsudatos lipídicos, hemorragias (KLEIN e KLEIN, 2004; COSTA et al., 2001). A DMRI é uma doença de vários estágios, complexa e que varia de acordo com as alterações no epitélio pigmentar da retina (EPR) (GRISANTI e TATAR, 2008).

O epitélio pigmentar da retina (Figura 5) é formado por uma monocamada de células pigmentadas e compõe a barreira entre o sangue e a retina (BOK, 1993). Possui externamente à membrana da região apical, fotorreceptores (cones e bastonetes), que são internalizados por microvilosidades em toda a extensão do EPR. Em sua região basolateral é delimitado pela membrana de Bruch que separa o EPR do endotélio fenestrado dos coriocapilares (STRAUSS, 2005). Por ter uma camada de células pigmentadas absorve energia luminosa capturada pela retina (BOULTON e DAYHAW-BARKER, 2001). O EPR transporta íons, água, e metabólitos do espaço subretinal ao sangue (DORNONVILLE e LACOUR, 1993) e é responsável pela retirada de nutrientes (glicose, ácidos graxos, retinol) dos vasos sanguíneos para transportá-los aos fotorreceptores.

Figura 5. Ilustração do Epitélio Pigmentar da Retina (EPR)

A NVC é o desenvolvimento anormal de vasos sanguíneos no espaço subretiniano e sua formação envolve os seguintes passos: sinal de degeneração do EPR, aparecimento de drusas, rompimento da membrana de Bruch, formação e conseqüente cicatrização da NVC. De acordo com a característica da lesão a NVC pode ser classificada em clássica ou oculta. A clássica é observada através da angiografia de uma lesão inicialmente bem definida com extravasamento do contraste nas últimas fases do exame, ocasionalmente podendo-se discernir a delimitação da malha de neovasos. A NVC oculta possui dois modelos de angiografia. A forma mais comum é o descolamento do epitélio pigmentar da retina, observado por uma elevação irregular, caracterizada por um espalhamento da

fluorescência (observado na angiografia). A outra forma é uma fluorescência tardia, observada por extravasamento do contraste a partir de uma origem desconhecida (LA COUR et al., 2002).

A consequência da NVC sem tratamento é tipicamente, com o passar do tempo, uma perda de acuidade visual sendo, a extensão de perda visual, dependente da localização da lesão (LA COUR et al., 2002).

O Grupo de estudo de hipertermia macular (MPS) estudou os fatores de risco para o desenvolvimento de NVC e criou um tipo de classificação para indicar o local da lesão, tendo como referência a região central da retina denominada fóvea: extrafoveal 200-2500 μm ; justafoveal 1-199 μm ; subfoveal 0 μm (KULKARNI e KUPPERMANN, 2005).

A escolha do tratamento para a NVC, de acordo com o MPS, está intimamente relacionada ao local e ao tipo de lesão (clássica ou oculta) como se observa na Tabela 1 (KULKARNI e KUPPERMANN, 2005).

Tabela 1. Indicação de tratamento para NVC.

Localização da NVC	Tipo de NVC	Tratamento indicado
1 Extrafoveal	Clássica	Laser térmico
	Oculta	Não há indicação
2. Justafoveal	Clássica	Laser térmico
	Oculta	Não há indicação
3. Subfoveal	Clássica e oculta	TFD quando NVC > 50% do tipo clássica,
	Oculta	Macugen®TFD, Macugen®

Outros fatores não menos importantes são observados na escolha do tratamento como: o tempo de lesão, grau de comprometimento da visão. Contudo faz-se necessário avaliar sempre a relação custo/benefício para o paciente já que as terapias convencionais (terapia farmacológica, cirurgia, radioterapia, laser térmico) são muito invasivas com alto índice de reações adversas (PENFOLD e PROVIS, 2005).

A TFD tem provado ser benéfica ao reduzir os riscos de perda severa da visão em pacientes com Degeneração macular relacionada com a idade (AMD)

agravada por neovascularização subfoveal da coróide mostrando estatisticamente um benefício significativo tanto na neovascularização da coróide clássica como oculta (PIERMAROCCHI et al., 2002)

Reichel e colaboradores utilizaram a indocianina verde no tratamento de neovascularização subfoveal da coróide com pouca definição e obtiveram alguns resultados que proporcionaram a utilização desta substância nesta terapêutica (FLOWER, 2000).

1.3.4. Atividade Antimicrobiana

O Uso de Fármacos fotossensíveis associados à luz, com o propósito de causar morte de microorganismos é promissor. Bactérias, fungos e vírus podem ser inativados com utilização da TFD. No entanto, existem diferenças importantes entre as bactérias que podem determinar a ação do fármaco fotossensível (BONNETT, 2000). Por exemplo, a parede celular das gram-positivas possui apenas uma membrana, a membrana citoplasmática. Esta membrana possui uma camada de peptidoglicano mais espessa, garantindo a forma estrutural da bactéria. As bactérias gram-negativas têm duas membranas: a membrana citoplasmática e uma membrana externa. Outra diferença importante é que apesar de possuírem lipopolissacarídeos (LPS) com grupos fosfato como principal constituinte da membrana externa, as gram-positivas apresentam, intercalando estes fosfolipídios na membrana, ácidos lipoteicóicos (ALT), enquanto as gram-negativas apresentam β -proteínas denominadas porinas que são permeáveis a moléculas hidrofílicas de 600 Da (TRABULSI, 2004).

As bactérias possuem na constituição da membrana fosfolipídios zeuteriônicos, na maioria fosfatidiletanolamina e os predominantemente aniônicos, fosfatidilglicerol e cardiolipina. A exposição destes fosfolipídios aniônicos juntamente com LPS e ALT fornece seletividade catiônica à membrana (EPAND e EPAND, 2009).

Fármacos fotossensíveis catiônicos, como meso-tetrakis (4-N-metilpiridil) porfirina parecem ser eficientes na promoção da morte de ambas as bactérias gram-positivas e gram-negativas, na presença de luz (MERCHAT et al., 1996). Estes agentes podem ser veiculados (por ligação química ou interação física) em microcápsulas poliméricas ou lipossomas (BONNETT et al., 1993). Novos estudos

mostraram também a ação da TFD na área periodôntica. A vantagem desta nova abordagem inclui a eliminação de bactérias de forma rápida, mínima chance de desenvolvimento de resistência, segurança dos tecidos adjacentes e manutenção da microbiota normal (RAGHAVENDRA et al., 2009)

O principal foco do estudo com vírus é a destruição do vírus do HIV, disseminado pelo corpo, sem incapacitar os eritrócitos (que possuem a função principal de transporte de oxigênio e de gás carbônico). Este tem sido o aspecto importante sobre a propagação da infecção por vírus no sangue transfundido (WAGNER et al., 1998).

No caso da ação antifúngica, os resultados de investigações experimentais têm demonstrado que dermatófitos e leveduras podem ser efetivamente sensibilizadas *in vitro* por corantes pertencentes a três grupos químicos: fenotiazinas, porfirinas e ftalocianinas. Há possibilidade também, de promover a excitação do ácido amino levulínico endógeno transformando-o em protoporfirina IX. Esta por sua vez além de ser eficaz, a TFD antifúngica é seletiva, pois os fungos podem ser mortos com doses muito mais baixas do que aquelas que matam queratinócitos (células responsáveis pela síntese de queratina que forma as quatro camadas da epiderme) (CALZAVARA-PINTON et al., 2005).

As possibilidades para o futuro da TFD não são limitadas, pois esta terapia não tem sido apenas apreciada e estudada no passado. Portanto Com o valor da TFD sendo reconhecido nos dias atuais o futuro desenvolvimento da TFD parece ser realmente encorajador.

1.4. Sistema de liberação em Terapia Fotodinâmica

Para que um fármaco administrado, por qualquer via de administração, tenha boa absorção e distribuição em todos os tecidos do organismo, deve existir um equilíbrio entre lipofilia e hidrofilia, ou seja, um coeficiente de partição adequado. A natureza lipofílica da molécula permite a passagem deste fármaco através das barreiras fisiológicas naturais como o epitélio intestinal e a barreira hematoencefálica. No caso da distribuição pelos tecidos a natureza hidrofílica é o fator determinante.

A maioria dos fármacos fotossensíveis é hidrofóbica, possuindo também baixa seletividade ao tumor. Devido à baixa solubilidade em água se agregam resultando em forte efeito negativo nas propriedades fotofísicas. Dessa forma, a veiculação do FS em sistemas terapêuticos, através de sistemas de liberação controlada (SLC) permite o aumento da fotoestabilidade, maior solubilidade nos fluidos orgânicos, com menor constante de dimerização e consequente efeito positivo nas propriedades fotofísicas que são importantes para TFD (SAXENA et al., 2004).

O sistema de liberação ideal deve ser capaz de acumular seletivamente o FS no tecido doente para que ocorra pouca ou nenhuma retenção pelas células saudáveis. Além disso, os sistemas de liberação devem ser capazes de incorporar o FS sem a perda ou alteração de sua atividade.

Estes sistemas devem ser biodegradáveis e não alergênicos (SATO e SUNAMOTO, 1993). A velocidade e extensão da incorporação no tecido alvo é claramente influenciada pelas propriedades físico-química do fármaco fotossensível e pelo modo de liberação do fármaco. Outra razão para a utilização de SLC para FS é permitir que estes sejam administrados na sua forma monomérica (NUNES et al., 2004). Isso porque, devido a sua estrutura química, a maioria dos FS tende a se agregar em meio aquoso de forma a diminuir o contato das moléculas hidrofóbicas com a água (ROSENTHAL, 1991). Esta característica é um dos fatores que diminui a sua eficiência *in vivo*, pois reduz a biodisponibilidade e limita as propriedades fotofísicas, como conversões internas, contribuindo para diminuição do tempo de vida do estado tripleto e redução da capacidade de fotoexcitação (BRASSEUR et al., 1988). Uma das maiores dificuldades no tratamento do câncer é obter concentrações do fármaco na faixa terapêutica nas células cancerosas sem, no entanto produzir efeitos tóxicos em células saudáveis. O fármaco livre, por sua vez, é geralmente distribuído indistintamente, entre diversas células, tecidos ou órgãos do corpo, levando ao aparecimento de inúmeros efeitos adversos em outros locais que não o sítio de ação desejado. Vários sistemas de liberação têm sido propostos como excelentes sistemas de veiculação para fármacos fotossensíveis instáveis em meio biológico, aumentando o rendimento quântico de oxigênio singleto, a concentração no órgão desejado, estabilidade e solubilidade nos fluidos biológicos (NORUM et al., 2009; NISHIYAMA et al., 2009). Dentre estes sistemas merecem destaque, os lipossomas, as nanopartículas, as microesferas protéicas e poliméricas entre outros sistemas (NORUM et al., 2009; NISHIYAMA et al., 2009).

1.4.1 Lipossomas

Os lipossomas foram descobertos no início da década de 60, através de estudos da hidratação de filmes lipídicos depositados nas paredes de um frasco de vidro. (corpo gorduroso) (BANGHAM et al., 1965). Lipossomas são estruturas vesiculares formadas por bicamadas fosfolipídicas com um compartimento aquoso em seu interior. Devido ao seu alto grau de biocompatibilidade, os lipossomas têm sido usados como sistemas de liberação para uma variedade de moléculas (CHRISTESEN ET AL.; 2008; EL KATEB ET AL., 2008; GREGORIADIS, 2007). O termo lipossoma foi utilizado pela primeira vez nos anos 60 para definir agregados esféricos, que se formavam espontaneamente quando na adição de água a filmes lipídicos secos (BANGHAN et al., 1965). Estes filmes lipídicos conhecidos como anfifílicos quando em contato com excesso de água, por processos entrópicos, se unem formando vesículas fechadas provocando uma internalização da região lipofílica criando um compartimento interno aquoso (SEGOTA e TEZAK, 2006), como observado na Figura 6.

Atualmente muitas técnicas de preparação dos lipossomas permitiram sua utilização em diversas áreas, garantindo um sistema qualificado para liberar o fármaco no local indicado para ação e com baixo índice de reações adversas. Além destas vantagens, há garantia de um alto índice de encapsulação, permitindo atingir quase 100% (ZUCKER et al., 2009).

(http://ici.cegep-ste-foy.qc.ca/.../lipides_2.htm)

Figura 6. Representação de um lipossoma unilamelar

As propriedades dos lipossomas variam substancialmente com a composição do lipídio, tamanho, carga superficial e método de preparação (SOFOU, 2007; SHARMAN et al., 1999). A escolha dos componentes do lipossoma determina a rigidez (ou a fluidez) bem como a carga da bicamada. Por exemplo, fosfolipídios ilustrados na Tabela 2, que compõem a base estrutural de alguns lipossomas, quando saturados com cadeias acilas longas como dipalmitoilfosfatidilcolina (FOSFATIDILCOLINA) formam uma estrutura rígida e impermeável, enquanto as fosfatidilcolinas naturais insaturadas formam estruturas mais permeáveis e menos estáveis (FRÉZARD, 2005).

Tabela 2. Exemplos de lipídios formadores de bicamadas utilizados na preparação de fármacos na forma encapsulada em lipossomas.

Família de lipídeos Fórmula estrutural	R (cadeia hidrofóbica) (nome)	Abreviação (T_L)
Fosfatidilcolina	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{C}(\text{O})-$ (oleil)	DOPC ($<0^\circ\text{C}$)
	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}(\text{O})-$ (miristoil)	DMPC ($+23^\circ\text{C}$)
	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-$ (palmitoil)	DPPC ($+42^\circ\text{C}$)
	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{C}(\text{O})-$ (estearoil)	DSPC ($+55^\circ\text{C}$)
Fosfatidilglicerol	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{C}(\text{O})-$ (miristoil)	DMPG ($+13^\circ\text{C}$)
	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{C}(\text{O})-$ (palmitoil)	DPPG ($+35^\circ\text{C}$)
Alquil polioxietileno éter (exemplo de surfactante não iônico)	$\text{R}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-$ (cetil)
		C_{16}EO_7 ($+35^\circ\text{C}$)

(FRÉZARD et al, 2005)

Outro aspecto importante é a possibilidade de incorporação de outras substâncias com a finalidade de alterar as características da membrana. O colesterol, por exemplo, melhora a fluidez da bicamada lipídica, reduz a

permeabilidade de moléculas hidrossolúveis através da membrana e melhora a estabilidade dos lipossomas na presença de fluídos biológicos como sangue (VEMURI e RHODES, 1995).

Os lipossomas podem proteger o fármaco da degradação enzimática, possibilitam o aumento da concentração do fármaco no sítio alvo, podem ser utilizados como excipientes não tóxicos para a solubilização de fármacos hidrofóbicos, além de prolongar o tempo da vesícula na circulação, permitindo um possível direcionamento para sítios específicos de células ou órgãos (GREGORIADIS, 2007). Alguns problemas relacionados aos lipossomas têm sido a rápida liberação no sangue, devido à adsorção de proteínas do plasma (opsoninas) com a membrana fosfolipídica, como também reconhecimento e captação dos lipossomas pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM). A habilidade dos lipossomas para penetrar nos tecidos doentes está diretamente correlacionada com o seu tamanho. Lipossomas grandes são rapidamente removidos da circulação por macrófagos e não se obtém significantes níveis nos outros tecidos do corpo, enquanto lipossomas pequenos (≤ 100 nm) demoram um pouco mais para serem reconhecidos e fagocitados, aumentando a probabilidade dos mesmos penetrarem os tecidos. Isso pode ser evidenciado em áreas como quimioterapia do câncer, terapia antimicrobiana, vacinas, diagnóstico por imagem e tratamento de desordens oftálmicas (GREGORIADIS, 2007).

Os fármacos encapsulados em lipossomas exibem propriedades farmacológicas às formulações convencionais (GREGORIADIS, 2007; GREGORIADIS e FLORENCE, 1993). Estudos com lipossomas estericamente estabilizados tem sido propostos com a intenção de aumentar o tempo de permanência do fármaco na circulação (OKU, 1999), gerando melhora na estabilidade, com redução na constante de dimerização e consequente redução ou ausência de agregação de certas cianinas e porfirinas (VOSZKA et al., 2007; MAMAN et al., 1999; SIDOROWICZ et al., 1997).

Estudo envolvendo lipossomas com ftalocianina de zinco associados com complexos de nitrozilo de rutênio demonstraram a ocorrência de ação sinérgica do oxigênio singlete da ftalocianina e o óxido nítrico do complexo de rutênio (MARANHO et al., 2009). Este comportamento demonstra capacidade dos lipossomas incorporarem substâncias com propriedades físico-químicas diferentes, proporcionando um aumento da ação na TFD (MARANHO et al., 2009).

Estudos demonstraram que fármacos fotossensíveis são excelentes candidatos a incorporação em lipossomas localizando-se na bicamada lipídica destes sistemas. Esta localização para o fármaco fotossensível favorece a redução da agregação, proporcionando maior quantidade de unidades monoméricas. Consequentemente há uma melhora significativa nas propriedades fotofísicas e ação farmacológica na TFD (NOISEUX et al., 2008).

1.4.2 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas (CD) foram isoladas pela primeira vez em 1891 por VILLERS, como produto da degradação enzimática do amido, sendo caracterizadas como oligossacarídeos cíclicos em 1904 por SCHARDINGER (DUCHENE e WOUESSIDJEW, 1992).

A estrutura da ciclodextrina só foi caracterizada entre 1930 e 1970 por FREUDENBERG e colaboradores (SZEJTLI, 1998). As ciclodextrinas apresentam em sua estrutura unidades de glicopirranose unidas com ligações α -1,4. Por modificação enzimática é possível obter ciclização de seis sete ou oito unidades de glicose dando origem às α , β e γ ciclodextrinas (Figura 7) gerando a formação de estrutura de formato cônico.

Figura 7. Representação esquemática das principais ciclodextrinas naturais

Esse formato, por sua vez, apresenta voltadas para dentro da estrutura, cadeias carbônicas ligadas por átomos de oxigênio (ligações etéreas), o que lhes confere uma região interna hidrofóbica e uma estrutura externa hidrofílica (MCCORMACK e GREGORIADIS, 1994).

As ciclodextrinas são atualmente produzidas com baixo custo, alto grau de pureza, tornando-se cada vez mais freqüente o seu uso. Recentemente, as ciclodextrinas têm sido utilizadas pela indústria farmacêutica, como excipientes farmacêuticos para melhorar a solubilidade e estabilidade de fármacos (JANSOOK e LOFTSSON, 2009). A utilização de CD deve-se ao fato de que quando complexadas com outras substâncias garantem possíveis alterações, ou seja, melhorias na solubilidade em água e líquidos orgânicos (fármacos lipossolúveis), estabilidade e/ou biodisponibilidade para essas substâncias.

Quando formadoras de complexos de inclusão geram uma estequiometria, muitas vezes, de 1:1 que é normalmente descrita pela equação 1. No entanto, outras formas de estequiometria são observadas e postuladas (STELLA e HE, 2008). Esta formação de complexo altera as propriedades físico-químicas e biológicas do fármaco, tornando-as mais favoráveis a ação do fármaco (STELLA e HE, 2008).

Apesar de promoverem aumento na solubilidade de fármacos lipofílicos, algumas ciclodextrinas, principalmente as naturais, apresentam problemas com a solubilidade. O principal exemplo é o da β -CD que quando complexada com outros fármacos lipofílicos apresenta solubilidade limitada (CHALLA et al., 2005). Para resolver este problema tem-se substituído os grupos hidroxil-propil, sulfo-butil-éter, metil, hidroxil entre outros, resultando desta forma um grande aumento da solubilidade das ciclodextrinas. Esta baixa solubilidade está relacionada às forças das ligações de hidrogênio existentes no cristal das CD, portanto com a adição dos radicais há uma desestabilização na estrutura do cristal promovendo um aumento na solubilidade. O microambiente lipofílico interno permite que, fármacos com as mesmas características e tamanho adequado possam ser inclusos dentro da cavidade da ciclodextrina (BREWSTER e LOFTSSON, 2007). Entretanto alguns dos fatores determinantes para que ocorra a inclusão são o impedimento estérico da molécula hóspede, volume e o diâmetro interno da cavidade das ciclodextrinas.

Em escala industrial a escolha do método de produção das ciclodextrinas é feita seguindo os seguintes critérios: simplicidade, rapidez, baixo custo, e bom rendimento. Os métodos de preparação das ciclodextrinas correntemente descritos na literatura podem ser divididos em três grupos: em meio líquido, em meio semi-sólido e em meio sólido.

Na escolha do tipo de ciclodextrina para determinada formulação, a solubilidade intrínseca da ciclodextrina, a capacidade da ciclodextrina incluir a molécula hóspede, a magnitude da constante de estabilidade, efeitos de grupos estabilizantes (C=O, NO₂, C=S, F) são também fatores determinantes, destinando ao fármaco escolhido a possibilidade de entrar por qualquer um dos lados do cone dependendo isto do seu tamanho.

A Tabela 3 mostra algumas propriedades físicas mais comuns das ciclodextrinas

Tabela 3: Características físicas das ciclodextrinas

Características	Ciclodextrinas		
	α	β	γ
Diâmetro da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura do cone (Å)	7,9	7,9	7,9
Diâmetro da periferia (Å)	14,6	15,4	17,5
Volume da cavidade aproximado (Å ³)	174	262	472
Volume da cavidade aproximado			
por mol de ciclodextrina (mL)	104	157	256
por grama de ciclodextrina (mL)	0,10	0,14	0,20

(KIBBE, 2000)

A incorporação das CD em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada. Segundo estatística recente, as associações com CD já foram estudadas com 515 princípios ativos, melhorando sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (SZEJTLI, 2005). Mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial contam com a presença deste excipiente em suas fórmulas (LOFTSSON e DUCHENE, 2007; DAVIS e BREWSTER, 2004).

Dentre estes diversos trabalhos acima citados temos as ciclodextrinas em liberação oftálmica de fármacos pouco solúveis em água para aumentar sua solubilidade e ou estabilidade no fluido lacrimal e em alguns casos para reduzir a irritação (RAJEWSKI e STELLA, 1996; FRIJLINK et al., 1990a; FRIJLINK et al., 1990b).

As ciclodextrinas possuem o potencial de aumentar a liberação dos fármacos em sistemas poliméricos matriciais por aumentar a concentração de difusibilidade destes dentro da matrix. GUO e COOKLOCK (1995) usaram uma gama de excipientes incluindo ciclodextrinas para aumentar a solubilidade de analgésicos opioides e outros fármacos com baixa solubilidade em água (GUO et al., 2005).

Estudos demonstraram a capacidade que as ciclodextrinas possuíam de aumentar a produção de oxigênio singlete e reduzir o rendimento quântico de fluorescência pela capacidade da manutenção da forma monomérica de fármacos fotossensíveis e de cruzamento intersistemas para o estado triplete. Nota-se, portanto, a capacidade que a ciclodextrina possui de interagir com as ftalocianinas, modificando suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas (TAU et al., 2003).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

- Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de lipossomas estáveis que possam servir de sistema de liberação para os fármacos Indocianina verde (ICV) e ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc), para serem utilizados na TFD.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a formação de complexos moleculares da ftalocianina de cloro-alumínio com HP- β -CD e HP- β -CD e possível incorporação em lipossomas.
- Avaliar os sistemas de liberação quanto aos aspectos fotoquímicos, fotofísicos e fotobiológicos *in vitro* no estado estacionário e resolvido no tempo.
- Avaliar a influencia deste sistema no tocante a interação às proteínas plasmáticas, com a albumina de soro bovino (BSA) através da determinação da constante de ligação (kb) e do número de sítios de ligação.

3. Material e Métodos

3.1 Material

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura, obtida através de filtragem seqüencial com colunas de troca iônica em um sistema 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 $\text{m}\Omega$.

As matérias primas: Indocianina verde (Ophtalmos); Ftalocianina de cloro-alumínio (Sigma), Fosfatidilcolina de soja – lipid 100 (Lipoid), colesterol (Sigma), Ciclodextrinas β -ciclodextrina e HP- β -ciclodextrina (Sigma), dimetilsulfóxido-DMSO (Sigma) e etanol (Merck), foram usados como adquiridos, sem tratamento prévio.

Os estudos in vitro envolvendo cultura de células foram realizados com a linhagem neoplásica de macrófagos J 774-A (American Type Culture Collection, ATCC). Esse tipo de célula plasmática é obtido originalmente de ratos DBA/2. Para cultura celular foram utilizados: meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab), penicilina 10.000 U.I./ml (Cultilab), estreptomicina 10 mg/ml (Cultilab) e anfotericina 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (Cultilab). Ao final da adição destes componentes, esse meio foi filtrado, com membrana de 0,22 μm , em capela de fluxo laminar e posteriormente acondicionado em garrafa de vidro estéril.

As soluções de tampão fosfato (PBS), pH 7,4, na concentração de 10 mmol.L^{-1} , a serem utilizadas nas preparações de lipossomas e nos demais experimentos, foram preparadas pela mistura de diferentes volumes de soluções de fosfato monobásico de sódio 0,01 mmol.L^{-1} (Sigma) e fosfato dibásico de sódio 0,01 mmol.L^{-1} (Merck) preparados em água ultrapura.

3.2 Equipamentos

Para os estudos com células foram utilizados: microscópio óptico convencional Olympus BX 50, incubadora de CO_2 Forma Scientific, capela fluxo laminar Veco modelo A152, e banhos termostatizáveis Fischer Scientific, modelo

801 e ultrassom Branson modelo 2210. Para a análise de viabilidade celular utilizou-se um leitor espectrofotométrico para protocolos de ELISA, modelo Safire² da TEKAN.

Na determinação da eficiência de encapsulação foram utilizados filtros Millipore Microcon ultracel YM-100, Millipore, Irlanda. As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga tipo Eppendorf Centrifuge 5810 R, Hamburg, Alemanha.

Nos ensaios biológicos de fototoxicidade em célula J 774-A utilizou-se o sistema laser de diodo Eagle da Quantum Tech, operando na potência máxima de 4800 J/cm², no comprimento de onda de emissão em 675 nm acoplado a uma fibra óptica e um laser de diodo Fotocoagulador laser FTC 1200 com comprimento de onda de emissão em 810 nm operando na potência máxima de 48 J/cm².

Nos estudos espectrofotométricos foram utilizados espectrofotômetro de absorção modelo Lambda 20 da Perkin Elmer e os espectrofluorímetricos Fluorog 3 da Jobin Ivon- Spex e F4500 da Hitachi, ambos com controle de temperatura e agitação.

Para as medidas de decaimento de fluorescência foi utilizado o método de contagem simples de fótons. No início do processo, um laser de diodo, 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. Esse feixe passa, 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 nm até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Os estudos de decaimento de fluorescência foram analisados utilizando-se o software do próprio instrumento. Esse estudo foi realizado no Laboratório de Biofísica Molecular da FFCLRP/USP, coordenado pelo Prof. Dr. Amando Siuiti Ito.

A fonte de irradiação laser utilizada nos experimentos de determinação do tempo de vida de fosforescência, foi um sistema LASER pulsado de Nd-YAG (Continuum, Santa Clara, CA) modelo Surelite I-10, com frequência de pulsos de 8 ns, com intervalo de potência de 1 a 30 mJ por pulso. O equipamento foi ajustado para utilização do terceiro harmônico, com fonte de excitação em 355 nm. Para

calibração da potência foi utilizado um *power meter* Field Master of Coherent (Santa Clara, CA) com uma cabeça de detecção modelo L-30V.

Para varredura no UV-visível ($\lambda = 300\text{-}800\text{ nm}$) utilizou-se como fonte de irradiação uma lâmpada de tungstênio/halogênio com 400 W de potência. Para detecção do sinal foi utilizado um monocromador da Bentham Instruments (Livingston, UK) modelo M300, e uma fotomultiplicadora da Hamamatsu modelo R928P. Os sinais foram detectados utilizando-se um osciloscópio digital da Tetronix modelo TDS 340A, sendo consecutivamente transferidos para um microcomputador e analisados com o auxílio do software Gem[®] fornecido pela Edinburgh Analytical Instruments (Livingston, UK).

Nos estudos envolvendo a detecção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o sinal de emissão de fosforescência do oxigênio singlete foi monitorado em 1270 nm, utilizando-se um fotodetector de germânio da North Coast Scientific Corporation, modelo 823A. Os sinais dos transientes gerados e do oxigênio singlete foram detectados por um osciloscópio digital (Tektronix modelo TDS 340A), transferidos para um computador compatível e, então, processados e analisados utilizando-se o software operacional do próprio instrumento.

Além desses sistemas ópticos citados, foram utilizados os seguintes equipamentos: balança eletrônica da Denver Instruments Company modelo A-200 DS, sistema vortex Phoenix modelo AP-50, pH-metro modelo accumet[®] 50 da Fischer Scientific, rotaevaporador com controle térmico modelo R-124 da Büchi. Para o controle da temperatura durante os experimentos foram utilizados banhos termostatizáveis da PolyScience.

Nos estudos de determinação do potencial zeta e 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, possuindo a capacidade de determinar tamanho de partículas no intervalo de 2 nm a 3 μm . As medidas foram realizadas num ângulo de detecção de 90° e a posição da medida na cubeta foi automaticamente determinada pelo software do equipamento. A análise da distribuição de tamanho dos lipossomas d e ICV e AICIPc complexado ou não com ciclodextrinas foi realizada no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FCFRP/USP da Prof^a Dra. Maria Vitória Lopes Badra Bentley, no equipamento acima descrito, adquirido junto ao grupo Multiusuário (Processo Fapesp no 04/09465-7)

3.3 Metodos

3.3.1 Preparação das amostras

3.3.1 a) Preparação dos complexos de ciclodextrinas

Os complexos e as soluções estoque de ciclodextrinas utilizadas nas formulações de lipossomas foram preparadas de duas formas distintas:

a) Inicialmente preparou-se uma solução estoque de AlClPc em etanol absoluto na concentração de 1 mmol.L^{-1} . Uma alíquota de $250 \text{ }\mu\text{L}$, desta solução foi adicionada a um balão de 10 mL sendo diluída com etanol para atingir uma concentração final de $25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ sendo esta utilizada como solução estoque para os estudos de formação do complexo. Soluções PBS na concentração de 10 mmol.L^{-1} , pH 7,4 foram utilizadas e adicionadas às soluções descritas anteriormente para avaliação da influência da mistura de solventes, no perfil espectral da AlClPc complexada.

b) Os complexos de ftalocianina de cloro-alumínio com ciclodextrinas foram preparados nas concentrações de $62,5 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ para AlClPc, $375 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ para beta e hidroxipropil beta ciclodextrinas respectivamente, em um volume de 2 mL de etanol. Esta mistura se manteve sobre agitação por 24h com o propósito de atingir o equilíbrio de solubilidade do complexo. Estas soluções com os complexos foram utilizadas para incorporação nos lipossomas. As concentrações finais de AlClPc complexada nos lipossomas foi de $25 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ para AlClPc e $150 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ para ciclodextrinas, determinadas por espectrofotometria.

3.3.1 b) Preparação dos lipossomas

Os lipossomas foram preparados com $30,92 \text{ mg}$ de fosfatidilcolina de soja (lipoid 100) e $3,87 \text{ mg}$ de colesterol. As soluções de Indocianina Verde na

concentração de 1 mmol.L^{-1} em PBS ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), pH 7,4 e AICIPc na concentração de 1 mmol.L^{-1} em etanol, foram preparadas previamente e serviram como soluções estoque para preparação dos lipossomas.

Formulações de Lipossomas

a) Alíquota de $125 \mu\text{L}$, da solução estoque de ftalocianina de cloro-alumínio foi adicionada à dispersão de fosfatidilcolina e colesterol na concentração de $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente, em uma mistura de solventes orgânicos (1 parte de etanol + 3 de clorofórmio), em um balão de fundo redondo. A evaporação do solvente por pressão negativa de nitrogênio ultrapuro, seguido da secagem em um dissecador sob pressão negativa por 2 horas, levou a formação de um filme aderido ao fundo do balão. Este filme formado foi hidratado com uma solução de PBS contendo ICV na concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para formação de lipossomas multilamelares.

b) Após agitação por 24 h, a solução etanólica do complexo formado (tópico 3.3.1 ab, página 30), foi adicionada em um becker contendo 4 mL de clorofórmio com fosfatidilcolina e colesterol na concentração de $8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente, previamente dissolvidos. Esta solução de complexo, fosfolípido e colesterol foi transferida para um balão de fundo redondo e após evaporação do solvente por degaseamento com nitrogênio, seguido da secagem em um dissecador sob pressão negativa por 2 horas levou a formação de um filme aderido ao fundo do balão. Este filme foi hidratado com uma solução PBS contendo ICV na concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, para formação de lipossomas multilamelares.

As vesículas multilamelares (MLV) foram extrusadas a vesículas unilamelares (SUV), por processos de extrusão através de membranas de policarbonato de 0,4 e $0,2 \mu\text{m}$, 10 e 13 vezes respectivamente, sob atmosfera inerte de nitrogênio sob pressão positiva de 30 Kf/cm^2 , à temperatura ambiente.

Os lipossomas foram, então, liofilizados a temperatura de 40°C por 24h. Às preparações de lipossomas adicionou-se um crioprotetor (trealose 10% p/v em relação ao volume total de 5 mL) com o propósito de proteger as vesículas do processo de congelamento e descongelamento. Estes lipossomas foram utilizados para avaliação do tamanho, potencial zeta e polidispersividade antes e depois da liofilização.

3.3.2. Avaliação do comportamento espectroscópico do complexo AICIPc/CD e determinação da constante de associação.

Os complexos de ciclodextrinas foram preparados de duas formas distintas:

a) Para avaliação dos comportamentos espectroscópicos da AICIPc, na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de ciclodextrinas na concentração de $3,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ foram feitas medidas espectrofotométricas em solução Etanol/PBS na concentração de 10 mmol.L^{-1}) com três relações etanol/tampão escolhidas por um *screening* das variações na relação entre os volumes dos solventes, de 1,5 mL : 0,5 mL; 1,4 mL : 0,6 mL; 1,3 mL : 0,7 mL respectivamente. Estas relações foram as únicas que demonstraram, na avaliação de absorção e de fluorescência, uma boa interação entre AICIPc e ciclodextrinas para realização destes estudos. A concentração final tanto do fármaco quanto da ciclodextrina foram ajustados com etanol absoluto e PBS nas concentrações de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para AICIPc e $3,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ para ciclodextrinas.

Este estudo foi realizado com o propósito de determinar quais as condições necessárias e qual a relação de solvente adequado para caracterizar e avaliar a formação do complexo AICIPc/ciclodextrinas.

b) As amostras de AICIPc ($6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e alíquotas de tampão contendo ciclodextrinas em concentrações crescentes foram adicionadas em cubetas de quartzo, sendo estas concentrações ajustadas com o propósito de avaliar a estequiometria de fármaco/ciclodextrinas. As relações escolhidas neste estudo foram de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4. A constante de associação foi obtida a partir de dados de fluorescência, pela aplicação da equação de Benesi-Hildebrand, que consiste na determinação da constante de associação, através de estudos espectrofotométricos de absorção ou de fluorescência e através do tratamento dos valores obtidos se constrói um gráfico de duplo logaritmo. Dentro da faixa estudada estes valores obedeceram a uma tendência de linearidade, permitindo que se definisse a estequiometria do complexo. (CATENA e BRIGHT, 1989) como apresentado na Equação 2.

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{K_x k_x Q_x [P]_0} x \frac{1}{[CD]_0^n} + \frac{1}{k_x Q_x [P]_0} \quad \text{equação 2}$$

F = fluorescência do fármaco

k_{in} = constante instrumental

F_0 = fluorescência do fármaco com ciclodextrina

[P] = Concentração inicial do fármaco.

K = constante de formação

[CD] concentração inicial de ciclodextrina

Q = rendimento quântico de fluorescência do complexo

3.3.3. Estudos Fotofísicos da AICIPc com ciclodextrinas

Uma série de estudos fotofísicos foram realizados com AICIPc e ciclodextrinas para se avaliar a viabilidade do sinergismo na ação fotodinâmica, não só favorecido pela associação de dois fármacos, mas potencializada também por sistemas de liberação controlada, aumentando, assim, a ação terapêutica do conjunto.

3.3.3.1. Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete da AICIPc na presença de ciclodextrinas (ϕ_Δ)

Para este estudo, as amostras de AICIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram preparadas em uma mistura com 1,5 mL de etanol e 0,5 mL de PBS. A solução de PBS continha previamente dissolvido β -CD ou HP-CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$

Para os estudos envolvendo a geração de oxigênio singlete foram avaliados os comportamentos dos fármacos em meio orgânico e em lipossomas, tendo como padrão amostra de Fioforbide-a, que é considerado um dos compostos padrão nos experimentos de produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), devido à sua capacidade de transferir energia eficientemente para o oxigênio molecular formando $^1\text{O}_2$. (DEROSA e CRUTCHLEY, 2002).

As amostras em meio orgânico foram mantidas com densidade óptica de 0,3 no comprimento de onda de 355 nm. No caso de AICIPc e ICV em meio orgânico as concentrações foram de 1,76 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente. O padrão utilizado Feoforbide-a possui (ϕ_{Δ}) de 0,59, sendo, portanto o valor do rendimento quântico de oxigênio singlete calculado através da equação.

$$\phi_{\Delta amostra} = \frac{I_{amostra}}{I_{ref}} \times \phi_{\Delta ref} \times \frac{\tau_{\Delta ref}}{\tau_{\Delta amostra}} \quad \text{equação 3}$$

I = Intensidade de emissão de fosforescência

τ = tempo de vida do oxigênio singlete

3.3.3.2. Determinação do rendimento quântico de fluorescência da AICIPc na presença de ciclodextrinas (β -CD, HP- β -CD).

Os estudos para se determinar o rendimento quântico de fluorescência dos complexos de inclusão foram realizados empregando-se uma mistura etanol/PBS na relação de 3:1, pelo método relativo utilizando como padrão a ZnPc em etanol proposto por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2006), tendo-se a absorvância ajustada para 0,1 no comprimento de onda de excitação de 610 nm através da equação abaixo.

$$\phi_{amostra} = \frac{\text{Área}_{amostra}}{\text{Área}_{padrão}} \times \frac{\text{Absorvância}_{padrão}}{\text{Absorvância}_{amostra}} \times \frac{n_{padrão}}{n_{amostra}} \times \phi_{padrão} \quad \text{equação 4}$$

ϕ = Rendimento quântico

Área = Referente à área sob a curva do espectro de fluorescência

n = índice de refração dos meios em que foram preparadas as amostras

A amostra de ZnPc foi preparada a partir de uma solução estoque de 2 mL de ZnPc em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,5 mmol.L^{-1} . Alíquotas desta solução foram adicionadas direto na cubeta para um volume total de 2 mL, com ajuste ideal de 1,79 mL de etanol para 0,21 μL da solução estoque em DMSO. Para

as amostras dos complexos não foi necessário o ajuste para absorbância 0,1, já que nesta relação etanol/PBS tanto para β -CD quanto HP- β -CD a densidade óptica no comprimento de onda de excitação (610 nm) já se encontrava na faixa de 0,1.

3.3.3.3 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ICV e da AICIPc em PBSpH = 7,4 e na presença de lipossomas.

A investigação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário da ICV em PBS, pH = 7,4 e AICIPc em etanol absoluto foi baseada em medidas diretas dos espectros de absorção e de emissão de fluorescência.

Os espectros de absorção foram registrados em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, utilizando-se como referência PBS, pH = 7,4 ou etanol absoluto, na presença da ICV e/ou AICIPc. Os espectros de emissão de fluorescência fotoestacionária, foram registrados na faixa de 630 a 750 nm para a cloro-alumínio e 790 a 900 nm para indocianina verde, com excitação em 780 nm para ICV e 612 nm para AICIPc.

3.3.4 Determinação da constante de ligação (K_b) e do número de sítios de ligação da ICV e AICIPc a albumina bovina (BSA).

Foram utilizadas neste estudo lipossomas contendo AICIPc, lipossomas com ICV e lipossomas com complexos de AICIPc/HP- β -CD e ICV. Foram estudados também os complexos de ICV com HP- β -CD. Estes estudos permitiram a avaliação do comportamento dos fármacos incorporados ou não aos lipossomas e na presença de ciclodextrinas a ligação à BSA.

Ligações não covalentes entre fármacos específicos e macromoléculas biológicas (proteínas e lipoproteínas) são de grande importância em estudos envolvendo respostas bioquímicas e farmacológicas dos mesmos (LUNARDI e TEDESCO, 2005). Sabendo-se que a ação do fármaco está intimamente ligada à sua capacidade de se localizar no tecido alvo, sendo a albumina uma proteína típica

do plasma sanguíneo, é de suma importância a investigação da interação dos fármacos com esta proteína já que quando ligado às proteínas plasmáticas a ação farmacológica fica prejudicada.

O sistema de proteína BSA foi mantido a uma concentração constante de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ (densidade óptica menor que 0.05), e titulado com pequenas alíquotas ($10 \text{ }\mu\text{L}$) das preparações variando a concentração de fármaco das amostras. Durante o processo de titulação a concentração total da proteína não foi superior a 2%. A solução de soroproteína foi excitada em 290 nm e a fluorescência medida na faixa espectral de 300 a 500 nm.

3.3.5 Estudos Fotofísicos dos lipossomas

3.3.5.1 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ICV e AICIPc em PBS e em lipossomas

Os tempos de vida da associação AICIPc e ICV em lipossomas foram feitos através da contagem sucessiva de fótons correlacionados com o tempo. Desta forma pode-se construir um histograma que representa a distribuição de probabilidade de emissão de fóton, após o evento de excitação de uma amostra fluorescente, pois o mesmo é proporcional à distribuição de intensidade de fluorescência no tempo para os fótons emitidos como resultado da excitação da amostra.

As amostras de lipossomas foram preparadas com AICIPc e ICV; ICV e AICIPc/CD em um mesmo lipossoma. Foi utilizado também como referência a AICIPc em etanol. No entanto não foi possível observar a ICV em meio tamponado nem em etanol devido à baixa sensibilidade da fotomultiplicadora nesta faixa de emissão. Contudo foi preparado lipossomas de ICV na concentração de $10 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ com o propósito de avaliar se este fármaco apresentaria alguma resposta na mesma região de excitação da AICIPc (355 nm) quando em lipossoma. Foi preparado neste estudo lipossomas contendo ambos os fármacos isoladamente sendo no final da preparação posto em uma mesma amostra.

A cada cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico, foram adicionadas alíquotas 3,0 mL das soluções para estudo contendo o fármaco fotossensível.

As medidas foram realizadas utilizando-se o decaimento exponencial empregando-se como fonte de excitação radiação laser o sistema Titânio/Safira. Os ajustes foram validados através do valor mínimo na função chi-quadrado (χ^2).

3.3.5.2 Determinação do tempo de vida do estado excitado tripleto da AICIPc e associação AICIPc e ICV em lipossomas.

O espectro de absorção do transiente gerado por fotólise por pulso de laser não fornece um valor absoluto para a densidade óptica; obtém-se na verdade, a diferença da absorção entre o precursor e o transiente formado.

Foram previamente obtidos os espectros de absorção no estado fundamental (UV-visível), com ajustes na concentração final do fármaco (AICIPc $6,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e ICV $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) para garantir uma densidade óptica (D.O). de aproximadamente 0,3 na região espectral de excitação (355 nm), garantindo-se uma concentração mínima para produção de espécies transientes.

Para os estudos dos estados tripletes, utilizou-se como fonte de excitação o terceiro harmônico (355 nm) do laser pulsado de Nd-YAG, com monitoramento da absorção no comprimento de onda de 480 nm (Figura 8).

Figura 8: Representação esquemática de um sistema de fotólise por pulso de laser (laser Nd-YAG) utilizado nos experimentos (PRIMO, F. L., 2009).

As amostras estudadas foram: ICV e AICIPc em meio orgânico; complexo ciclodextrina/AICIPc e ICV em lipossomas; ICV e AICIPc em lipossomas.

O espectro de absorção do transiente é dependente da concentração do precursor na região onde este absorve e o valor negativo para a densidade óptica corresponde à formação de um intermediário com uma absorvidade menor que a do precursor, ou seja, o desaparecimento da absorção do espectro de partida no estado estacionário.

3.3.6 Estudos do tamanho das vesículas lipossomais contendo ICV, AICIPc e ICV/AICIPc.

Este estudo teve como objetivo determinar o potencial zeta das formulações, bem como, o diâmetro médio dos lipossomas por espalhamento dinâmico de luz avaliando a influência da presença da associação dos dois fármacos e do complexo ciclodextrina/AICIPc e indocianina verde, em lipossomas nos aspectos supracitados.

Os lipossomas que foram liofilizados com trealose a 10% foram avaliados quanto à manutenção do tamanho e avaliação da variação do potencial zeta.

Um feixe de luz foi incidido na amostra com conseqüente espalhamento desta luz. A intensidade da luz espalhada foi enviada a um autocorrelator que processa os dados e envia-os a um computador que interpreta os dados e determina o raio hidrodinâmico.

As preparações de lipossomas foram diluídas 1:3 em PBS e filtradas em membrana de polycarbonato por duas vezes com o intuito de diminuir a presença de partículas estranhas (poro 0,22 μm). O ensaio foi realizado a um ângulo de espalhamento de 90°, viscosidade 0,890 mPa, a 25°C e índice de refração 1,333.

Foi avaliada também a estabilidade do tamanho dos lipossomas mantendo-os em temperatura ambiente (25 °C) durante quatro semanas.

3.3.7 Determinação da eficiência de encapsulação.

3.3.7.1 Determinação das curvas analíticas para ICV e AICIPc em DMSO

Foram preparadas soluções estoque de ICV e AICIPc nas concentrações de 1 mmol.L⁻¹ em DMSO. Empregando-se uma micro-seringa foram retiradas alíquotas destas soluções estoque e adicionadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Em seguidas estas soluções foram diluídas com volume de DMSO suficiente para se atingir um volume final de 2 mL. Para a ICV, a faixa de concentração para leitura no espectrofotômetro foi de 0,5 µmol.L⁻¹ a 2,5 µmol.L⁻¹ enquanto para a AICIPc 0,4 µmol.L⁻¹ a 3,2 µmol.L⁻¹. Com os valores das densidades ópticas em função da concentração da AICIPc ou ICV foram calculados os coeficientes de correlação e as equações das retas padrões.

As curvas analíticas foram obtidas através da determinação das densidades ópticas dos fármacos, em DMSO nas faixas de concentração supracitadas. Estas medidas foram realizadas em três diferentes dias e em triplicata. A análise da significância estatística entre as densidades ópticas foi realizada pela Análise da Variância Unilateral (ANOVA), utilizando-se o programa Microsoft Office excel 2007.

A representação gráfica da equação da reta foi determinada pela análise de regressão linear do método dos mínimos quadrados, com coeficiente de correlação mais próximo da unidade, utilizando o programa Excel.

Os métodos utilizados para determinação da eficiência de encapsulação de lipossomas envolvem a ruptura da bicamada lipídica e subsequente quantificação do material liberado (BUBOLTZ e FEIGENSON, 1999). Nestas medidas, o sinal verificado pela presença de lipossomas intactos é previamente determinado antes do rompimento da bicamada lipídica. A técnica usada para esta quantificação depende da natureza do fármaco encapsulado. A espectrofotometria (MANOSROI et al., 2004), espectroscopia de fluorescência (GUO et al., 2003), métodos enzimáticos (RAMALDES et al., 1996) e técnicas eletroquímicas são utilizadas como técnicas de quantificação da eficiência de encapsulação dos lipossomas.

A determinação da eficiência de encapsulação dos lipossomas foi feita pelo método de ultracentrifugação e ultrafiltração. A centrifugação é feita para separar o

fármaco encapsulado do não encapsulado. 100 μL da preparação de lipossomas foram centrifugadas a 10.000 rpm, a 4° C, por 1 hora em ependorf microcon® com filtro de 100.000 Daltons. Após a centrifugação o filtrado foi analisado por espectrofotometria.

3.3.7.2 Determinação da concentração de AICIPc nos lipossomas por espectrofotometria

Na tentativa de validar o método por espectrofotometria na região do Visível foram determinadas as seguintes características:

- Linearidade: seis concentrações foram avaliadas (para a ICV, de 0,5 a 2,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e AICIPc, de 0,4 a 3,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$);. As curvas foram obtidas em três diferentes dias.
- Especificidade: Foi avaliada a interferência da presença dos outros constituintes como fosfolípídio, colesterol e indocianina verde.

Os 100 μL obtidos do filtrado, após centrifugação, foram adicionados em cubetas de quartzo e o volume completado para um total de 2 mL com DMSO. As leituras das soluções foram realizadas em espectrofotômetro a 678 nm para AICIPc e 794 nm para ICV Esses comprimentos de onda são responsáveis pelos picos máximos de absorção para os fármacos. Os valores das concentrações dos fármacos foram determinados através das equações das retas padrões para AICIPc e ICV em DMSO.

Foi também determinada a quantidade de fármaco retida na membrana após extrusão para verificar a influência do processo de preparação sobre a eficiência de encapsulação. As membranas foram digeridas em etanol por 24 h e uma alíquota desta solução foi transferida para cubetas de quartzos. Posteriormente as soluções foram diluídas com DMSO e a concentração ajustada, de acordo com a faixa de detecção para este estudo. O fármaco presente no lipossoma foi quantificado como descrito na equação a seguir:

$$EE = \frac{Q_T - (Q_{rm} + Q_f)}{Q_i} \times 100$$

Equação 5

Onde:

EE = eficiência de encapsulação

Q_f = Quantidade de fármaco no filtrado

Q_T = Concentração teórica

Q_i = Quantidade de fármaco inicial

Q_{rm} = Quantidade de fármaco retido na membrana

3.3.8 Estudos *in vitro* envolvendo células neoplásicas

3.3.8.1 Diagrama de crescimento da cultura celular

Dez garrafas de cultura celular de J774-A foram preparadas com concentrações iniciais iguais, de $0,5 \times 10^6$ cel/mL e incubadas a 37°C e 5% CO₂. A cada 12 horas a concentração celular total foi determinada, para cada placa, através da contagem de células por meio da câmara de Neubauer (0,0025 mm² e 0,1 mm de profundidade) como descrito por Freshney (FRESHNEY, 1983).

3.3.8.2 Crescimento e manutenção da cultura de células neoplásicas

As matrizes de células J774-A ($0,5 \times 10^6$ células/mL) (Figura 9) estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas a 37°C e adicionadas em garrafas de cultura (Corning Incorporated, estéril, 25 cm²) contendo 5 mL de meio completo (DMEM). As garrafas de cultura foram colocadas em uma incubadora a 37°C com 5 % de CO₂ durante 48 horas.

Figura 9: Micrografias das células J774-A em cultura de monocamadas, registradas a partir de um microscópio Axiovert 40 CFL com objetiva Ph 1 10x/0,25 (A) e 20x/0,25 (B) com câmera acoplada 7.2 Mpixels.

Após este período, realizou-se a primeira repicagem de células. Como as células crescem aderidas nas garrafas de cultura, foi necessária a utilização de um rodinho para soltá-las e realizar o tratamento da cultura celular. Após esta etapa, o meio contendo as células foi adicionado em um tubo Falcon e centrifugado a 25°C com rotação constante de 1200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspenso com 10 mL de meio completo; as células foram, então, distribuídas em duas novas garrafas de 75 cm². A troca do meio destas células foi realizada sempre que necessária para a manutenção das condições biológicas na cultura celular. 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 congelava-se as mesmas. No processo de congelamento as células foram lavadas com o meio DMEM e posteriormente congeladas em tubos criogênicos contendo uma solução composta de soro bovino fetal e DMSO (Dimetil-sulfóxido) (80/20) em uma proporção final de 1:1v/v.

3.3.8.3 Determinação da viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular ou citotoxicidade dos complexos de ciclodextrinas, lipossomas, da AICIPc, ICV e ciclodextrinas foi o método de MTT que se baseia no 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 como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas. O método do MTT é simples, confiável e reprodutível (PENG et al., 2005). 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 desidrogenase mitocondrial das células viáveis atua sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazam de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa (Figura 10). Os cristais são, então, dissolvidos com uma solução de isopropanol e o produto obtido é monitorado espectrofotometricamente em 560 nm. O aumento ou diminuição no número de células viáveis resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazam formado, indicando assim o grau de citotoxicidade (PENG et al., 2005).

Figura 10: Redução do MTT para o sal de Formazam redutase mitocondrial

O método do MTT de monitoramento da citotoxicidade *in vitro* é bem estabelecido para o uso com placas de poços múltiplos. Para melhores resultados, deve ser empregadas às células na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não deve exceder 1×10^6 células/mL. Cada teste deve incluir um branco contendo meio completo sem nenhum fármaco. Inicialmente, as células foram removidas da incubadora, levadas à capela de fluxo laminar e distribuídas nas placas de poços múltiplos (96 poços). A estas células foi adicionada uma solução de MTT na concentração de 1 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 foi finalizado através de medidas espectrofotométricas da densidade óptica no comprimento de onda de 560 nm, descontando-se a densidade óptica de fundo em 690 nm (SIMIONI et al., 2006). Estas medidas foram obtidas por um sistema de leitura de microplacas (ELISA) da Molecular Device modelo Versa Max.

3.3.8.4 Estudos de Citotoxicidade

Uma suspensão de $0,5 \times 10^6$ células/mL da linhagem J774-A foi preparada a partir da resuspensão das células contidas nas garrafas de 75 cm^2 de cultura na presença de tampão Hank's para o experimento de citotoxicidade. As células foram, então, plaqueadas em placas de petri de 60 cm^2 , esperando que as mesmas atingissem confluência de aproximadamente 70% (em média 48 h após o plaqueamento) para que o tratamento com o fármaco fosse realizado. Após atingirem a confluência, as mesmas foram incubadas pelo período de três horas, em meio de cultura DMEM com 3% de soro fetal bovino com o sistema lipossomal nas concentrações desejadas na proporção final de 1:1 v/v. Após o período de incubação, as células foram lavadas com 3 mL de tampão Hank's e soltas das placas de petri com o auxílio do rodinho, sendo então transferidas para placas de poços múltiplos (96 poços) com 200 μL por poço de meio DMEM completo. Depois de 24 horas, o meio foi retirado e a citotoxicidade foi avaliada através do teste do MTT, conforme descrito anteriormente (seção 3.3.8.3).

O sistema lipossomal foi testado, sendo que as concentrações do fármaco fotossensível incorporada ao mesmo foram de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, a fim de avaliar o efeito concentração-dependente sobre a viabilidade das células J774-A, utilizadas como modelo biológico nos experimentos *in vitro*, determinando-se desta forma qual a concentração não-citotóxica no ambiente celular. O controle para este experimento foram células com as preparações de lipossomas sem a presença dos fármacos fotossensíveis.

3.3.8.5 Estudos de fototoxicidade

Para os experimentos de fototoxicidade, a cultura celular foi preparada seguindo o mesmo protocolo descrito acima para os estudos de citotoxicidade. A concentração não-citotóxica ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi a concentração utilizada para avaliação do efeito dose-dependente sobre as células. Após o período de incubação, as amostras utilizadas para o estudo de citotoxicidade foram: AICIPc/ICV livres e em

lipossomas; complexos de hidroxipropil e beta ciclodextrinas com AICIPc; complexos de hidroxipropil-beta e beta ciclodextrinas com AICIPc/ICV em lipossomas. Todas as amostras foram avaliadas com AICIPc e ICV nas concentrações de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Entretanto para o estudo de fototoxicidade as preparações foram avaliadas apenas na concentração de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, visto que esta concentração não mostrou citotoxicidade significativa. As células contendo as amostras foram tratadas com luz visível. Os lasers utilizados foi o sistema *Eagle* da Quantum Tech operando em 675 nm (Figura 11) com uma potência máxima de 1W e o laser Fotocoagulador laser FTC 1200 operando em 810 nm com potência máxima de 48 J/cm^2 (Figura 12). Foram utilizadas como controle, células tratadas com o fármaco fotossensível na concentração não-citotóxica, na ausência de irradiação.

Figura 11: Sistema laser *Eagle* com $\lambda = 650 \text{ nm}$ utilizado nos experimentos de fototoxicidade.

A Figura 12 mostra o sistema laser utilizado para fotocoagulação, responsável por excitar a ICV em 805 nm.

Figura 12: Sistema Fotocoagulador laser FTC 1200 com $\lambda = 810$ nm utilizado nos experimentos de fototoxicidade.

4. Resultados e Discussão

A complexação de fármacos com ciclodextrinas promove alterações em suas propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, além de farmacocinética e biodisponibilidade. Outras características são dependentes do derivado de ciclodextrinas e do tipo de fármaco. No caso particular de fármacos fotossensíveis, as alterações geralmente observadas são em suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas (GUO et al., 2005).

4.1. Estudo e caracterização do complexo de AICIPc com ciclodextrinas

4.1.1 Avaliação do comportamento espectroscópico da interação AICIPc/CD na mistura de solventes etanol/PBS.

Neste estudo foram avaliados os comportamentos espectroscópicos da AICIPc, na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na presença de beta e hidroxipropil-beta ciclodextrinas na concentração de $3,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. As medidas foram feitas em solução Etanol/PBS (fosfato pH 7,4). As três relações etanol/tampão determinadas por um *screening* das variações na relação entre os volumes dos solventes, de 1,5 mL : 0,5 mL; 1,4 mL : 0,6 mL; 1,3 mL : 0,7 mL, foram escolhidas devido a uma melhor visualização da formação do complexo nos dois tipos de ciclodextrinas utilizados com o fármaco AICIPc e a influência do tipo de solvente no fenômeno de complexação.

O fenômeno de agregação é influenciado pela polaridade do solvente em que se encontra o fármaco fotossensível. Esta agregação se torna mais pronunciada, à medida que se aumenta a polaridade do solvente e a concentração do fármaco, pois os fenômenos de agregação estão diretamente ligados a estes fatores. De fato, está bem estabelecido na literatura que a agregação destas substâncias é importante

gerador de supressão de fluorescência, além de influenciar diretamente na sua ação na TFD (CASTANO, et al., 2004).

Quando interagindo com ciclodextrinas, os fármacos fotossensíveis tendem a reduzir o perfil de agregação provocado pelo aprisionamento da substância na cavidade das ciclodextrinas impedindo a interação entre as suas moléculas (GUO et al., 2008; IDOWU e NYOKONG, 2007). No entanto esta complexação sofre menos influência caso o grau de incorporação da ciclodextrina seja maior em relação ao grau de agregação. O volume interno da cavidade das ciclodextrinas, volume e disposição do fármaco encapsulado e disponibilidade de volume livre na cavidade da ciclodextrinas influenciam nesta interação fármaco ciclodextrinas

Após agitação por 24 horas, as soluções com relações molares preestabelecidas, foram adicionadas em cubetas de quartzo e feitas leituras em espectrofotômetro para determinação da fluorescência e da absorção.

A Figura 13, demonstra o estudo da emissão de fluorescência da AICIPc, complexada com β -CD e HP- β -CD em solução etanol/tampão na relação de 1,5 mL : 0,5 mL respectivamente.

Figura 13: Espectros de emissão de fluorescência para (●) AICIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de emissão em 680 nm em etanol/tampão na relação (1,5 mL : 0,5 mL).

A Figura 14, demonstra o estudo da emissão de fluorescência da AICIPc, complexada com β -CD e HP- β -CD em solução etanol/tampão na relação de 1,4 mL : 0,6 mL respectivamente.

Figura 14: Espectros de emissão de fluorescência para (●) AICIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de emissão em 680 nm em etanol/tampão na relação (1,4 mL : 0,6 mL).

A Figura 15, demonstra o estudo da emissão de fluorescência da AICIPc, complexada com β -CD e HP- β -CD em mistura etanol/tampão na relação de 1,3 mL : 0,7 mL respectivamente.

Figura 15: Espectros de emissão de fluorescência para (●) AICIPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD com concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de emissão em 680 nm em etanol/tampão na relação (1,3 mL : 0,7 mL).

A Figura 16, demonstra o espectro de absorção da AlClPc em solução etanol/tampão nas relações 1,5 mL : 0,5 mL; 1,4 mL : 0,6 mL; 1,3 mL : 0,7 mL respectivamente.

Figura 16: Espectros de absorção para AlClPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e, com comprimento de onda de absorção em 675 nm em etanol/tampão nas relações (●) 1,5 mL : 0,5 mL; (●) 1,4 mL : 0,6 mL; (●) 1,3 mL : 0,7 mL respectivamente.

A Figura 17, demonstra o espectro de absorção da AlClPc, complexada com β -CD e HP- β -CD em mistura etanol/tampão na relação de 1,5 mL : 0,5 mL respectivamente.

Figura 17: Espectros de absorção para (●) AlClPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de absorção em 675 nm em etanol/tampão na relação (1,5 mL : 0,5 mL).

A Figura 18, demonstra o espectro de absorção da AlClPc, complexada com β -CD e HP- β -CD em solução etanol/tampão na relação de 1,4 mL : 0,6 mL respectivamente.

Figura 18: Espectros de absorção para (●) AlClPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de absorção em 675 nm em etanol/tampão na relação (1,4 mL : 0,6 mL).

A Figura 19, demonstra o espectro de absorção da AlClPc, complexada com β -CD e HP- β -CD em solução etanol/tampão na relação de 1,3 mL : 0,7 mL respectivamente.

Figura 19: Espectros de absorção para (●) AlClPc na concentração de $6,25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e complexada com (●) β -CD ou (●) HP- β -CD na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, com comprimento de onda de absorção em 675 nm em etanol/tampão na relação (1,3 mL : 0,7 mL).

Neste estudo observou-se que há uma interação entre as ciclodextrinas e a AICIPc resultando em supressão, capaz de ser visualizada através dos espectros de absorção e de fluorescência.

Os espectros de fluorescência, mostrados nas figuras 13, 14, 15, são largos e apresentam o mesmo perfil espectral, independente da mistura de solventes utilizada. Entretanto, as intensidades de emissão de fluorescência variaram, evidenciando uma dependência da interação fármaco/ciclodextrinas, na fluorescência, de acordo com a proporção de solventes. A variação da intensidade é também observada pelo tipo de ciclodextrina utilizada para a complexação.

Nas Figuras 13 a 15 vemos o efeito da incorporação de água e da AICIPc as ciclodextrinas: supressão de fluorescência mais evidente à medida que a mistura etanol/PBS aumenta. Há ainda um componente adicional relativos ao microdomínio no interior das ciclodextrinas. Esse efeito é mais evidente no caso da HP- β -CD, em virtude dos grupos disponíveis para interação no interior do cone o que, por sinal atuam favoravelmente garantindo uma maior constante de associação (Tabela 4) e, por consequência uma maior estabilidade ao complexo de inclusão.

Para HP- β -CD a supressão foi mais intensa quando comparada com a β -CD (Figuras 13 e 14), mostrando maior interação da AICIPc com a HP- β -CD. No entanto houve uma inversão nas intensidades de emissão (Figura 15), quando a relação etanol/PBS passou a ser mais favorável a β -CD. Este comportamento na Figura 15 deve-se a condições mais favoráveis de complexação para β -CD, proporcionado pelo aumento de fase aquosa (1,3 de etanol e 0,7 de tampão), ou ao maior número de agregados do fármaco fotossensível reduzindo, portanto a interação do fármaco com as ciclodextrinas, levando a perfis de complexação parecidos. Esta menor intensidade observada tanto para o fármaco livre como em presença de ciclodextrinas é também proveniente do aumento da dimerização, do fármaco, provocado pelo aumento da quantidade de tampão na mistura etanol/tampão. Contudo observa-se nos estudos espectrais que, apenas a variação da relação dos solventes (Figura 16), não foi suficiente para suprimir a densidade óptica do fármaco.

A utilização da mistura de diferentes solventes gera alterações tanto na constante dielétrica da solução, como na forma de organização das moléculas da AICIPc. Desta forma, diferentes concentrações e mistura de solventes podem aumentar ou reduzir o grau de agregação e, consequentemente, alterar a formação

do complexo devido as moléculas de fármacos agregadas possuírem dificuldade de complexar com ciclodextrinas como citado anteriormente.

Os espectros de absorção (Figuras 16-19) não sugerem a formação de agregados. É muito provável a incorporação no novo ambiente, a AICIPc deve estar submetida a interações e a um meio igual a polaridade do microambiente, que acabam por reduzir as probabilidades das transições e essa redução é significativa em duas das situações estudadas: (1,4/0,6 e 1,3/0,7). Observa-se que quando a AICIPc se encontra apenas nas misturas etanol/PBS, uma alteração ínfima pode ser observada nas características espectrais da AICIPc a medida que a proporção de tampão foi aumentando na mistura.

O menor prejuízo as características espectrais da AICIPc ocorre quando ela está complexada nas ciclodextrinas estudadas, as quais se encontram dispersas na mistura etanol/PBS na proporção 3:1. Se o solvente interfere negativamente nas características espectrais da AICIPc, significa que um dos seus componentes deve estar se distribuindo na cavidade formada. Este comportamento pode indicar que o PBS está sendo incorporado com a AICIPc o que explica o prejuízo observado. Observa também que, como não há formação de agregados pelo comportamento espectral há a incorporação da AICIPc na cavidade da molécula ciclodextrina.

4.1.2. Estudo da constante de associação AICIPc e ciclodextrinas

A complexação fármaco ciclodextrina é governada por uma constante de associação. Esta constante funciona como um índice de alteração das propriedades físico-químicas de um composto após a inclusão. O método mais usado para a detecção da formação de complexos em solução é o método da solubilidade de fases (HIGUCHI e CONNORS, 1965). A constante de associação é uma variável importante no estudo de complexos com ciclodextrinas, pois permite avaliar o grau de interação entre o fármaco e a ciclodextrina. Quanto maior for esta interação maior será a capacidade em controlar e avaliar os parâmetros como: liberação, estequiometria, solubilidade e estabilidade do complexo.

No caso dos fármacos fotossensíveis é de suma importância a avaliação da constante de associação, pois quanto maior a interação mais estável e solúvel se

encontrará as moléculas do agente presente no meio aquoso. Outro aspecto importante é a colisão entre as moléculas do FS no solvente. Esta colisão provoca uma desativação dos estados excitados S_1 reduzindo a possibilidade de cruzamento intersistema para o estado triplete excitado T_1 gerando consequente redução na atividade destas substâncias para TFD.

Estudos realizados recentemente demonstram que algumas ciclodextrinas são capazes de se complexar com a clorofila-a, utilizada como agente para TFD, melhorando a fototoxicidade em meio aquoso tornando-a promissora como fármaco fotossensível (COSMA et al., 2008). Esta interação fármaco ciclodextrinas permite uma redução no estado de agregação em meio aquoso e aumento da sua solubilização no meio celular.

A Figura 20 mostra a influência da fluorescência da AICIPc livre em função dela complexada em relação ao inverso do quadrado de concentrações crescentes de β -CD.

Figura 20: Influência da emissão de fluorescência da AICIPc livre em função dela complexada com β -CD em etanol/tampão na razão 3:1 em relação ao inverso do quadrado de concentrações crescentes de β -CD (25 mmol.L^{-1} a 300 mmol.L^{-1}) $r^2 = 0,9995$.

Observa-se uma boa linearidade no gráfico da Figura 20 (coeficiente de correlação linear $R = 0,99$) sugerindo uma estequiometria de 1:2 entre AICIPc e β -CD. A constante de associação foi calculada assumindo a existência de complexos com estequiometria de 1:2.

Este comportamento está de acordo com resultados apresentados por estudos em que se utilizam complexos de ciclodextrinas e derivados porfirínicos para melhoria das propriedades fotofísicas e de estabilidade como, rendimento quântico de oxigênio singlete, rendimento quântico de fluorescência, aumento da ação fototóxica e aumento da estabilidade destes agentes em meio aquoso por redução do grau de agregação (LENG et al., 2007).

Tabela 4. Determinação das constantes de associação dos complexos AICIPc/ β -CD e AICIPc/HP- β -CD em mistura etanol/tampão na relação 3:1

<i>Ciclodextrinas</i>	<i>K_s (mol/L)⁻²</i>
B-CD	2,8 x 10¹⁷
HP-β-CD	6,07 x 10¹⁸

Na determinação da constante de associação, Tabela 4 e consequente determinação da estequiometria, não foi possível observar linearidade para HP- β -CD, o que sugere que o perfil de interação com este derivado de ciclodextrinas não indica uma estequiometria de 1 molécula de fármaco fotossensível para 2 moléculas de HP- β -CD, quando determinado através da equação modificada de Benesi-Hildebrand.

4.2. Estudos Fotofísicos de AICIPc com ciclodextrinas

4.2.1 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete, da AICIPc com ciclodextrinas

No mecanismo do tipo II, há uma transferência de energia do estado triplete do fármaco para o oxigênio molecular transformando-o em $^1\text{O}_2$. Está estabelecido que este oxigênio singlete juntamente com espécies reativas de oxigênio são capazes de produzir morte do tecido tumoral (CASTANO et al., 2004; BONNETT, 2000).

Um das formas de avaliar a eficiência fotoquímica dos fármacos fotossensíveis é através da quantificação do oxigênio singlete produzido.

A determinação do rendimento quântico de geração de oxigênio singlete produzido, permite avaliar de forma mais direta a capacidade que o fármaco possui em gerar EROS (PRIMO, 2008).

O tempo de vida do oxigênio singlete em solução varia de acordo com o tipo de solvente, sendo maior em solventes deuterados do que nos respectivos solventes protonados. Este comportamento se deve pela pequena diferença de níveis vibracionais dos grupos R-H nos solventes protonados e o estado $1\Delta_g$ (x ou y) do oxigênio singlete (MACHADO, 1999).

O presente estudo foi conduzido a partir da excitação de um fármaco fotossensível, através de fotólise por pulso de laser, que por transferência de energia para o oxigênio molecular (O_2) excita-o gerando oxigênio singlete (1O_2). Estes valores do tempo de vida do oxigênio singlete são medidos pela desativação destas espécies por processos radiativos de relaxação (fosforescência) na região de 1270 nm.

Estudos realizados por Lizumi (2008) mostraram que a presença de γ -ciclodextrinas, apenas como dispersante em solução aquosa para fulerenos, foram capazes de aumentar significativamente a produção de oxigênio singlete, sugerindo que as ciclodextrinas são capazes de estabilizar potenciais fármacos fotossensíveis em meio aquoso, garantindo uma alta taxa de população do estado excitado tripleto, uma maior taxa de transferência de energia e consequente produção do oxigênio singlete (LIZUMI et al., 2008).

A tabela a seguir, contém os valores obtidos de rendimento quântico de produção de 1O_2 ($1\Delta_g$) pela AICIPc associada com β -CD e HP- β -CD, tendo como referência o composto Feoforbide-a em todos os casos o solvente utilizado foi a mistura etanol/PBS 3:1.

Tabela 5 Valores de rendimento quântico de produção do oxigênio singlete

Amostras	Φ_Δ
Feoforbide-a*	0,59
AICIPc/ β -CD	0,65
AICIPc/HP- β -CD	0,80

* Feoforbide-a: usado como padrão

Os rendimentos quânticos de produção de oxigênio singlete para os complexos de AICIPc/CD, apresentados na Tabela 5 sugerem um aumento deste valor quando comparado ao padrão (feoforbide-a). Este comportamento pode ser explicado em parte pela maior estabilidade e interação dada ao complexo formado com a hidroxipropil-ciclodextrinas e com beta-ciclodextrinas, permitindo ao fármaco se apresentar em meio microheterogêneo de forma mais estável e na forma monomérica. Entretanto No entanto os estudos mostram que o microambiente proporcionado pela HP- β -CD favorece muito mais os processos fotofísicos que tornam o cruzamento intersistemas mais viável. Muito provavelmente, esse ambiente deve alongar o tempo de vida de triplete, o que garante o aumento observado no Φ_{Δ} . Observa-se, ainda, uma considerável redução no Φ_F , o que, com base na evidência apresentada com o Φ_{Δ} e resultado do favorecimento do cruzamento entre sistemas como rota de desativação do estado S_1 .

Os valores apresentados na Tabela 5 para rendimento quântico de oxigênio singlete mostram as ciclodextrinas como potenciais complexantes, pois são capazes de aumentar o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete dos fármacos fotossensíveis para TFD.

4.2.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência da AICIPc na presença de ciclodextrinas (β -CD e HP- β -CD).

As medidas de fluorescência de um dado composto (espectro de fluorescência, em combinação com outros parâmetros fotofísicos para este composto em solução, espectro de excitação, rendimento quântico e tempo de vida de fluorescência, são importantes para o entendimento das propriedades fotoquímicas e fotofísicas das espécies no estado excitado singlete. A absorção de um fóton com energia adequada por uma molécula no estado fundamental (S_0) tende a excitar um elétron desse estado, transferindo-o para um orbital molecular virtual (desocupado), sem mudança de simetria do spin eletrônico, dando origem a um estado singlete excitado, em geral, por conversão interna, esse estado singlete da origem ao estado S_1 ponto de partida dos processos fotofísicos que podem levar

à população do estado T_1 (TURRO, 1978), foco principal deste trabalho. Para cada fóton absorvido a molécula sofre apenas um determinado processo fotofísico e a soma dos valores de rendimento quântico de todos os processos deve possuir um valor unitário. Se outro processo estiver em competição com aquele em análise, o rendimento quântico será menor que a unidade.

Os valores das densidades ópticas do padrão (ZnPc em meio orgânico), no comprimento de onda de excitação de 614 nm bem como os valores das áreas dos espectros de emissão de fluorescência corrigido, tanto para o padrão, como das soluções preparadas nos meios considerados, foram analisadas através da Equação 3 (item 3.3.3.2), determinando-se assim, o rendimento quântico de fluorescência. Para o cálculo de um rendimento quântico de fluorescência é necessário que todas as condições experimentais sejam idênticas (temperatura, densidade óptica e equipamento) entre a solução padrão e as amostras. Na Tabela 6 são apresentados os valores dos rendimentos quânticos de fluorescência da ftalocianina de zinco em etanol e AlClPc complexada com β -CD e HP- β -CD, tendo como referência o composto ftalocianina de zinco (ZnPc em etanol), em todos os casos o solvente utilizado foi a mistura etanol/PBS 3:1.

Tabela 6 Rendimento quântico de fluorescência da ZnPc em etanol e AlClPc associada com ciclodextrinas (β -CD e HP- β -CD) em mistura etanol/PBS 3:1.

Amostras	Φ_F
^a ZnPc _{ETOH}	0,28
AlClPc/ β -CD	0,38
AlClPc/HP- β -CD	0,10

a: (OLIVEIRA, D. M., 2006)

De acordo com os valores apresentados na Tabela 6, observa-se uma maior redução do rendimento quântico de fluorescência quando o fármaco se encontra associado com a hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Estes resultados sugerem que no microambiente das ciclodextrinas, favoreça menor deativação por conversão

interna do estado S_1 tornando, o processo de cruzamento intersistema mais favorável. Este comportamento é observado com menor grau com o complexo formado com a beta-ciclodextrina o que corrobora com a afirmação feita anteriormente.

No entanto, embora relativamente baixos, os valores de Φ_f estimados mostram que ambos os sistemas podem ser úteis em fotodiagnóstico

4.3 Estudo da viabilidade celular da AICIPc e ciclodextrinas

Os bons fármacos fotossensíveis para emprego em TFD devem preencher alguns critérios a mais do que os fármacos fotossensíveis comuns. Um desses critérios é apresentar baixa toxicidade no escuro, além de acumularem-se preferencialmente nos tecidos tumorais (DEROSA e CRUTCHLEY, 2002). É necessário avaliar a toxicidade dos sistemas de liberação de fármacos, pois tanto os sistemas de liberação, como os excipientes utilizados para sua preparação, podem induzir efeitos tóxicos nos organismos vivos. Outro fator importante é que a presença do fármaco pode gerar, nos sistemas vivos, efeitos tóxicos decorrentes de incompatibilidades entre os componentes da preparação (RANADE e HOLLINGER, 2004; ROGGE e TAFT, 2010).

A toxicidade das ciclodextrinas por via parenteral tem sido extensivamente estudada devido à sua capacidade de provocar hemólise em glóbulos vermelhos (MEDLICOTT et al., 1998), sendo que os derivados das ciclodextrinas apresentam o mesmo efeito. No entanto, a hemólise é variável de acordo com o derivado de ciclodextrina. Por exemplo, os derivados hidroxipropil induzem menos hemólise do que a beta-ciclodextrina, que é a molécula de partida para estes derivados (MOSHER E THOMPSON, 2000).

A via de administração intravenosa como observado anteriormente, pode ser inadequada para a administração de preparações com ciclodextrinas. Entretanto o fator concentração da ciclodextrina no estudo demonstrou ter um papel importante no tocante à redução de toxicidade.

4.3.1 Estudo de viabilidade celular, dos complexos de AICIPc, na ausência de luz para células J774-A

O estudo de citotoxicidade na ausência e presença de luz da AICIPc complexada com ciclodextrinas, teve o propósito de avaliar não só a toxicidade do FS como das ciclodextrinas quando presentes no meio celular.

Primeiramente, foi realizado o estudo de toxicidade dos complexos com ciclodextrinas (HP- β -CD e β -CD) nas concentrações de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para AICIPc e $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ para CD (meio de cultura DMEM) sobre a linhagem J-774-A, na ausência de luz. O tempo de incubação utilizado na avaliação da toxicidade celular frente às ciclodextrinas foi o de 4 horas. Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade das células J774-A estão apresentados na Figura 21 na forma de gráfico de porcentagem da viabilidade celular.

Na Figura 21 estão apresentadas as porcentagens das viabilidades celulares em meio de cultura com 1 % de SFB de AICIPc complexada as ciclodextrinas, com o propósito de avaliar a toxicidade da presença de ciclodextrinas/AICIPc no meio celular.

Figura 21: Estudo de citotoxicidade após 4 horas de incubação em células neoplásicas de macrófagos J774-A1. β -CD = AICIPc/ β -CD; Hp-CD = AICIPc/HP- β -CD, (AICIPc na concentração de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e CD de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$). Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Torna-se complexo descobrir as razões para o comportamento da citotocidade com ciclodextrinas, pois este comportamento surge da combinação de efeitos associados da habilidade intrínseca de cada CD para ser citotóxica. O fenômeno de citotocidade surge, a partir da afinidade das ciclodextrinas por lipídios da membrana e da sua concentração no meio. Quanto maior a afinidade do fármaco pela ciclodextrina menor serão estes efeitos, portanto a citotocidade dos derivados de ciclodextrinas são diretamente influenciados pela afinidade ciclodextrina/fármaco (LEROYLECHAT et al., 1994).

Na avaliação de toxicidade no escuro não se observou nenhuma toxicidade quando a AICIPc na concentração de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, se encontrava complexada com ciclodextrinas na concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Nesta concentração observa-se uma viabilidade celular de aproximadamente 111% para o fármaco livre e de aproximadamente 114% $p < 0,01$ para β -CD e 109,5% $p < 0,05$ para HP- β -CD (Figura 21).

Alguns fármacos, excipientes e os próprios sistemas de liberação podem afetar a curva de crescimento das células in vitro. Por outro lado quando a técnica de avaliação da viabilidade é a de MTT, os macrófagos são capazes de reduzir o MTT por duas vias o que daria uma viabilidade maior do que o controle, ou seja, um falso resultado.

4.3.2 Estudo de viabilidade celular, dos complexos de AICIPc, na presença de luz para células J774-A

No estudo de fototoxicidade foi avaliado a toxicidade dos complexos de AICIPc/ β -CD e AICIPc/HP- β -CD ($3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de FS e $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de CD), frente a várias doses de irradiação nas células (70 mJ.cm^{-2} 140 mJ.cm^{-2} e 700 mJ.cm^{-2}) em sistema laser Eagle da Quantum Tech, operando em 675 nm. O controle foi realizado com os complexos na ausência de luz e os resultados foram apresentados na forma de gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função da dose de luz laser, (Figuras 22 e 23). Os resultados de viabilidade celular foram obtidos após as células sofrerem irradiação com um ou ambos os sistemas lasers.

Na Figura 22 Analisamos a seguir, a fototoxicidade para a AICIPc/ β -CD (AICIPc na concentração de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e CD de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), variando-se as concentrações de luz (70 mJ.cm^{-2} 140 mJ.cm^{-2} e 700 mJ.cm^{-2}), mantendo constante as concentrações do complexo AICIPc/ β -CD. Estes estudos foram realizados como descrito na sessão 3.3.8.2.

Figura 22 Efeito da aplicação de laser na viabilidade celular em células neoplásicas de macrófagos J774-A1, após 4 horas de incubação do complexo AICIPc/ β -CD e CT = células encubadas com a β -CD sem fármaco e irradiadas com 70 mJ.cm^{-2} . As células foram expostas ao aumento da dose de luz 70 , 140 e 700 mJ.cm^{-2} . Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey t -teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Na Figura 23 Analisamos a seguir, a fototoxicidade para a AICIPc/HP- β -CD /AICIPc na concentração de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e CD de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), variando-se as concentrações de luz (70 mJ.cm^{-2} 140 mJ.cm^{-2} e 700 mJ.cm^{-2}), mantendo constante as concentrações do complexo AICIPc/HP- β -CD. Estes estudos foram realizados como descrito na sessão 3.3.8.2.

Figura 23: Efeito da aplicação de laser na viabilidade celular em células neoplásicas de macrófagos J774-A1, após 4 horas de incubação do complexo AICIPc/HP- β -CD e CT = células encubadas com a β -CD sem fármaco e irradiadas com 70 mJ.cm⁻². As células foram expostas ao aumento da dose de luz 70, 140 e 700 mJ.cm⁻². Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

O ensaio de fototocidade foi conduzido com AICIPc complexada com ciclodextrinas na concentração de 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, concentração estudada na observação da toxicidade na presença de luz com as preparações de lipossomas.

As células tratadas com as formulações demonstraram perda de viabilidade celular proporcional para o aumento de dose de luz (figuras 22 e 23). No caso da AICIPc complexada com β -CD na dose de luz de 70 mJ.cm⁻² as porcentagens de sobrevivência de células foram de 74%. Aumentando a dose a 140 mJ.cm⁻², mostrou 17% de viabilidade celular e 5% de viabilidade celular aproximadamente a 700 mJ.cm⁻² de dose luminosa. No caso da HP- β -CD para 70 mJ.cm⁻² a percentagem foi 45.71%; para 140 mJ.cm⁻² 9.9% e para 700 mJ.cm⁻² 2.5% com $p < 0,05$. O complexo fármaco/ciclodextrinas apresentou fototoxicidade a 70 mJ.cm⁻², 140 mJ.cm⁻² e 700 mJ.cm⁻². À medida que se aumentou a dose de luz houve uma redução na viabilidade celular, bem como variações desta viabilidade quando a AICIPc estava complexada com diferentes ciclodextrinas, demonstrando maior eficiência para o complexo AICIPc/HP- β -CD. No presente trabalho o efeito fototóxico máximo obtido foi com 700 mJ.cm⁻² de luz. Estes resultados permitem observar um alto nível de toxicidade da AICIPc quando complexada com ciclodextrinas na presença de luz.

4.4. Estudos Fotofísicos, de AICIPc em Lipossomas

4.4.1 Estudos espectroscópicos no estado estacionário da ICV e da ALCLPC em PBSpH = 7,4 incorporado em lipossomas

Uma característica importante do corante utilizado como fármaco fotossensível na TFD é que ele deve absorver preferencialmente na “janela terapêutica”, localizada entre 600 e 800 nm. Esta região corresponde à região onde a luz apresenta maior penetração nos tecidos (CASTANO et al., 2004).

Para um fármaco fotossensível desempenhar a sua função não basta possuir boas propriedades fotofísicas, mas interagir de forma adequada com os sistemas biológicos. Os agentes utilizados atualmente apresentam certa afinidade por regiões com atividades bioquímicas alteradas e em regiões com altas concentrações de células de defesa. Esta localização nos tecidos biológicos, do fármaco fotossensível é primordial para uma efetividade na terapia. Entretanto a maioria destes agentes apresenta baixa solubilidade nos fluídos orgânicos (compostos na sua maior parte por água), dificultando sua distribuição no sangue e nos tecidos. A veiculação em sistemas de liberação como, lipossomas, nanoemulsões e nanocápsulas, que possam carrear estas substâncias para o local de ação garante uma maior efetividade e seletividade ao órgão alvo.

Neste trabalho, além da ação fotoquímica gerada pela presença da AICIPc, foi estudada a ação da ICV, através da hipertermia gerada após irradiação por laser térmico no comprimento de onda de 805 nm, incorporada nos lipossomas junto com os complexos de AICIPc. A ICV é um fármaco usado como contraste em exames de coração e recentemente foi descoberto como promissor na terapia fotodinâmica (CARDILLO et al., 2008).

A utilização combinada de dois fármacos teve o propósito de promover um aumento no efeito terapêutico na terapia fotodinâmica. A potencialização foi proporcionada por uma ação sinérgica, combinando a ação da ICV mediada por fototrombose e a ftalocianina através de processos fotodinâmicos como observado em vários trabalhos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (PRIMO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2006). Há estudos realizados com a ICV associada à

triancinolona propiciando sinergismo através da ação antiinflamatória mais a fototombrose (GOMES et al., 2006; AREVALO et al., 2005).

A escolha adequada do FS deve ser baseada na investigação dos parâmetros fotofísicos em solução homogênea e nos referidos sistemas microheterogêneos, que, além de melhorar a seletividade tumoral, mimetizem ao máximo os sistemas biológicos. Desta forma há possibilidade de se controlar a distribuição dos fármacos entre os tecidos tumorais e peritumorais (CASTANO et al., 2005). A emissão de fluorescência do FS é um parâmetro fundamental nas determinações de sua ação fotodinâmica, uma vez que um FS eficiente deve apresentar um tempo de vida singlete pequeno (da ordem de 100 ps a 10 ns) (PLAETZER et al., 2009), porém suficientemente longo para permitir a visualização, localização e delineação da lesão maligna.

Foram realizados estudos espectroscópicos no estado fundamental (espectroscopia de absorção na região do UV-visível e de emissão de fluorescência no estado estacionário) da AICIPc em etanol e incorporada aos lipossomas.

A capacidade de agregação, em solução, na interface sólido-líquido, é freqüentemente observada nos corantes, devido à forte atração molecular por forças de van der Waals e intermoleculares. A molécula agregada exibe uma distinta mudança em seu comportamento espectral, comparada a forma monomérica (MISHRA et al., 2000).

A Indocianina verde é atualmente estudada como contraste nas imagens de vasos do fundo de olho devido a sua capacidade de se acumular em regiões profundas dos vasos sanguíneos e de se ligar em altas concentrações às proteínas plasmáticas como albuminas, globulinas e lipoproteínas, aumentando a retenção intravascular. Outras linhas de estudo têm demonstrado a ação da ICV na oclusão coriocapilar e morte de células de carcinoma prostático (COLASANTI et al., 2004; COSTA et al., 2001).

Na Figura 24 estão apresentados os espectros de absorção da ICV em PBS e incorporados em lipossomas na concentração de $10\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 24: Espectro de absorção da ICV (10,0 μM) em PBS, pH 7.4 (—) e na presença de lipossomas (—).

Os espectros de absorção (Figuras 24 e 25) mostram bandas de grande intensidade para ICV em 780 nm e para AICIPc respectivamente na região de 675 nm, denominadas banda Q. Nota-se ausência de agregação para ambos os fármacos (AICIPc e ICV), pois não há alterações nas bandas não vibracionais entre (600 e 650 nm) ao lado da banda Q para AICIPc (IDOWU e NYOKONG, 2007), assim como para ICV na região de 600 nm (GRATZ et al., 1999). A não agregação também é observada quando os fármacos se encontram em meio lipossomal, mostrando que não há modificações significativas, quando AICIPc e ICV se encontram presentes em um mesmo sistema de liberação.

Observam-se mudanças no perfil do espectro para ICV, havendo um discreto deslocamento batocrômico da banda Q de 779 nm para 783 nm. Este pequeno deslocamento é atribuído ao ambiente microheterogêneo característico dos lipossomas, que possui uma constante dielétrica diferente do meio homogêneo alterando as propriedades fotofísicas do fármaco. A ICV manteve inalterados os seus picos de absorção (780 nm), e em (690 nm) demonstrando que não houve mudança espectral significativa, com a ICV incorporada nos lipossomas. A tendência das moléculas formarem agregados depende da alta solubilidade em água, arquitetura compacta da molécula e a concentração da substância no meio (MISHRA et al., 2000). Quando em lipossomas a ICV apresentou uma intensidade menor da banda na região de 690 nm responsável pela agregação.

Na Figura 25 estão apresentados os espectros de absorção da AICIPc em Etanol e incorporados em lipossomas na concentração de $10\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 25: Espectro de absorção normalizado da ALCLPC ($10,0\mu\text{M}$) em Etanol (–) e na presença de lipossomas (–).

O perfil do espectro de absorção para a AICIPc em lipossomas (Figura 25), leva a um deslocamento batocrômico na banda Q 675 nm para 680 nm, com um aumento do espalhamento na região abaixo de 600 nm quando incorporada ao sistema veicular típico deste FS em sistema microheterogêneo. Contudo não houve alteração na capacidade do fármaco em absorver na região do espectro onde o feixe de luz penetra nos tecidos biológicos com maior facilidade. Este fato é observado para a absorção nas bandas Q do espectro (600 a 700 nm), análogo ao descrito para outros compostos porfirínicos (CHATTERJEE e SRIVASTAVA, 2000).

Na figura 26 estão apresentados os espectros de fluorescência da ICV em PBS pH 7,4 e incorporados em lipossomas na concentração de $10\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 26: Espectro de emissão de fluorescência normalizado da ICV(10,0µM) em PBS pH 7.4(—) e na presença de lipossomas (—).

O deslocamento para a região de menor energia (de 812 nm – 830 nm) no estudo de fluorescência (Figura 26) indica uma reorganização da ICV interagindo com o meio lipossomal gerando uma importante informação, do perfil de fluorescência, para estudos posteriores quanto ao seu comportamento fotodinâmico.

Na figura 27 estão apresentados os espectros de fluorescência da AICIPc em etanol e incorporados em lipossomas na concentração de 10µM.

Figura 27: Espectro de emissão de fluorescência normalizado da AICIPc (10 µmol.L⁻¹) em etanol (—) e na presença de lipossomas (—).

A incorporação da AICIPc em lipossomas resultou em um significativo deslocamento para o vermelho na emissão máxima de fluorescência da AICIPc. Os

máximos de fluorescência passaram de 678 nm para a AICIPc em meio orgânico a 682 nm para a AICIPc em meio lipossomal (Figura 27).

Na Figura 28 estão apresentados os espectros de absorção da AICIPc e ICV em PBS pH 7,4 e incorporados em lipossomas na concentração de 10 μ M.

Figura 28: Espectro de absorção de AICIPc e ICV (10 μ mol.L⁻¹) na presença de lipossomas

A associação dos dois fármacos em um mesmo sistema de liberação mostra influência da AICIPc no comportamento espectral da ICV observado na Figura 28, deslocando o espectro de absorção da banda Q da ICV para a região do infravermelho em 805nm. Este comportamento é favorável, pois os laser térmico utilizado excita a ICV na região do infravermelho em 805 nm.

Quando a ICV é veiculada no lipossoma junto com a AICIPc, (Figura 28), não há deslocamento batocrômico da banda Q, para AICIPc permanecendo dentro da região da janela terapêutica. Este comportamento é importante na ação para este agente já que sua excitação será realizada por laser na região de comprimento de onda de 675 nm.

De acordo com os comportamentos espectrais observados a associação de AICIPc e ICV em lipossomas sofreram modificações favoráveis a terapia fotodinâmica, deslocando as bandas Q para regiões mais adequadas para excitação, no entanto em regiões que não fogem da faixa da janela terapêutica.

De acordo com o estudo o deslocamento para região do vermelho sugere alguma interação das moléculas da ICV com as da AICIPc fazendo com que esta última absorva um pouco desta energia e provoque uma menor absorção por parte da ICV e conseqüentemente um deslocamento da sua banda Q para uma região de maior comprimento de onda.

A veiculação de fármacos que agem de forma sinérgica demonstra que dependendo de suas propriedades físico-químicas, há certa competição dos fármacos pelo compartimento lipossomal. Além da competição entre os fármacos a técnica de preparação, os excipientes que formam a preparação também influenciam na concentração final presente no sistema de liberação. Os fármacos aqui estudados possuem propriedades de solubilidade diferentes, a ICV possui característica hidrofílica e a AICIPc possui característica lipofílica. A disposição sugerida para estes fármacos, quando nos lipossoma, é a ICV localizada mais no compartimento aquoso e a AICIPc na bicamada lipídica não havendo competição direta pela localização nos lipossomas.

A presença do colesterol na preparação funciona como um agente que enrijece a estrutura da bicamada lipídica do lipossoma. Esta característica proporcionada pelo colesterol favorece uma maior estabilidade para o lipossoma, no entanto reduz a flexibilidade da bicamada, que pode dificultar a incorporação de fármacos com características lipofílicas, que é o caso da AICIPc. Este comportamento provocado pelo colesterol pode ter reduzido a eficiência de encapsulação dos lipossomas para AICIPc na bicamada de fosfolipídios. No entanto quando estudado a eficiência de encapsulação neste trabalho observa-se uma concentração alta de fármaco presente nos lipossomas.

4.4.2 Medidas de fluorescência resolvida no tempo para a ICV e AICIPc em tampão e meio lipossomal

Uma característica importante para um fármaco fotossensível é o tempo de vida do estado excitado.singlete (τ_s). O tempo de vida de fluorescência de um fármaco fotossensível representa o tempo médio que esta molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. O estudo do

comportamento do estado excitado singlete quanto ao seu tempo de vida e sua distribuição nos fluidos biológicos, só são possíveis pela determinação das taxas de decaimento do estado excitado singlete em função do tempo, através do monitoramento das curvas de decaimento de fluorescência.

A informação de uma varredura do estado estacionário (um espectro de intensidade de fluorescência versus comprimento de onda) corresponde a uma média do comportamento da molécula durante toda a varredura. O fenômeno de fluorescência, entretanto, ocorre em uma escala de tempo de nanosegundos. Caso seja feito um estudo deste fenômeno, neste intervalo de tempo, é possível interpretar os mecanismos que conduzem aos processos químicos e bioquímicos referentes à molécula. Estas informações estão contidas no espectro de emissão resolvido no tempo e são reveladas na escala de tempo, da fluorescência, 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 técnica de contagem simples de fótons foi utilizada para se determinar os tempos de vida de fluorescência da AICIPc em etanol, complexada ou não com HP- β -CD e incorporada em lipossomas junto com ICV. Os experimentos foram realizados nas concentrações fixas de 6,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a AICIPc e de 6,25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para a ICV em lipossomas, à temperatura de 25 °C.

O tempo de vida do estado excitado é derivado das curvas de decaimento que mostram os decaimentos de fluorescência ajustados, bem como os desvios e resíduos médios. Nas curvas de decaimento de fluorescência, a intensidade de luz decresce com o tempo após a remoção da luz de excitação. Para a AICIPc complexada ou não com ciclodextrinas e ICV incorporados nos lipossomas, foram obtidas as curvas de decaimento apresentadas nas Figuras de 29 a 32. O comprimento de onda de excitação utilizado para a AICIPc nos meios estudados foi de 355 nm, enquanto a emissão de fluorescência foi monitorada a 680 nm para ICV. Para cada medida de decaimento foram coletadas em média 4000 contagens.

As Figuras 29 a 32 demonstram os decaimentos de fluorescência do estado excitado singlete

Figura 29: Curva de decaimento e ajuste exponencial para o fármaco fotossensível clássico AICIPc em etanol.

Figura 30: Curva de decaimento e ajuste exponencial para a ICV em lipossoma.

Figura 31: Curva de decaimento e ajuste exponencial para a ICV/AICIPc em lipossoma.

Figura 32: Curva de decaimento e ajuste exponencial para a ICV/AICIPc/HP- β -CD em lipossoma.

Tabela 7. Tempos de vida de fluorescência (τ_s), Amplitude relativa (A) para a AICIPc em etanol e com ICV incorporados aos lipossomas na ausência e na presença de ciclodextrinas.

Amostra	τ_1 (ns)	A_1 (%)	τ_2 (ns)	A_2 (%)	τ_3 (ns)	A_3 (%)
AICIPc em etanol	8,7	100	-	-		
ICV em lipossoma	8,6	96,6				
ICV/AICIPc em lipossoma	6,4	27,2	6,6	73,8		
ICVAICIPc/ HP- β -CD em lipossoma	6,7	82,7	0,1	2,6	1,9	14,7

O tempo de vida do estado excitado singlete é derivado das curvas de decaimento exemplificadas nas Figuras 29 a 32. Este estudo mostra os decaimentos de fluorescência ajustados para os fármacos AICIPc em etanol, ICV em lipossomas, ICVe AICIPc/HP- β -CD em lipossomas.

Analisando o comportamento da AICIPc em meio orgânico (8,7 ns) e ICV em lipossoma (8,6 ns), percebe-se um comportamento monoexponencial, caracterizado por apenas um tempo de vida como mostra a Tabela 7. Os decaimentos cinéticos de fluorescência dos fotossensibilizadores AICIPc e ICV,

neste caso, não diferem de uma cinética tipicamente monoexponencial observada para esses fotossensibilizadores em meio homogêneo.

Não foi possível detectar tempos de vida para ICV em tampão e etanol no comprimento de onda de excitação estudado (355 nm). Entretanto houve emissão ICV quando incorporada em lipossomas em torno de 685 nm como apresentado na Figura 30 e a Tabela 7 com tempo de vida de 8,6 ns.

No caso do complexo de AICIPc/HP- β -CD na presença de ICV e lipossomas apresentou ajuste triexponencial (6,77 ns, 0,1 ns e 1,93 ns). Este comportamento pode ser proporcionado por três regiões distintas com propriedades físico-químicas diferentes. Os dados de decaimento de fluorescência obtidos para estes sistemas, como vesículas, micelas, etc, invariavelmente requerem ajustes bi ou tri-exponenciais por criarem ambientes diferentes ao agente em meio homogêneo (PRIMO, F. L., 2009; WAGNER et al., 1987). No sistemas de liberação os quais são classificados os sistemas mistos com mais de um dispositivo de liberação pode haver mais de duas regiões com propriedades físico-químicas diferentes capazes de gerar este comportamento.

Para a AICIPc complexada ou não a ciclodextrinas, houve uma redução dos tempos de vida na preparação lipossomal (Tabela 7). Este comportamento permite afirmar que a AICIPc se encontra em um ambiente mais polar, próximo as extremidades das cabeças polares dos fosfolipídios, ao interagir com o lipossoma. Outro aspecto importante é que a presença de ICV em sistema lipossomal com a AICIPc não impede a redução tempo de vida da AICIPc complexada ou não com ciclodextrinas.

O aparecimento de dois tempos de vida para ICV/AICIPc e lipossomas (6,43 ns e 6,6 ns) está relacionado a heterogeneidade do sistema lipossomal. Os lipossomas são sistemas de liberação que são capazes de veicular fármacos com propriedades físicoquímicas diferentes, pois estes sistemas apresentam regiões hidrofílicas (compartimento aquoso) e regiões lipofílicas (bi camada de fosfolipídios), podendo ainda o fármaco interagir com a sua superfície se comportando como um composto anfifílico. Assim, o comportamento observado indica uma distribuição das moléculas dos agente fotossensibilizador AICIPc e do fármaco ICV. As moléculas destes compostos estão provavelmente distribuídas em áreas com diferentes propriedades físico-químicas em um equilíbrio dinâmico.

Apesar das variações observadas nos tempos de vida de ambos os fármacos provocado pela heterogeneidade do sistema, estas mudanças não foram tão significativas não sendo observadas nos decaimentos representados pelas figuras 29 a 32. As populações observadas em menor quantidade indicam um possível espalhamento provocado pelos lipossomas preparados em alta concentração de fosfolípidios.

Nota-se na Tabela acima que todas as formulações contendo a AICIPc em lipossomas demonstraram uma diminuição leve no tempo de vida do transiente quando comparado a AICIPc em meio orgânico. Entretanto esta diminuição não apresenta tanta influência na capacidade dos fármacos em gerar a ação fotoquímica.

4.4.3 Determinação do tempo de vida do estado excitado triplete da AICIPc e associação AICIPc e ICV em lipossomas.

As espécies excitadas triplete atuam e são importantes nos processos fotofísicos dos fármacos fotossensíveis utilizados na terapia fotodinâmica. O estudo das espécies excitadas triplete é fundamental para compreender e ao mesmo tempo comprovar estes processos acima citados. Sabe-se que os mecanismos de fotossensibilização estão diretamente relacionados com a formação destas espécies excitadas. Conforme mostra o diagrama de Perrin e Jablonski (Figura 1), tem-se que a formação das espécies reativas que induzem os danos foto-oxidativos a partir das EROS depende diretamente das transições energéticas entre o FS no estado excitado triplete e o substrato celular (Tipo I) e/ou oxigênio molecular (Tipo II).

Utilizando-se a técnica de fotólise por pulso de laser pode-se induzir a formação de espécies triplete obtidas a partir da absorção de energia necessária para se atingir o cruzamento intersistema. Os transientes formados foram investigados determinando-se uma cinética de decaimento que permite calcular o tempo de vida para estas espécies excitadas.

Os valores dos tempos de vida para as amostras de AICIPc em meio orgânico na presença e na ausência de ICV e incorporado em lipossomas complexado ou não com HP- β -CD, estão ilustrados na Tabela 8.

Tabela 8 Tempos de vida da espécie transiente triplete (τ_T) e amplitude relativa (A) para o fármaco fotossensível AICIPc mais o fármaco ICV em cada ambiente químico estudado com leitura em 480 nm e excitação em 355 nm.

Amostra	τ_{T1} (μs)	A₁ (%)
AICIPc+ICV/Lip	—	—
AICIPc/HP- β -CD+ICV/Lip	0,31	73%
AICIPc+ICV/EtOH	0,32	83%
AICIPc/EtOH	0,45	100%

De acordo com os dados da Tabela 8, temos um ajuste mono exponencial para AICIPc livre e na presença da ICV em meio orgânico (etanol) com tempos de vida para a espécie triplete (τ_T) de 0,45 μs e 0,32 μs respectivamente.

A incorporação da AICIPc/ICV em lipossomas, mesmo na presença de HP- β -CD provocou uma diminuição no valor do tempo de vida triplete, quando comparado com o meio orgânico. Estudos demonstram que fármacos fotossensíveis incorporados em lipossomas com colesterol em sua estrutura provocam um aumento no tempo de vida do estado excitado triplete, por aumento da interiorização do fármaco fotossensível pela presença do colesterol (HUNGERFORD et al., 2006). No entanto a presença da ICV atua de forma negativa sobre os processos de cruzamento intersistema, desativando o estado excitado singlete por processos radiativos, impedindo que haja, por cruzamento intersistema, transição para o estado excitado triplete, provocando assim esta diminuição no valor do tempo de vida triplete. Pode-se observar que a complexação da AICIPc com Hp- β -CD não provocou uma diminuição na influência da ICV no valor do tempo de vida triplete de 0,32 μs para 0,31 μs . Esta diminuição no tempo de vida do estado excitado triplete da AICIPc incorporada aos lipossomas, está relacionada a vários fatores que determinam a velocidade total de desativação do estado excitado triplete como: (1) solvente (2) concentração no estado fundamental, (3) meio utilizado e (4) concentração do estado excitado triplete. Em meio orgânico a presença d e ICV provocou alterações significativas nos valores do tempo de vida triplete da AICIPc, quando comparada em etanol sem a presença da ICV. Este comportamento corrobora com a influência de forma negativa da ICV no tempo de vida triplete.

Embora o valor encontrado do tempo de vida triplete para a AICIPc lipossomal na presença da ICV tenha sido menor, mostrou-se ser suficiente para que os estados tripletes excitados produzidos reajam com o oxigênio molecular presente no meio, produzindo oxigênio singlete ou outras espécies reativas de oxigênio.

4.5 Determinação da constante de ligação (Kb) e do número de sítios de ligação da ICVe AICIPc

Quando os fármacos estão disponíveis na corrente sanguínea podem se ligar as proteínas presentes no plasma. O grau de ligação a estas proteínas está relacionado ao comportamento de hidrofília/lipofília do fármaco. No caso dos FS estas ligações podem alterar as propriedades fotofísicas e de biodisponibilidade do fármaco impedindo a eficiência dos compostos como fármacos fotossensíveis, mudando o perfil de ligação às células.

As soroalbuminas e as lipoproteínas são duas das proteínas mais abundantes no sangue. Quando administrados intravenosamente, a maioria dos fármacos rapidamente se associa a várias proteínas do plasma e soro albuminas (HSA, BSA).

Entender as interações de fármaco-proteína é um fator crucial no desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos, pois a maioria deles possui alta afinidade química por estas proteínas, sendo assim transportados como uma estrutura complexa. A natureza e magnitude de interação de fármaco-proteína apresentam influências significativas na atividade biológica do tecido alvo. Uma vez que este tipo de interação promove alterações quanto à presença dos fármacos no local de ação, tempo de permanência no organismo e eliminação, dependendo da quantidade e afinidade dos fármacos por estas proteínas.

A maioria dos FS possui boa ligação com as proteínas plasmáticas quando administrados por via intravenosa. Compostos levemente hidrofílicos se ligam primeiramente as albuminas e possivelmente as globulinas como os derivados tri e tetra-sulfonatados de tetrafenilporfirina (TPPS₃ e TPPS₄) e ftalocianina de cloro-alumínio (AICIPcS₃ e AICIPcS₄) (HAMBLIM E NEWMAN, 1994); anfifílicos e compostos assimétricos que se ligam na parte externa de lipoproteínas e em camadas de apoproteínas de partículas lipoproteínas como as disulfonatadas

(TPPS_{2a} e AlClPcS_{2a}), monoácidos de derivados de benzoporfirinas texafirina lutetium e monoaspartil clorina se particionam entre albumina e lipoproteína de alta densidade (HDL) (CASTANO et al., 2005); compostos hidrofóbicos os quais requerem solubilização em veículos como os lipossomas Cremofor EL ou tween 80, se localizam no núcleo no interior de lipídios particularmente de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), mas também HDL e proteína de baixíssima densidade (VLDL), possuindo a habilidade de serem retidos e se acumular nos tecidos tumorais (CASTANO et al., 2005).

Foram feitas associações de AlClPc com ciclodextrinas e lipossomas com o propósito de avaliar o comportamento deste agente em sistemas mistos. As amostras analisadas foram: (1) ICV em PBSpH 7,4, (2) ICV complexada com ciclodextrinas, (3) ICV incorporada em lipossomas, (4) AlClPc complexada com ciclodextrinas, (5) AlClPc e ICV incorporadas em lipossomas, (6) AlClPc/ciclodextrinas e ICV em lipossomas.

A ligação dos fármacos e dos lipossomas a soro albumina foi investigada utilizando-se a técnica fluorimétrica, onde a fluorescência intrínseca do resíduo de triptofano da soro albumina bovina é suprimida pela ligação dos lipossomas a sítios específicos (OLIVEIRA, D. M., 2006).

Esta técnica provém uma estratégia para investigar a interação entre os fármacos e os lipossomas e a BSA, determinando assim a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n).

A proteína BSA em concentração constante (1mg/mL) foi titulada com pequenas alíquotas das diferentes amostras de fármacos incorporados ou não nos lipossomas utilizados, onde a cada titulação, a fluorescência da BSA foi registrada. A fluorescência da BSA foi excitada em 290 nm e registrada de 300 a 500 nm. As mudanças causadas por diferentes concentrações das diferentes amostras de fármaco ou do sistema de liberação na intensidade de emissão de fluorescência na BSA são mostradas nas Figuras de 33 a 38

A análise dos dados de fluorescência foi realizada usando os métodos de Lehrer, Fasman (1966) e de Chipman e colaboradores (1967). De acordo com estes métodos a intensidade da emissão de fluorescência do resíduo de triptofano (F) com o aumento da concentração de FS é dada pela seguinte equação:

$$F_0 - F / F - F_\infty = ([FS] / K_b)^n$$

Equação 4

Figura 33: Estudo de supressão de fluorescência da BSA (1mg/mL) pela ICV na faixa de 300 a 500 nm. Concentração da ICV (mol.L^{-1}) aumenta do topo para a base: $0,5 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $1,5 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $2,5 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $3,5 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $4,5 \times 10^{-6}$.

Figura 34: Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela ICV associada com HP- β -CD na faixa de 300 a 500 nm. Concentração da ICV (mol.L^{-1}) aumenta do topo para a base: $0,5 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $1,5 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $2,5 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $3,5 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $4,5 \times 10^{-6}$.

Figura 35: Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela ICV incorporada em lipossomas na faixa de 300 a 500 nm. Concentração da ICV (mol.L^{-1}) aumenta do topo para a base: $0,5 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $1,5 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $2,5 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $3,5 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $4,5 \times 10^{-6}$.

Figura 36: Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela AICIPc associada com HP- β -CD na faixa de 300 a 500 nm. Concentração da AICIPc (mol.L^{-1}) aumenta do topo para a base: $1,0 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $6,0 \times 10^{-6}$; $7,0 \times 10^{-6}$; $8,0 \times 10^{-6}$.

Figura 37 : Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela AICIPc e ICV incorporada em lipossomas na faixa de 300 a 500 nm. Com as concentrações para ambos os fármacos aumenta do topo para a base: $1,0 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $6,0 \times 10^{-6}$; $7,0 \times 10^{-6}$; $8,0 \times 10^{-6}$.

Figura 38: Estudo da supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) pela ICV e AICIPc/ciclodextrinas incorporados em lipossomas na faixa de 300 a 500 nm. Com as concentrações para ambos os fármacos aumenta do topo para a base: $1,0 \times 10^{-6}$; $2,0 \times 10^{-6}$; $3,0 \times 10^{-6}$; $4,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $6,0 \times 10^{-6}$; $7,0 \times 10^{-6}$; $8,0 \times 10^{-6}$.

Figura 39: Gráfico de duplo logaritmo de supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) por ICV tendo como valor de K_b $4,67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ com $r^2 = 0,995$

Figura 40: Gráfico de duplo logaritmo de supressão da fluorescência da BSA (1mg/mL) por ICV/HP-B-CD tendo como valor de K_b $1,07 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ com $r^2 = 0,998$

Devido à baixa solubilidade da AICIPc em meio aquoso e a obrigatoriedade deste estudo mimetizar os fluidos biológicos (fluidos aquosos), a ligação da ICV e AICIPc a soro albumina foi parcialmente investigada, não sendo possível comparar a AICIPc livre com os sistemas de liberação.

A BSA possui séries análogas às albuminas séricas humanas. No entanto possui dois sítios de triptofano. Este segundo resíduo permanece escondido em sua estrutura terciária, não influenciando nos sítios de ligação.

A constante de ligação K_b foi obtida através do gráfico de $\log[(F_0 - F)/(F - F_\infty)]$ versus $\log [\text{amostra}]$, onde F_0 e F_∞ são a intensidade de fluorescência da BSA sozinha e da BSA saturada com a amostra, respectivamente. A inclinação do gráfico de duplo logaritmo obtido dos dados experimentais é equivalente ao número de sítios de ligação (n), ao passo que a interseção é igual ao logaritmo da constante de dissociação (K_{diss}). O recíproco da K_{diss} é a constante de ligação K_b .

Tabela 9 Constante de ligação (K_b) e número de sítios de ligação (n) de diferentes

Amostra	$K_b (10^6 \text{ M}^{-1})$	N
ICV	4,67	0,84
ICV/HP- β -CD	1,07	1,00

De acordo com o observado, nas Figuras 33 a 40 e os valores da Tabela 9, percebe-se que a ciclodextrina (HP- β -CD) reduziu levemente a interação da BSA com a ICV quando comparado ao fármaco livre, pois os valores observados são da mesma ordem de grandeza, no entanto a estequiometria de ligação do complexo é maior do que a encontrada para o fármaco livre ($n = 1$ e $n = 0,84$). Estes resultados indicam que a ICV quando complexada a HP- β -CD possui uma maior sítio especificidade a BSA do que a ICV livre. Entretanto este aumento no número dos sítios de ligação está relacionado à capacidade que as moléculas de ciclodextrinas possuem de se ligar a ICV reduzindo o nível de dimerização, mantendo suas moléculas na forma monomérica e conseqüentemente mais disponíveis para interagir com os sítios de ligação de triptofano da BSA.

O estudo com a AICIPc com ciclodextrinas (Figura 37) não apresentou supressão da fluorescência para BSA, entretanto, o fator limitante para este estudo foi à baixa solubilidade da AICIPc em meio aquoso.

No caso dos lipossomas, todas as preparações não demonstraram alguma supressão da fluorescência da BSA. Estes resultados, apesar de parciais demonstram que os lipossomas inibem a ligação dos fármacos e do próprio sistema de liberação a BSA favorecendo uma maior distribuição do sistema pelo organismo e maior chance de atingir o local de ação mais rápido e facilmente. Esta característica permite que os lipossomas sejam considerados excelentes sistemas de liberação por via intravenosa.

Dependendo da característica da incorporação dos fármacos nos lipossomas, cavidade aquosa, bicamada lipídica, ou adsorvidos em sua superfície, suas propriedades incluindo a de ligação as proteínas plasmáticas podem ser alteradas, devido à barreira de proteção que determinados sistemas de liberação com característica de reservatório possui. No caso dos lipossomas para ambos os fármacos, ICV e AICIPc observa-se esta blindagem, quando ambos os fármacos, estando ou não complexados as ciclodextrinas estão incorporados nos lipossomas. Este comportamento observado permite afirmar que os lipossomas favorecem uma maior possibilidade dos fármacos atingirem o órgão alvo em maior concentração devido à redução da ligação com proteínas do sangue.

4.6 Estudo do tamanho de Vesícula da ICVe AICIPc em lipossomas.

Estudos têm se voltado para a utilização de nanosistemas complexos ciclodextrinas incorporadas em lipossomas com o intuito de melhorar as propriedades dos fármacos, para um melhor efeito terapêutico, prolongamento da ação e estabilidade da preparação (LIM et al., 2008). Com este propósito, foi avaliado a combinação de ciclodextrinas e lipossomas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) obtendo um sistema mais estável para indometacina (PUSKAS e CSEMPESZ, 2007), mostrando que a associação de ciclodextrinas e lipossomas promovem um sinergismo em relação à estabilidade do sistema.

As ciclodextrinas possuem a capacidade de melhorar a solubilidade em água de fármacos lipofílicos, permitindo melhor dispersão na fase aquosa (JOGUPARTHI e ANDERSON, 2008). Outro aspecto importante da complexação com ciclodextrinas é a capacidade de reduzir a sua agregação quando em meio aquoso, mantendo suas moléculas dispersas na forma monomérica (GUO et al., 2005). Este comportamento também favorece uma maior flexibilidade de localização da AICIPc nos lipossomas, reduzindo desta forma sua concentração na bicamada e aumentando na fase aquosa, o que favorece uma maior organização dos fosfolípidios na bicamada por conter menor quantidade de fármaco.

Quando incorporados em lipossomas fármacos utilizados na terapia fotodinâmica tem um aumento da eficácia dos mesmos bem como melhora nas

propriedades fotofísicas e fotoquímicas (absorção na região da janela terapêutica, menor dimerização, maior rendimento quântico triplete e de oxigênio singleto) do fármaco relacionado à atividade na TFD. Estudos mostraram que a 2,3-diidro-5,15-di(3,5-diidroxifenil) porfirina quando encapsulada em lipossomas proporcionou um aumento na estabilidade devido à redução do grau de agregação, da interação com os tecidos biológicos e células tumorais e foi capaz de aumentar a atividade fotodinâmica (BOURRE et al., 2003).

Fármacos anfifílicos apresentam capacidade de interagir tanto com a região da cavidade aquosa como a região da bicamada lipídica dos lipossomas permitindo assim uma grande capacidade de acomodação dos fármacos independente da sua liofilia.

Antes da utilização dos lipossomas como sistemas de liberação é importante a utilização de métodos que avaliem aspectos como preparação, tamanho das vesículas, composição, estabilidade e taxa de encapsulação de fármacos, pois estes influenciam diretamente no comportamento dos lipossomas em meio biológico (LASIC, 1998). Uma variedade de técnicas, incluindo espalhamento de luz e microscopia eletrônica pode ser usada para tamanho de vesículas (SZOKA e PAPAHA DJOPOULOS, 1980). Um método bem adequado de se monitorar a estabilidade física dos lipossomas é através da técnica de espalhamento dinâmico de luz, a qual é suficientemente capaz de detectar mudanças no tamanho do lipossoma que possam prejudicar sua estabilidade.

As técnicas de preparação, a composição, tipo, propriedades físico-químicas e quantidade de fármacos e excipientes incorporados, todos estes aspectos podem afetar o tamanho dos lipossomas e esta variação pode alterar seu comportamento quanto à eficiência de encapsulação, interação no meio biológico, perfil de eliminação da circulação, estabilidade e consequentemente levar a um comportamento indesejado ao tratamento com esses sistemas. Entretanto devido a esta versatilidade os lipossomas são utilizados como sistemas carreadores de fármaco para várias terapias aumentando a eficácia e reduzindo efeitos tóxicos.

As medidas de tamanho foram realizadas para as preparações de lipossomas diluídas na relação de 1 mL de preparação para 3 mL de solução PBS. Foram avaliados o tamanho das vesículas, polidispersividade e potencial zeta. Os estudos foram conduzidos com: (1) avaliação do tamanho dos lipossomas em relação à presença dos constituintes incorporando apenas ICV, apenas AICIPc e ICV mais

AICIPc/CD; (2) avaliação da manutenção do tamanho e potencial zeta dos lipossomas mantidos a temperatura ambiente por quatro semanas; (3) Avaliação da manutenção do tamanho e potencial zeta dos lipossomas após liofilização; (4) avaliação da influência da presença das ciclodextrinas complexando AICIPc no tamanho e potencial zeta dos lipossomas.

Tabela 10 Variação do tamanho dos lipossomas após incorporação com os fármacos durante quatro semanas.

Número de semanas	Lipossoma com ICV tamanho médio (nm)	Lipossoma com AICIPc tamanho médio (nm)	Lipossoma com AICIPc/HP- β -CD e ICV tamanho médio (nm)
1	112	113	115
2	142	137	117
3	166	166	135
4	170	174	147

Avaliando a estabilidade das preparações de lipossomas através da variação do tamanho em função do tempo, a temperatura ambiente (25 °C) mostrados na Tabela 10 observa-se um aumento do tamanho médio destes lipossomas.

A temperatura influencia muito a estabilidade dos lipossomas, pois os fosfolipídios que compõem a sua estrutura possuem uma característica gel-líquido cristalino. Esta característica permite que os fosfolipídios alterem seu arranjo estrutural quando a temperatura varia acima ou abaixo da temperatura de transição de fase (T_c). Acima desta temperatura os fosfolipídios são considerados fluidos, abaixo são considerados sólidos (GREGORIADIS, 2007). Os fosfolipídios utilizados na constituição dos lipossomas apresentam uma T_c negativa de -12 °C, sendo necessário a estocagem destes lipossomas em temperaturas baixas, pois pode haver desestruturação da bicamada e até degradação dos fosfolipídios quando há um aumento muito acima da T_c , o que pode ser justificado pelo aumento do tamanho dos lipossomas a temperatura ambiente. Ainda em relação aos dados apresentados na Tabela 8, observa-se que os lipossomas que continham a AICIPc complexada com ciclodextrinas não sofreram uma alteração tão elevada deste tamanho. A probabilidade de localização da AICIPc nos lipossomas é a bicamada por possuir característica predominantemente lipofílica. A presença de fármacos na

bicamada dos lipossomas impede uma melhor organização dos fosfolipídios para formação dos lipossomas alterando o seu tamanho, mas a complexação com ciclodextrinas permitiu uma melhor organização da ALCIPc nos lipossomas.

Tabela 11: Influência da presença da ICV, ALCIPc e ciclodextrinas no tamanho e potencial zeta do lipossoma

	Lip1	Lip2
Tamanho de partícula (nm)	93	112
Polidispersividade	0,13	0,14
Potencial zeta (mv)	-30	-12

*lipossomas contendo ALCIPc e ICV (Lip1); lipossomas contendo complexos de ALCIPc/HP- β -CD e ICV (Lip2).

O objetivo deste estudo mostrado na Tabela 11 foi avaliar a influência da presença de dois fármacos com características de solubilidade em água diferentes e da HP- β -CD no tamanho, polidispersividade e potencial zeta. Os dados apresentados na Tabela 11 permitiram concluir que apesar da presença da HP- β -CD não houve alteração significativa nos parâmetros analisados e não foram suficientes para descaracterizar os lipossomas da classificação de SUV nem de promover uma instabilidade neste tamanho, portanto observado as medidas realizadas nota-se que houve uma permanência na faixa de tamanho exigida para manutenção dos SUVs.

Além da estabilização provocada pela complexação da ALCIPc com ciclodextrinas os lipossomas podem se tornar mais estáveis quando sofrem alterações na sua estrutura por adição de colesterol, associação com outros fosfolipídios ou por liofilização. O colesterol (Figura 41) é um esteróide encontrado nas membranas animais, podendo ser utilizado na preparação de lipossomas, fazendo parte da sua estrutura, com o objetivo de melhorar as características da bicamada tornando-a mais estável ((Lehninger; Nelson e Cox, 2000)).

Figura 41: Estrutura química do colesterol

Por possuir características lipofílicas, o colesterol, orienta-se na bicamada lipídica entre as moléculas de fosfolipídio com o grupo hidroxila dirigido para a fase aquosa e o anel tricíclico ancorado entre os carbonos das cadeias graxas, resultando num efeito de empacotamento de moléculas na bicamada (HATTORI et al., 2005). Além disso, o colesterol modula a fluidez da membrana fosfolipídica, reduzindo a permeabilidade através da bicamada e melhorando a estabilidade na presença de fluídos biológicos (PARKS e HELLERSTEIN, 2006). O estudo realizado mostrado na Tabela 12 teve o propósito de avaliar alterações na estabilidade referente ao tamanho e potencial zeta dos lipossomas após liofilização.

Tabela 12 Influência da liofilização no tamanho e no potencial Zeta.

	Lip1 (antes)	Lip2 (antes)	Lip1 (depois)	Lip2 (depois)
Tamanho de partícula (nm)	93	112	104	135
Polidispersividade	0,13	0,14	0,09	0,22
Potencial zeta	-30	-32	-22,0	-39

* AICIPc e ICV em lipossomas (Lip1); complexos de ALCLPC/HP- β -CD e ICV em lipossomas (Lip2).

As preparações de lipossomas podem ser estocadas por um longo período quando estão liofilizadas. Entretanto a forma do liofilizado e a eficiência de encapsulação podem sofrer alterações durante o congelamento e descongelamento dos lipossomas alterando ou destruindo sua estrutura e consequentemente o seu perfil de liberação (CHRISTENSEN et al., 2008).

As amostras dos lipossomas foram preparadas com adição de 10% de trealose que tem a função de crioproteção na preparação lipossomal. Os crioprotetores para os lipossomas (glucose, sacarose, trealose) funcionam baixando a temperatura de transição de fase do fosfolipídio reduzindo sua rigidez. Desta forma, o crioprotetor previne a ruptura das vesículas, e a preparação se mantém estável. A avaliação do tamanho, polidispersividade e potencial zeta, fornecem informações importantes sobre as possíveis alterações que a preparação venha a apresentar ao ser congelada, liofilizada e reidratada.

Os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que os potenciais zeta determinados, não se encontram dentro da faixa para este parâmetro físico-químico (-30 mV +30 mV). Entretanto parte deste comportamento é ocasionada pela superfície do fosfolipídio que serve como componente estrutural da membrana que apresenta uma carga negativa superficial muito fraca sem condições de gerar um potencial elétrico elevado. Contudo o potencial zeta por si só não define a estabilidade do sistema, tendo o sistema de acordo com os resultados um caráter homogêneo e monodisperso adequado para a preparação.

Outro aspecto importante é a baixa variação no tamanho dos lipossomas encontrada após a liofilização Tabela 12, garantindo uma manutenção do tamanho e um índice de polidispersividade baixo demonstrando um sistema monodisperso mesmo após a liofilização e reconstituição, sugerindo a trealose como um bom crioprotetor para esta preparação.

4.7 Determinação da eficiência de encapsulação.

4.7.1 Determinação das curvas analíticas para ICV e AICIPc em DMSO

O método geralmente aplicado para determinar a eficiência de encapsulação dos lipossomas está relacionado à separação do fármaco encapsulado do não encapsulado. Esta separação é obtida por cromatografia por exclusão de tamanho (GRABIELLE-MADELMONT et al., 2003), diálise, filtração, ou centrifugação. A espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear de próton é também utilizada

como importante ferramenta, pois permite a determinação da quantidade de fármaco encapsulado sem a necessidade da separação física do fármaco encapsulado do não encapsulado (ZHANG et al., 2004).

A determinação da eficiência de encapsulação nos lipossomas é um dos aspectos que deve ser avaliado no momento de desenvolvimento destes sistemas, pois a localização do fármaco nos sistemas de liberação influencia desde suas propriedades físico-químicas até o seu perfil de liberação e biodisponibilidade.

Outro fator diz respeito ao sistema; no caso dos lipossomas a localização e concentração dos fármacos, principalmente os de baixa solubilidade em água, podem desestruturar os lipossomas, por se localizarem, em maior proporção, entre as cadeias dos fosfolípidios na bicamada. Este comportamento para certos tipos de fármacos reforça a importância de uma boa relação fosfolípido/fármaco durante a preparação dos lipossomas. Esta relação entre a quantidade de fosfolípido em função da de fármaco adicionada, permite que os lipossomas suportem uma quantidade suficiente de fármaco para a atividade a que se destina sem que haja desestruturação do sistema, antes que se atinja o local de ação.

O filtrado no volume de 100 µL coletado e adicionado na cubeta contendo 1,9 mL de DMSO em cubeta determinou a quantidade não encapsulada presente na solução tampão da preparação lipossomal. Por ter alto grau de lipofilia os fármacos que não são incorporados nos lipossomas tendem a ficar retidos na membrana utilizada para extrusão (GREGORIADIS, 2007). O método de extrusão permite a separação do fármaco que não foi encapsulado, do encapsulado garantindo que a maior concentração de fármaco presente na preparação esteja incorporada no lipossoma.

Para determinação das curvas analíticas de ICV e AICIPc em DMSO foram preparadas soluções estoque de 1mmol.L⁻¹. Estas soluções foram diluídas diretamente em cubeta de quartzo com DMSO, para se atingir a concentração desejada e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro para os comprimentos de onda de 678 nm para AICIPc e 794 para ICV.

Este método foi desenvolvido numa tentativa de otimizar a determinação da eficiência de encapsulação da AICIPc e ICV em lipossomas, já que estes agentes possuem propriedades diferentes em relação às suas solubilidades em meio aquoso, sendo a AICIPc se comportando com caráter lipofílico e a ICV como fármaco hidrofílico. Este perfil determinou o estudo de um solvente no qual as substâncias (AICIPc e ICV) apresentassem um elevado coeficiente de absorvidade

molar, pois os volumes no filtrado (100 μL), para determinação da concentração, pela técnica desenvolvida, apresentavam quantidades dos fármacos muito pequena.

Outro fator avaliado na técnica desenvolvida foi o solvente necessário para digerir a membrana utilizada na extrusão (etanol), capaz de dissolver a AICIPc e ICV, miscível com o solvente de leitura no espectro DMSO. Os valores das curvas analíticas abaixo foram construídas na região de linearidade para as substâncias, isoladamente, em DMSO com as concentrações das soluções para leitura preparadas diretamente em cubeta a partir de solução estoque, recentemente preparadas, em DMSO de ICV ou AICIPc na concentração de 1mmol.L^{-1} .

Tabela 13: Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de ICV

Concentração em ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância	Absorbância média	Desvio padrão	CV%
0,5	0,072 0,072 0,073	0,072	0.0005	0.79818
0,62	0,176 0,178 0,180	0,178	0.002	1.123596
0,77	0,339 0,330 0,304	0,334	0.004509	1.348729
0,97	0,485 0,510 0,486	0,493	0.014154	2.8671
1,1	0,685 0,690 0,684	0,686	0.003215	0.468366
1,3	0,935 0,985 0,942	0,935	0.006028	0.644216

CV% = Coeficiente de variação percentual

Os dados apresentados na Tabela 13 acima foram utilizados para construir a curva padrão d e ICV em DMSO representada abaixo na Figura 42, observando-se a região de linearidade na faixa de concentração de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $1,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação de 0,992.

Figura 42: Representação gráfica da curva analítica da solução d e ICV em concentrações de $0,5$ a $1,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método espectrofotométrico na região do visível a 794 nm .

Apesar da faixa muito estreita de correlação entre as leituras de densidade óptica e as concentrações d e ICV, pode-se observar uma faixa de certa linearidade de $0,1$ a $0,9$ de densidade óptica de acordo com a lei de Lambert-Beer. Esta faixa de concentração tanto para ICV como para AICIPc foi suficiente para se estimar as concentrações de ICV e AICIPc nos lipossomas com AICIPc estando ou não complexada com HP- β -CD. Esta faixa estreita de linearidade está relacionada com a alta absorvidade molar, no solvente utilizado, na região do visível, referente aos fármacos utilizados, entretanto necessária para quantificar uma quantidade muito pequena das substâncias presentes nos lipossomas, na membrana utilizada na extrusão e no filtrado obtido após centrifugação.

Tabela 14: Valores experimentais obtidos na construção da curva analítica de AICIPc

Concentração em (µg/mL)	Absorbância	Absorbância média	Desvio padrão	CV%
0,6	0,175 0,170 0,172	0,017	0,0025	1,4603
0,8	0,318 0,311 0,313	0,314	0,0036	1,1482
1,1	0,455 0,465 0,467	0,462	0,0064	1,3905
1,4	0,539 0,581 0,578	0,565	0,0231	4,0864
1,7	0,711 0,724 0,716	0,717	0.00655	0,9145
1,9	0,854 0,851 0,850	0,851	0.0020	0,2444

Os dados apresentados na Tabela 14 acima foram utilizados para construir a curva padrão de AICIPc em DMSO representada abaixo na Figura 43, observando-se a região de linearidade na faixa de concentração de 0,6 µmol.L⁻¹ a 1,9 µg.mL⁻¹ com coeficiente de correlação de 0,993.

Figura 43: Representação gráfica da curva analítica da solução de AICIPc em concentrações de 0,6 a 1,9 µg/mL pelo método espectrofotométrico na região do visível a 678 nm.

De acordo com a lei de Lambert-Beer, o intervalo de concentração de 0,5 a 1,3 µg/mL para ICV e 0,6 a 1,9 µg/mL para AICIPc, mostrou-se linear, apresentando coeficiente de correlação linear de 0,992 para ICV e 0,993 para AICIPc entre as concentrações estabelecidas e as absorções lidas. A equação da reta obtida por regressão linear do método dos mínimos quadrados foi $y = 0,9601x + 0,4043$ para ICV e $y = 0,4949x + 0,1024$ para AICIPc; onde x é a concentração em µg.mL⁻¹ e y é a absorção no visível.

Todas as medidas tanto para realização das curvas padrão como para a determinação das concentrações dos fármacos fotossensíveis AICIPc e ICV foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis na região do visível.

4.7.2 Determinação da Especificidade para AICIPc em lipossomas com ICV.

Especificidade e seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, sem que estes venham interferir nas medidas.

A Figura 44 apresenta a comparação entre os espectros de absorção das amostras de AICIPc incorporada nos lipossomas após ruptura da membrana e a mistura de lipoid 100, colesterol e ICV em DMSO.

Figura 44: Representação gráfica do estudo de especificidade da AICIPc (a) em relação aos constituintes dos lipossomas e ICV (•) em DMSO.

O Comportamento observado neste estudo permite avaliar que a presença do fosfolípido, colesterol e do fármaco ICV, não provocaram alteração no comportamento espectral da AICIPc, garantindo seletividade no método proposto para determinação da eficiência de encapsulação deste fármaco fotossensível.

4.7.3 Determinação da concentração para AICIPc em lipossomas.

Tabela 15: Determinação da concentração da AICIPc no lipossoma a partir da concentração inicial adicionada de $22 \mu\text{mol.L}^{-1}$

Lipossoma	Concentração teórica ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Quantidade na membrana ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Quantidade no filtrado ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Concentração final ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Rendimento da preparação (%)
ICV+AICIPc	22,5	3,8	1,43	17,27	76, 7%
$\beta\text{CD/AICIPc} + \text{ICV}$	22,5	3,4	1,13	17,97	79,8%
$\text{HP}\beta\text{CD/AICIPc} + \text{ICV}$	22,5	3,0	1,1	18,4	81,7%

Observa-se na Tabela 15 que a complexação com ciclodextrinas alterou a quantidade do fármaco presente no lipossoma. No entanto os resultados demonstram que há diferenças nas concentrações da AICIPc quando complexadas com tipos diferentes de ciclodextrinas, mostrando talvez melhor interação da AICIPc com a HP- β -CD, proporcionando melhor perfil de solubilidade no tampão e favorecendo melhor incorporação do fármaco fotossensível nos lipossomas. No entanto há também uma interação bem estabelecida da AICIPc com a β -CD mostrando que apesar de não proporcionar aumento igual à hidroxipropil, há manutenção e talvez um leve aumento na concentração incorporada nos lipossomas.

De acordo com o descrito acima o solvente utilizado, foi escolhido para que as substâncias estudadas (AICIPc e ICV) fossem solúveis e tivessem um elevado coeficiente de absorvidade molar e pudessem ser detectadas em baixas concentrações na preparação e na metodologia utilizadas (IDOWU e NYOKONG, 2007; GRATZ et al., 1999; REINDL et al., 1997). No entanto não foi possível detectar alguma quantidade de ICV nem no filtrado nem retido na membrana após digestão com etanol. Este fato talvez se deva a ICV apresentar uma boa solubilidade em água e, portanto pelo método utilizado para preparar os lipossomas não ser detectada após digestão na membrana ou em concentração suficiente para ser detectada em DMSO pelo método espectrofotométrico. Outro aspecto é a técnica de preparação por extrusão ter capacidade de aumentar a eficiência de encapsulação, de certos fármacos nos lipossomas e consequentemente à quantidade de ICV adicionada na preparação ter sido incorporada totalmente nos lipossomas.

4.8 Estudos de citotoxicidade

Fármacos fotossensíveis, quando no organismo, interagem de certa forma com os tecidos e órgãos, promovendo alterações nas suas propriedades fotofísicas e seu perfil de permeabilidade celular. A ligação as proteínas plasmáticas é um destes aspectos, que podem dificultar a localização, dos fármacos fotossensíveis, no órgão alvo alterando a concentração destes agentes e consequentemente o perfil farmacológico. Outro aspecto importante e bastante observado é a baixa solubilidade da maioria dos fármacos fotossensíveis, por ser lipofílica, no organismo, constituído em maior quantidade de água favorece o comportamento de agregação das moléculas do fármaco fotossensível. Esta agregação reduz sua eficiência

quando observado os estudos clínicos da TFD, bem como nos estudos celulares *in vitro* (VITOLS et al., 1990a; VITOLS et al., 1990b).

As substâncias utilizadas como fármacos fotossensíveis devem possuir algumas propriedades que as classificam como potenciais para a TFD. Dentre estas propriedades, baixa toxicidade no escuro e se acumular preferencialmente nos órgãos alvos destinados a ação.

O trabalho com cultura de células exige que uma metodologia toda especial seja seguida, de maneira a assegurar um crescimento fisiológico sadio e reprodutível (OLIVEIRA, D. M., 2006). Outros aspectos estão envolvidos com uma série de cuidados para que não haja, ou pelo menos, se reduzam os riscos de contaminação, perda de reagente, tempo e material biológico. Estes problemas podem ser diminuídos se alguns cuidados forem tomados. Por exemplo, observar, as células, sempre no microscópio cada vez que as culturas forem manipuladas; não compartilhar garrafas de meio de cultura e trabalhar com técnicas assépticas que devem ser mantidas a todo o momento.

A maioria dos estoques primários de culturas celulares é fornecida 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 as informações necessárias referentes ao meio de cultura mais apropriado para crescimento, tempo de vida médio 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.

4.8.1 Avaliação da citotoxicidade na ausência de luz

A importância do estudo de citotoxicidade na terapia fotodinâmica serve não só para avaliar a ação fotodinâmica, mais também o tipo de morte celular provocado pelo fármaco fotossensível e a viabilidade da formulação (RUSSELL et al., 2008; SHARMA et al., 2006).

Realizou-se o estudo da toxicidade da AICIPc complexada ou não com ciclodextrinas e ICV incorporados nos lipossomas, em diferentes concentrações e

meios (meio de cultura DMEM e lipossomal) sobre as células da linhagem J-774-A, na ausência de luz. Os resultados obtidos na avaliação da toxicidade estão apresentados na forma de gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função da concentração dos fármacos utilizada. O estudo foi realizado com três formulações de lipossomas contendo a AICIPc complexada ou não com ciclodextrinas e ICV em lipossomas; AICIPc/ICV não encapsulada.

A Figura 45 (a, b, c) representa as porcentagens das viabilidades celulares determinadas em função do aumento da concentração de AICIPc, ICV e AICIPc/ICV, nas concentrações de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dissolvidos em solução de DMEM enriquecido com SFB 1% e DMSO na concentração de 0,5% para células J774-A1.

Figura 45: Estudo de citotoxicidade após 4 horas de incubação em macrófagos J774-A1. ICV = Indocianina verde; Pc = AICIPc e ICV/PC = Indocianina verde e AICIPc nas concentrações de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (a); $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (b) e $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (c). Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,01$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Na Figura 46 (a, b, c) se reproduz o estudo realizado com AICIPc e ICV, só que neste caso a AICIPc foi incorporada nos lipossomas de três formas: (1) e ICV incorporada nos lipossomas; (2) complexada com β -CD e ICV incorporada nos lipossomas; (3) complexada com HP- β -CD e ICV incorporada nos lipossomas. Todas as três formas foram avaliadas nas mesmas concentrações do estudo da Figura 36.

Figura 46: Estudo de citotoxicidade após 4 horas de incubação em células neoplásicas de macrófagos J774-A1. L = lipossomas com ICV e AICIPc; Lb = lipossomas com ICV e AICIPc/ β -CD e Lh = lipossomas com ICV e AICIPc/HP- β -CD nas concentrações de 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 1,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

De acordo com a Figura 44 pode-se observar na concentração de 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ os valores obtidos foram de: 110,9%; 111,1%; 102,0%; para ICV, Pc e ICV/Pc respectivamente com $p < 0,01$. Na concentração de 1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ 101,0%, 99,2%, 90,2% para ICV, Pc e ICV/Pc respectivamente, com $p < 0,001$ e na concentração de 3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ os valores foram 109,67%, 82,6%, 66,8% para ICV, Pc e ICV/PC respectivamente com $p < 0,001$.

Estes valores mostram a baixa toxicidade da AICIPc e ICV no escuro (sem a presença de luz). No caso da ICV não se observa valores significativos de toxicidade independente das concentrações estudadas. No entanto, no caso da AICIPc, há uma pequena alteração nos valores de viabilidade celular, à medida que há um aumento na concentração e principalmente quando associada à ICV. Na Figura 46a observa-se um pequeno estímulo nas concentrações de $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para ICV e AICIPc, demonstrando a baixa toxicidade destes agentes nestas concentrações a ponto de estimular o crescimento celular. Quando a AICIPc e ICV se encontram juntas, um sinergismo do efeito citotóxico (Figura 46c), para a linhagem de células estudada na concentração de $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ quando comparado a AICIPc isolada é observado.

Na Figura 46 com lipossomas incorporando ICV e AICIPc os valores foram: 109.0%, 108.5%, 106.3% com $p < 0,05$; para lipossomas incorporando ICV e complexo de AICIPc/ β -CD: 105%; 102%, 109,6% com $p < 0,05$ e para lipossomas incorporando ICV e complexo de AICIPc/HP- β -CD: 115.2%, 128.%, 118.5% com $p < 0,05$. Todas as formulações foram estudadas nas concentrações de $0.5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Na Figura 46 há claramente uma barreira de proteção que os lipossomas proporcionam para ICV e AICIPc, mesmo estando esta última complexada ou não com ciclodextrinas e o aumento das concentrações dos fármacos no estudo.

4.8.2 Toxicidade da AICIPc livre e complexada com ciclodextrinas, ICV incorporados em lipossomas na presença de luz.

Foi avaliado a toxicidade da AICIPc livre, complexada com ciclodextrinas, além da ICV incorporados aos lipossomas na concentração de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para os dois fármacos fotossensíveis. Esta concentração foi escolhida, pois pode ser notada ínfima toxicidade quando os fármacos se encontravam associados em meio homogêneo, no estudo na ausência de luz. Quando incorporados em lipossomas mesmo para a maior concentração não foi observado toxicidade. O estudo da dose de 48 J/cm^2 foi realizado com doses de irradiação com a energia, preestabelecida, com Fotocoagulador laser FTC 1200 com excitação no comprimento de onda de 810 nm (comprimento de onda de excitação da ICV) ou em associação, com dose de 140 mJ.cm^{-2} com irradiações alternadas, com laser de diodo Eagle com comprimento de onda de excitação em 675 nm (comprimento de onda da AICIPc) nas células J774-A.

Foi analisado primeiramente o estudo da fototoxicidade da AICIPc complexada com ambas as ciclodextrinas associada à ICV incorporada aos lipossomas, apenas com o laser operando em 675 nm. Em outro estudo buscou o sinergismo das irradiações simultâneas em comprimentos de ondas diferentes, primeiramente com o laser de 675 nm seguido com sessões de irradiação com o Fotocoagulador laser FTC 1200 em 810 nm. A irradiação com este último laser foi realizada com energia de 48 J/cm² por três minutos. Esta energia utilizada no laser mais ICV foram estudadas em trabalho recente para tratamento de corioretinopatia, demonstrando segurança e eficácia neste tipo de patologia. Portanto o propósito foi verificar a capacidade da associação de um fármaco fotossensível AICIPc com ação fotodinâmica mais ICV através da hipertermia ambos excitados em seus respectivos comprimentos de onda proporcionando um sinergismo da ação dos agentes já estudados exaustivamente de forma isolada por nosso grupo de pesquisa (LONGO et al., 2009; CARDILLO et al., 2008; GOMES et al., 2006; NUNES et al., 2004).

Os resultados da Figura 47, estão apresentados na forma de gráfico de porcentagem da viabilidade celular em função da dose de luz laser para soluções de lipossomas com AICIPc complexadas com β -CD ou HP- β -CD irradiados com luz de 675 nm.

Figura 47 Efeito da aplicação de laser na viabilidade celular em linhagem de células J774-A, após 4 horas de incubação, comparando-se a influência do tipo de ciclodextrina, (●) Lb ou (●) Lhp, complexada com AICIPc, incorporada no lipossoma com a ICV. CT = células na presença de β -CD. As células foram expostas ao aumento da dose de luz 70, 140 e 700 mJ.cm-2. Significância estatística foi determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

De acordo com a Figura 47, pode-se observar que independente do derivado de ciclodextrina utilizado não há diferença observada entre o perfil de fototoxicidade para este tipo de linhagem de célula (J774-A). Entretanto à medida que se aumenta a dose de luz há redução na viabilidade celular, demonstrando que as ciclodextrinas favorecem o efeito fototóxico da AICIPc. Os resultados, corroboram com o já verificado na literatura, para AICIPc, em células tumorais (LONGO et al., 2009), mostrando a potencialização do efeito quando incorporado em lipossomas. Através dos resultados apresentados na Figura 47, pode-se observar que os complexos de AICIPc/ciclodextrinas incorporados nos lipossomas apresentaram uma eficiência na fototoxicidade à medida que se aumentou as doses de irradiação de 70 mJ.cm⁻², 140 mJ.cm⁻² e 700 mJ.cm⁻². Os valores de viabilidade celular para as três doses de irradiação foram de aproximadamente 75%; 52%; 9,5% respectivamente, para ambos os derivados de ciclodextrinas com $p < 0,001$. A irradiação de lipossomas com complexos de AICIPc e ICV, incorporados aos lipossomas, ocasionou um aumento na toxicidade, a qual teve seu máximo com o uso da dose de laser de 700 mJ.cm⁻².

A partir dos resultados obtidos nos estudos de citotoxicidade e fototoxicidade observados nas Figuras 47, 48 e 49 foi desenvolvido um protocolo para avaliar o provável efeito sinérgico, provocado pela aplicação simultânea dos dois lasers na linhagem J-774A. O procedimento foi realizado a partir da irradiação com dose de 48 J/cm² por 3 minutos, com excitação em 810 nm, seguido da irradiação com dose de 140 mJ.cm⁻² com excitação em 675 nm, na cultura de células contendo os lipossomas.

A Figura 48 representa o estudo de viabilidade celular após irradiação com doses de 48 J/cm² do Fotocoagulador laser FTC 1200, com excitação em comprimento de onda de 810 nm. Os dados estão apresentados em percentagens das viabilidades celulares determinadas em função da dose de luz.

Figura 48 Porcentagem de células J774 vivas, após serem submetidas com aplicação de 3 minutos do Fotocoagulador laser FTC 1200 com dose de 48 J/cm^2 nas amostras **L** (Lip+ICV + AICIPc); **Lb** (Lip+ β -CD/AICIPc+ICV); **Lhp** (Lip+Hp- β -CD/AICIPc + ICV) com significância estatística determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm$ SD) para $n = 3$.

Pode-se observar na Figura 48 que há uma redução na viabilidade celular para as três preparações de lipossomas com, 60,5% lipossomas com ICV e AICIPc; 64,5 para lipossomas com AICIPc/ β -CD e ICV e 59,0% para Lipossomas com AICIPc/HP- β -CD e ICV. A ação deste fármaco é resultante da produção de espécies reativas de oxigênio, em particular oxigênio singlete, induzindo desorganização da membrana citoplasmática, provocando um influxo de líquidos extracelulares e conseqüente morte celular (BAUMLER et al., 1999). Outro efeito já observado para ICV é um rápido e intenso efeito na temperatura do tecido ocorre quando usado o processo de hipertermia convencional por aplicação de uma energia muito alta e de baixa intensidade em pulso contínuo como, por exemplo, a usada na degeneração macular relacionada à idade, conhecida como hipertermia que promove uma elevação da temperatura provocando a morte de células tumorais e pequenos vasos que são mais sensíveis à elevação da temperatura (OLIVEIRA, D. M., 2006).

Alguns estudos estão sendo feitos para avaliação do efeito sinérgico da ICV, com seu efeito térmico e fármacos que atuam por mecanismos de ação diferente (LU, 2007; FREUND et al., 2006). Estes trabalhos revelaram que a associação com a ICV potencializa o efeito do fármaco em algumas patologias através do seu efeito sinérgico.

A radiação laser é monocromática, ou seja, emite radiação em um único comprimento de onda. A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva dos cromóforos. Esta capacidade permite sugerir que A AICIPc não sofreu excitação quando na utilização do Fotocoagulador laser FTC 1200 em 810 nm, região de absorção do fármaco ICV.

Este estudo serviu para comparação da ação da preparação de lipossomas com a AICIPc livre ou complexada aos lipossomas na presença de ICV quando irradiada apenas com Fotocoagulador laser FTC 1200. Além disso, foi possível verificar a influência da AICIPc na indução de morte celular após irradiação.

A Figura 49 representa a comparação do estudo de viabilidade celular após irradiação com doses de 48 J/cm^2 do Fotocoagulador laser FTC 1200, com o estudo de viabilidade celular após a irradiação com os dois lasers, Fotocoagulador laser FTC 1200 e laser de diodo Eagle, com excitação em comprimento de onda de 810 nm e 650 nm respectivamente. Os dados estão apresentados em percentagens das viabilidades celulares determinadas em função da dose de luz.

Figura 49 Porcentagem de células J774-A1 vivas após 4 horas de incubação com AICIPc complexada irradiadas com Fotocoagulador laser FTC 1200 em 810 nm (●) ou com Fotocoagulador laser FTC 1200 em 810 nm com dose de 48 J/cm^2 e em seguida com laser de diodo Eagle a 650 nm com dose 140 mJ.cm^{-2} (●), em meio de cultura com 1% de SFB e incorporada aos Lipossomas. Significância estatística determinada pelo teste de variância ANOVA, seguido do pós-teste tukey *t*-teste com $p < 0,05$. Cada SEM representa o desvio padrão ($\pm \text{SD}$) para $n = 3$.

Na Figura 49 é possível observar, quando comparado ao uso de apenas um laser, o sinergismo provocado pela associação dos dois fármacos fotossensíveis, excitados em seus respectivos comprimentos de onda (ICV em 810 nm e AICIPc em 675 nm). É possível notar também que os lipossomas que incorporam AICIPc e ICV sem a presença das ciclodextrinas apresentam uma menor viabilidade celular, sugerindo que o complexo de ciclodextrinas AICIPc nos lipossomas, promoveu um impedimento na interação dos agentes fotossensibilizantes com as células. Este aspecto pode ser determinado pelo efeito de blindagem provocado pelas ciclodextrinas.

De acordo com os valores de viabilidade celular obtidos no estudo da Figura 49 para lipossomas com AICIPc/ICV 23,4%; para lipossomas com AICIPc/ β -CD e ICV 40,93% e lipossomas com AICIPc/HP- β -CD e ICV 43,8, se observa, quando comparado aos valores obtidos no estudo da Figura 49 uma redução de 37,1% para lipossomas sem ciclodextrinas e de 23,57% e 15,2% para lipossomas com β -CD e HP- β -CD respectivamente na viabilidade celular. quando associado os dois lasers. Este comportamento permite definir que a aplicação simultânea dos dois lasers em 810 nm e 675 nm, promove um sinergismo no efeito fototóxico, devido a uma maior ativação dos fármacos ICV e AICIPc em seus respectivos comprimentos de onda.

As ciclodextrinas possuem a capacidade de aumentar o efeito fotodinâmico e reduzir o efeito citotóxico dos fármacos fotossensíveis (KOLAROVA et al., 2003). No entanto apesar de interagir bem com as superfícies das membranas celulares, não são capazes de introduzir o complexo fármaco ciclodextrinas no interior das células. Dependendo da força de interação fármaco ciclodextrinas a interiorização do fármaco pode ser reduzida pela alta interação com o complexante, principalmente nos casos de fármacos lipofílicos, como no caso dos fármacos fotossensíveis, que possuem um microambiente desfavorável a sua solubilidade, reduzindo talvez a concentração de AICIPc no interior das células.

De forma geral, estes resultados indicam claramente que esta linha de raciocínio permite uma melhor ação da TFD, onde AICIPc atuando sinergicamente produzindo espécies reativas de oxigênio e o efeito térmico gerado pela ICV por hipertermia, induzem *in vitro* uma considerável morte celular após mínimas doses de luz pelo processo de fotossensibilização. Portanto nestes estudos realizados direcionam para uma preparação lipossomal, com os dois agentes AICIPc e ICV sem a presença das ciclodextrinas quando na utilização dos dois laser nas mesmas concentrações de energia utilizadas no estudo.

5. Conclusões

As constantes de associação apresentaram valores diferentes para os tipos de ciclodextrinas observando associação fármaco/CD maior com HP- β -CD, melhorando as propriedades fotofísicas.

Não se observou nenhuma toxicidade para AICIPc complexada com ciclodextrinas. No entanto na avaliação do complexo AICIPc/CD na presença de luz, houve um alto índice de morte celular.

No caso dos lipossomas as preparações demonstraram que as modificações geradas pela incorporação dos fármacos fotossensíveis favoreceram as propriedades espectroscópicas necessárias para a ação dos fármacos na PDT, com conseqüente redução da agregação e alterações significativas nas propriedades fotofísicas e fotobiológicas dos fármacos.

Na avaliação da ICV complexada com ciclodextrinas em lipossomas tem-se um equilíbrio dinâmico em relação ao local deste fármaco nos lipossomas demonstrando decaimento tri exponencial. No entanto este comportamento não apresentou influência significativa no tempo de vida de fluorescência comparando-se ao fármaco em meio homogêneo.

O comportamento de ligação as proteínas plasmáticas demonstrou uma redução na interação BSA/ICV complexada a ciclodextrina. Nos lipossomas contendo AICIPc/CD e ICV não foi detectada ligação significativa a BSA.

Nos estudos de determinação de tamanho e potencial zeta dos lipossomas, observou-se que à temperatura ambiente, estas características se mantiveram estáveis após liofilização.

No estudo de toxicidade na ausência de luz, observou-se baixa toxicidade para os fármacos no escuro. Entretanto houve um efeito sinérgico na associação dos fármacos. Nos lipossomas, houve ausência de toxicidade nas três concentrações de fármacos estudadas, mostrando que os lipossomas reduziram o efeito tóxico dos fármacos.

Na avaliação do efeito fototóxico as preparações de complexos e de lipossomas proporcionaram um alto índice de morte celular com os dois tipos de laser aplicados de forma isolada.

Nos lipossomas com aplicações simultâneas dos lasers, houve um sinergismo na ação citotóxica. Cada laser conseguiu excitar as moléculas dos fármacos em seus respectivos comprimentos de onda aumentando o efeito fototóxico.

Referências

ANDERSON, R. R. **Photoimmunology-Tissue Optics and Photoimmunology**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1983, p1-61.

AREVALO, J. F.; GARCIA, R. A.; MENDOZA, A. J.; FERNANDEZ, C. F. Indocyanine green-mediated photothrombosis (IMP) with and without intravitreal triamcinolone acetonide for subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration, ***Investigative Ophthalmology & Visual Science***, v. 46, p. 1-5, May.2005.

BANGHAM, A. D.; HILL, M. W.; MILLER, N. G. A. **Methods in membrane Biology**. New York: Plenum Press, 1965, p. 1-68.

BARRY, R. B. M.; KEOHANE, S. G. Topical methyl 5-aminolaevulinate hydrochloride (Metvix) photodynamic therapy for the treatment of superficial cutaneous breast cancer metastases, ***British Journal of Dermatology***, v. 153, p. 77-77, Jul.2005.

BATLLE, A. M. D. Porphyrins, Porphyrins, Cancer and Photodynamic Therapy - A Model for Carcinogenesis, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 20, p. 5-22, Sept.1993.

BAUMLER, W.; ABELS, C.; KARRER, S.; WEISS, T.; MESSMANN, H.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M. Photo-oxidative killing of human colonic cancer cells using indocyanine green and infrared light, ***British Journal of Cancer***, v. 80, p. 360-363, May.1999.

BELLNIER, D. A.; GRECO, W. R.; LOEWEN, G. M.; NAVA, H.; OSEROFF, A. R.; PANDEY, R. K.; TSUCHIDA, T.; DOUGHERTY, T. J. Population pharmacokinetics of the photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a in cancer patients, ***Cancer Research***, v. 63, p. 1806-1813, Aprl.2003.

BOEHNCKE, W. H.; ELSHORST-SCHMIDT, T.; KAUFMANN, R. Systemic photodynamic therapy is a safe and effective treatment for psoriasis, ***Archives of Dermatology***, v. 136, p. 271-272, Fev.2000.

BOK, D. The retinal-pigment epithelium - a versatile partner in vision, ***Journal of Cell Science***, v. suppl., p. 189-195, 1993.

BONNETT, R. **Chemical Aspects of Photodynamic therapy - Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**, Advanced Chemistry Texts ed. London: Gordon and Breach Science Publishers, v. 1, 2000, p. 1-305.

BONNETT, R.; BUCKLEY, D. G.; BURROW, T.; GALIA, A. B. B.; SAVILLE, B.; SONGCA, S. P. Photobactericidal Materials Based on Porphyrins and Phthalocyanines, **Journal of Materials Chemistry**, v. 3, p. 323-324, Mar.1993.

BOULTON, M.; DAYHAW-BARKER, P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes, **Eye**, v. 15, p. 384-389, June2001.

BOURRE, L.; THIBAUT, S.; FIMIANI, M.; FERRAND, Y.; SIMONNEAUX, G.; PATRICE, T. In vivo photosensitizing efficiency of a diphenylchlorin sensitizer: interest of a DMPC liposome formulation, **Pharmacological Research**, v. 47, p. 253-261, Mar.2003.

BRASSEUR, N.; ALI, H.; LANGLOIS, R.; VAN LIER, J. E. Biological activities of phthalocyanines-IX. Photosensibilization of V-79 chinese hamster system cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines, **Photochemical and Photobiology**, v. 47, p. 705-711, 1988.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645-666, July2007.

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, Aug.2004.

BUBOLTZ, J. T.; FEIGENSON, G. W. A novel strategy for the preparation of liposomes: Rapid solvent exchange, **Biophysical Journal**, v. 76, p. A59, Jan.1999.

BYUN, J. Y.; CHOI, H. Y.; MYUNG, K. B.; CHOI, Y. W. Expression of IL-10, TGF-beta(1) and TNF-alpha in Cultured Keratinocytes (HaCaT Cells) after IPL Treatment or ALA-IPL Photodynamic Treatment, **Annals of Dermatology**, v. 21, p. 12-17, Feb.2009.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin, **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 78, p. 1-6, Jan.2005.

CARDILLO, J. A.; JORGE, R.; COSTA, R. A.; NUNES, S. M. T.; LAVINSKY, D.; KUPPERMANN, B. D.; TEDESCO, A. C.; FARAH, M. E. Experimental selective

choriocapillaris photothrombosis using a modified indocyanine green formulation, **British Journal of Ophthalmology**, v. 92, p. 276-280, Feb.2008.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. mechanisms in photodynamic therapy: part one--photosensitizers, photochemistry and cellular localization, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 279-293, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R.; . Mecanismos in photodynamic : part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution tumor localization and modes of tumor destruction, **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 2, p. 91-106, 2005.

CATENA, G. C.; BRIGHT, F. V. Thermodynamic Study on the Effects of Beta-Cyclodextrin Inclusion with Anilinonaphthalenesulfonates, **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 905-909, Apr.1989.

CHALEIX, V.; SOL, V.; HUANG, Y. M.; GUILLOTON, M.; GRANET, R.; BLAIS, J. C.; KRAUSZ, P. RGD-porphyrin conjugates: Synthesis and potential application in photodynamic therapy, **European Journal of Organic Chemistry**, p. 1486-1493, Apr.2003.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review, **Aaps Pharmscitech**, v. 6, 2005.

CHANG, C. T.; DOUGHERTY, T. J. Photoradiation Therapy - Kinetics and Thermodynamics of Porphyrin Uptake and Loss in Normal and Malignant Cells in Culture, **Radiation Research**, v. 74, p. 498, 1978.

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. 147-157, Mar.2000.

CHRISTENSEN, D.; KIRBY, D.; FOGED, C.; AGGER, E. M.; ANDERSEN, P.; PERRIE, Y.; NIELSEN, H. M. alpha,alpha '-trehalose 6,6 '-dibehenate in non-phospholipid-based liposomes enables direct interaction with trehalose, offering stability during freeze-drying, **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1778, p. 1365-1373, May2008.

COLASANTI, A.; KISSLINGER, A.; QUARTO, M.; RICCIO, P. Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an in vitro human prostate model, **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, p. 1039-1046,2004.

COSMA, P.; FINI, P.; ROCHIRA, S.; CATUCCI, L.; CASTAGNOLO, M.; AGOSTIANO, A.; GRISTINA, R.; NARDULLI, M. Phototoxicity and cytotoxicity of chlorophyll a/cyclodextrins complexes on Jurkat cells, **Bioelectrochemistry**, v. 74, p. 58-61, Nov.2008.

COSTA, R. A.; FARAH, M. E.; FREYMULLER, E.; MORALES, P. H.; SMITH, R.; CARDILLO, J. A. Choriocapillaris photodynamic therapy using indocyanine green, **American Journal of Ophthalmology**, v. 132, p. 557-565, Oct.2001.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 1023-1035, Dec.2004.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233, p. 351-371, Nov.2002.

DESMETTRE, T.; DEVOISSELLE, J. M.; MORDON, S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography, **Survey of Ophthalmology**, v. 45, p. 15-27, July2000.

DORNONVILLE, D. E.; LACOUR, M. Ion transport in the retinal pigment epithelium, **Acta Ophthalmologica**, v. 71, p. 1-32, 1993.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic Therapy (Pdt) of Malignant-Tumors, **Crc Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 2, p. 83-116, 1984.

DUCHENE, D.; WOUESSIDJEWE, D. Industrial Uses of Cyclodextrins and Their Derivatives, **Journal of Coordination Chemistry**, v. 27, p. 223-236, 1992.

DURMUS, M.; AYHAN, M. M.; GUREK, A. G.; AHSEN, V. Peripherally alpha(alpha)-substituted novel phthalocyanines, **Dyes and Pigments**, v. 77, p. 570-577, 2008.

EPAND, R. M.; EPAND, R. F. Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents, **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1788, p. 289-294, Jan.2009.

FABRIS, C.; SONCIN, M.; MAZZON, E.; CALZAVARA-PINTON, P.; LIA, F.; GIACOMO, C.; DEI, D.; TAMPUCCI, S.; RONCUCCI, G.; JORI, G. A novel tetracationic phthalocyanine as a potential skin phototherapeutic agent, **Experimental Dermatology**, v. 14, p. 675-683, Sept.2005.

FLOWER, R. W. Experimental studies of indocyanine green dye-enhanced photocoagulation of choroidal neovascularization feeder vessels, ***American Journal of Ophthalmology***, v. 129, p. 501-512, Apr.2000.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells : A manual of basic technique**. 3rd ed. New York: Alan R. Liss, INC,1983, p.1-295

FREUND, K. B.; KLAIS, C. M.; EANDI, C. M.; OBER, M. D.; GOLDBERG, D. E.; SORENSON, J. A.; YANNUZZI, L. A. Sequenced combined intravitreal triamcinolone and indocyanine green angiography-guided photodynamic therapy for retinal angiomatous proliferation, ***Archives of ophthalmology***, v. 124, p. 487-492, 2006.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. F. G.; DEMICHE, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio, ***Química Nova***, v. 28, p. 511-518, May2005.

FRIJLINK, H. W.; EISSENS, A. C.; SCHOONEN, A. J. M.; LERK, C. F. The Effects of Cyclodextrins on Drug Absorption .2. Invivo Observations, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 64, p. 195-205, Dec.1990a.

FRIJLINK, H. W.; VISSER, J.; HEFTING, N. R.; OOSTING, R.; MEIJER, D. K. F.; LERK, C. F. The Pharmacokinetics of Beta-Cyclodextrin and Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin in the Rat, ***Pharmaceutical Research***, v. 7, p. 1248-1252, Oct.1990b.

GOLD, M. H.; GOLDMAN, M. P. 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy: Where we have been and where we are going, ***Dermatologic Surgery***, v. 30, p. 1077-1084, Aug.2004.

GOMES, A. J.; LUNARDI, L. O.; MARCHETTI, J. M.; LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Indocyanine green nanoparticles useful for photomedicine, ***Photomedicine and Laser Surgery***, v. 24, p. 514-521, Aug.2006.

GRABIELLE-MADELMONT, C.; LESIEUR, S.; OLLIVON, M. Characterization of loaded liposomes by size exclusion chromatography, ***Journal of Biochemical and Biophysical Methods***, v. 56, p. 189-217, June2003.

GRATZ, H.; PENZKOFER, A.; ABELS, C.; SZEIMIES, R. M.; LANDTHALER, M.; BAUMLER, W. Photo-isomerisation, triplet formation, and photo-degradation dynamics of indocyanine green solutions, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry***, v. 128, p. 101-109, Nov.1999.

GREGORIADIS, G. **Liposome Technology**. 3rd ed. London: CRC Press,v. 2, 2007, p. 1-388.

GREGORIADIS, G.; FLORENCE, A. T. Recent Advances in Drug Targeting, ***Trends in Biotechnology***, v. 11, p. 440-442, Nov.1993.

GRISANTI, S.; TATAR, O. The role of vascular endothelial growth factor and other endogenous interplayers in age-related macular degeneration, ***Progress in Retinal and Eye Research***, v. 27, p. 372-390, July2008.

GULATI, M.; GROVER, M.; SINGH, S.; SINGH, M. Lipophilic drug derivatives in liposomes, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 165, p. 129-168, May1998.

GUO, W.; AHMAD, A.; KHAN, S.; DAHHANI, F.; WANG, Y. F.; AHMAD, I. Determination by liquid chromatography with fluorescence detection of total 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) in beagle dog plasma after intravenous administration of liposome-based SN-38 (LE-SN38), ***Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences***, v. 791, p. 85-92, July2003.

GUO, X. L.; AN, W. T.; SHUANG, S. M.; CHENG, F. Q.; DONG, C. Study on spectroscopic characterization of meso-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin (THPP) in beta-cyclodextrin and its derivatives, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry***, v. 173, p. 258-263, July2005.

GUO, Y. J.; ZHANG, P.; CHAO, J. B.; SHUANG, S. M.; DONG, C. Study on the supramolecular system of 5-(p-hydroxyphenyl)-10,15,20-tris-(4-chlorophenyl)porphyrin with cyclodextrins and its analytical characteristics, ***Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, v. 71, p. 946-950, Dec.2008.

HAMBLEY, T. W. Physiological targeting to improve anticancer drug selectivity, ***Australian Journal of Chemistry***, v. 61, p. 647-653, 2008.

HAMBLIN, M. R.; NEWMAN, E. L. Photosensitized Targeting in Photodynamic Therapy .2. Conjugates of Hematoporphyrin with Serum-Lipoproteins, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 26, p. 147-157, Nov.1994a.

HAMBLIN, M. R.; NEWMAN, E. L. Photosensitizer Targeting in Photodynamic Therapy .1. Conjugates of Hematoporphyrin with Albumin and Transferrin, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 26, p. 45-56, Oct.1994b.

HATTORI, Y.; SUZUKI, S.; KAWAKAMI, S.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. The role of dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) in targeted gene delivery with mannosylated cationic liposomes via intravenous route, ***Journal of Controlled Release***, v. 108, p. 484-495, Nov.2005.

HIGUCHI, T.; CONNORS, K. A. Phase solubility techniques, ***Advances in analytical chemistry instrumentation***, v. 4, p. 117-212, 1965.

HUNGERFORD, G.; BAPTISTA, A. L. F.; COUTINHO, P. J. G.; CASTANHEIRA, E. M. S.; OLIVEIRA, M. E. C. D. Interaction of DODAB with neutral phospholipids and cholesterol studied using fluorescence anisotropy, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry***, v. 181, p. 99-105, July.2006.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry***, v. 188, p. 200-206, May2007.

IZUMI, Y.; OKAZAKI, T.; ZHANG, M.; YUDASAKA, M.; IJIMA, S. High Efficiencies for Singlet Oxygen Generation of Fullerenes and Their Phototoxicity, ***Bulletin of the Chemical Society of Japan***, v. 81, p. 1584-1588, Dec.2008.

ISHII, K.; ITOYA, H.; MIWA, H.; FUJITSUKA, M.; ITO, O.; KOBAYASHI, N. Relationship between symmetry of porphyrinic pi-conjugated systems and singlet oxygen ((1)Delta(g)) yields: Low-symmetry tetraazaporphyrin derivatives, ***Journal of Physical Chemistry A***, v. 109, p. 5781-5787, July2005.

JANSOOK, P.; LOFTSSON, T. CD as solubilizers: Effects of excipients and competing drugs, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 379, p. 32-40, Sept.2009.

JEFFES, E. W. B. Levulan (R): the first approved topical photosensitizer for the treatment of actinic keratosis, ***Journal of Dermatological Treatment***, v. 13, p. S19-S23, Mar.2002.

JOGUPARTHI, V.; ANDERSON, B. D. Effect of cyclodextrin complexation on the liposome permeability of a model hydrophobic weak acid, ***Pharmaceutical Research***, v. 25, p. 2505-2515, Nov.2008.

JORGE, R.; CARDILLO, J. A.; COSTA, R. A.; QUIRINO, L. S.; FARAH, M. E.; NUNES, S. M. T.; TEDESCO, A. C. Experimental selective choriocapillaris photothrombosis using a modified indocyanine green formulation, ***British Journal of Ophthalmology***, v.92, p. 276-280, Oct.2008.

KELLY, J. F.; SNELL, M. E. Hematoporphyrin Derivative - Possible Aid in Diagnosis and Therapy of Carcinoma of Bladder, ***Journal of Urology***, v. 115, p. 150-151, 1976.

KESSEL, D.; SCHNECKENBURGER, H. On the purity and definition of oligomeric HPD formulations, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 3, p. 637-638, 1989.

KIBBE, A. H. **Handbook of Pharmaceutical excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2000, p.1-888.

KLEIN, R.; KLEIN, B. E. K. Do statins prevent age-related macular degeneration?, ***American Journal of Ophthalmology***, v. 137, p. 747-749, Apr.2004.

KOLAROVA, H.; MOSINGER, J.; LENOBEL, R.; KEJLOVA, K.; JIROVA, D.; STRNAD, M. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy, ***Toxicology in Vitro***, v. 17, p. 775-778, Oct.2003.

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

KORBELIK, M.; KROSL, G. Photofrin Accumulation in Malignant and Host-Cell Populations of A Murine Fibrosarcoma, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 62, p. 162-168, Nov.1995.

KUBLER, A.; NIZIOL, C.; SIDHU, M.; DUNNE, A.; WERNER, J. A. Cost-effectivity analysis of photodynamic therapy with Foscan (R) (Foscan (R)-PDT) compared with a palliative chemotherapy in patients with advanced head and neck tumors in Germany, ***Laryngo-Rhino-Otologie***, v. 84, p. 725-732, Oct.2005.

KULKARNI, A. D.; KUPPERMANN, B. D. Wet age-related macular degeneration, ***Advanced Drug Delivery Reviews***, v. 57, p. 1994-2009, Dec.2005.

KURWA, H. A.; BARLOW, R. J. The role of photodynamic therapy in dermatology, ***Clinical and Experimental Dermatology***, v. 24, p. 143-148, May1999.

LA COUR, M.; KIILGAARD, J. F.; NISSEN, M. H. Age-related macular degeneration - Epidemiology and optimal treatment, ***Drugs & Aging***, v. 19, p. 101-133, 2002.

LASIC, D. D. Novel applications of liposomes, ***Trends in Biotechnology***, v. 16, p. 307-321, July1998.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Princípios de bioquímica**. 2nd ed., São Paulo: Sarvier, 2000, p.1-356

LENG, X. B.; CHOI, C. F.; LUO, H. B.; CHENG, Y. K.; NG, D. K. P. Host-guest interactions of 4-carboxyphenoxy phthalocyanines and beta-cyclodextrins in aqueous media, **Organic Letters**, v. 9, p. 2497-2500, June 2007.

LEROYLECHAT, F.; WOUESSIDJEWE, D.; ANDREUX, J. P.; PUISIEUX, F.; DUCHENE, D. Evaluation of the Cytotoxicity of Cyclodextrins and Hydroxypropylated Derivatives, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 101, p. 97-103, Jan. 1994.

LIM, H. J.; CHO, E. C.; SHIM, J.; KIM, D. H.; AN, E. J.; KIM, J. Polymer-associated liposomes as a novel delivery system for cyclodextrin-bound drugs, **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 320, p. 460-468, Apr. 2008.

LOFTSSON, T.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1-11, Feb. 2007.

LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; SIMIONI, A. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors, **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 94, p. 143-146, Feb. 2009.

LU, Q. B. Molecular Reaction Mechanisms of Combination treatments of Low-Dose Cisplatin with Radiotherapy and Photodynamic Therapy, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 2601-2604, 2007.

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

LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Synergic photosensitizers: A new trend in photodynamic therapy, **Current Organic Chemistry**, v. 9, p. 813-821, May 2005.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de aplicação e perspectivas, **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, July 1999.

MAMAN, N.; DHAMI, S.; PHILLIPS, D.; BRAULT, D. Kinetic and equilibrium studies of incorporation of di-sulfonated aluminum phthalocyanine into unilamellar vesicles, **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1420, p. 168-178, Aug. 1999.

MANOSROI, A.; KONGKANERAMIT, L.; MANOSROI, J. Characterization of amphotericin B liposome formulations, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, p. 535-543, 2004.

MARANHO, D. S.; DE LIMA, R. G.; PRIMO, F. L.; DA SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photoinduced Nitric Oxide and Singlet Oxygen Release from ZnPc Liposome Vehicle Associated with the Nitrosyl Ruthenium Complex: Synergistic Effects in Photodynamic Therapy Application, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 85, p. 705-713, May2009.

MCCORMACK, B.; GREGORIADIS, G. Drugs-In-Cyclodextrins-In-Liposomes - A Novel Concept in Drug-Delivery, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 112, p. 249-258, Dec.1994.

MEDLICOTT, N. J.; FOSTER, K. A.; AUDUS, K. L.; GUPTA, S.; STELLA, V. J. Comparison of the effects of potential parenteral vehicles for poorly water soluble anticancer drugs (organic cosolvents and cyclodextrin solutions) on cultured endothelial cells (HUV-EC), ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 87, p. 1138-1143, Sept.1998.

MERCHAT, M.; BERTOLINI, G.; GIACOMINI, P.; VILLANUEVA, A.; JORI, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 32, p. 153-157, Fev.1996.

MISHRA, A.; BEHERA, R. K.; BEHERA, P. K.; MISHRA, B. K.; BEHERA, G. B. Cyanines during the 1990s: A review, ***Chemical Reviews***, v. 100, p. 1973-2011, June2000.

MOAN, J.; BERG, K. The photodegradation porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, ***Photochemical and Photobiology***, v. 53, p. 549-553, 1991.

MORDON, S.; DEVOISSELLE, J. M.; SOULIE-BEGU, S.; DESMETTRE, T. Indocyanine green: Physicochemical factors affecting its fluorescence in vivo, ***Microvascular Research***, v. 55, p. 146-152, Mar.1998.

MOREIRA, L. M.; DOS SANTOS, F. V.; LYON, J. P.; MAFTOUM-COSTA, M.; PACHECO-SOARES, C.; DA SILVA, N. S. Photodynamic therapy: Porphyrins and phthalocyanines as Photosensitizers, ***Australian Journal of Chemistry***, v. 61, p. 741-754, 2008.

MOSHER, G.; THOMPSON, D. O. Safety of cyclodextrins. In: SWARBRICK, J., BOYLAN, J. C. E. ***Encyclopedia of Pharmaceutical Technology***. New York: v.19, 2000, p.1-72

NEIMANN, A.; PORTER, S.; GELFAND, J. The epidemiology of psoriasis, ***Experimental Review of Dermatology***, v. 1, p. 63-75, 2006.

NEVRELOVÁ, P.; KOLÁROVÁ, H.; BAJGAR, R.; MACEÈEK, J.; TOMEÈKA, M.; TOMÁNKOVÁ, K.; STRNAD, M. Measurment of reactive oxygen species after photodynamic therapy in vitro, **Scripta Medica**, v. 78, p. 281-290, 2005.

NISHIYAMA, N.; MORIMOTO, Y.; JANG, W. D.; KATAOKA, K. Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 327-338, Apr.2009.

NOISEUX, I.; MERMUT, O.; BOUCHARD, J. P.; CORMIER, J. F.; DESROCHES, P.; FORTIN, M.; GALLANT, P.; LECLAIR, S.; VERNON, M. L. Effect of liposomal confinement on photochemical properties of photosensitizers with varying hydrophilicity, **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, p. 1-11, 2008.

NORUM, O. J.; SELBO, P. K.; WEYERGANG, A.; GIERCKSKY, K. E.; BERG, K. Photochemical internalization (PCI) in cancer therapy: From bench towards bedside medicine, **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 96, p. 83-92, Aug.2009.

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. 273-284, Fev.2004.

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, Jan.2004.

NYOKONG, T. Effects of substituents on the photochemical and photophysical properties of main group metal phthalocyanines, **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1707-1722, July2007

OKU, N. Anticancer therapy using glucuronate modified long-circulating liposomes, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 40, p. 63-73, Nov.1999.

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

OLIVEIRA, D. M.; LACAVA, Z. G. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: A promising dual nanostructured system for cancer treatment, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2432-2437, Aug.2006.

OWENS, J. W.; SMITH, R.; ROBINSON, R.; ROBINS, M. Photophysical properties of porphyrins, phthalocyanines and benzochlorins, ***Inorganica Chimica Acta***, v. 279, p. 226-231, 1998.

PARKS, E. J.; HELLERSTEIN, M. K. Recent advances in liver triacylglycerol and fatty acid metabolism using stable isotope labeling techniques, ***Journal of Lipid Research***, v. 47, p. 1651-1660, Aug.2006.

PENFOLD, P. L.; PROVIS, J. M. **Macular Degeneration**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2005, p 1-202.

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

PENG, L.; WANG, B. C.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells, ***Colloids and Surfaces B-Biointerfaces***, v. 45, p. 108-111, Oct.2005.

PHILLIPS, D.; O'CONNOR, D. V. **Time Correlated Single Photon Counting**. London: Academic Press, 1984, p. 1-2

PIERMAROCCHI, S.; LO GIUDICE, G.; SARTORE, M.; FRIEDE, F.; SEGATO, T.; PILOTTO, E.; MIDENA, E. Photodynamic therapy increases the eligibility for feeder vessel treatment of choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration, ***American Journal of Ophthalmology***, v. 133, p. 572-575, Apr.2002.

PRIMO F. L. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo in vitro de pele humana empregando-se laser de baixa potência e ftalocianina de cloro-alumínio em nanoemulsão**. 169 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2009.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan (R)/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment, ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology***, v. 8, p. 340-347, Jan.2008.

PUSKAS, I.; CSEMPESZ, F. Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes, ***Colloids and Surfaces B-Biointerfaces***, v. 58, p. 218-224, Aug.2007.

RAAB, O. Effect of fluorescent substances on Infusoria, ***Zeitschrift fur Biologie***, v. 39, p. 524-546, 1900.

RAGHAVENDRA, M.; KOREGOL, A.; BHOLA, S. Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics, ***Australian Dental Journal***, v. 54, p. S102-S109, Sept.2009.

RAJEWSKI, R. A.; STELLA, V. J. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .2. In vivo drug delivery, ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 85, p. 1142-1169, Nov.1996.

RAMALDES, G. A.; DEVERRE, J. R.; GROGNET, J. M.; PUISIEUX, F.; FATTAL, E. Use of an enzyme immunoassay for the evaluation of entrapment efficiency and in vitro stability in intestinal fluids of liposomal bovine serum albumin, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 143, p. 1-11, Oct.1996.

RANADE, V. V.; HONLLINGER, M. A. **Drug Delivery Systems**. 2nd. ed. London. CRC Press, 2004, p.1-344.

REINDL, S.; PENZKOFER, A.; GONG, S. H.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R. M.; ABELS, C.; BAUMLER, W. Quantum yield of triplet formation for indocyanine green, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry***, v. 105, p. 65-68, May1997.

ROBERTS, G. W.; HASAN, T. Role of neovascularute and vascular permeability on the tumor retention of photodynamic agents, ***Cancer Research***, v. 52, p. 924-930, 1992.

ROGGE, M. C.; TAFT, D. R. **Preclinical Drug Development**. 2nd. ed. v. 187, North Carolina: Pharmaceutec INc, 2010, p. 1-359

ROSENTHAL, I. Phthalocyanines As Photodynamic Sensitizers, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 53, p. 859-&, June1991.

RUCH, A.; BECK, G.; BACHOR, R.; AKGUN, N.; GSCHWENCE, M. H.; STEINER, R. Dynamic fluorecence changes during photodynamic therapy *in vivo* and *in vitro* of hydrophilic Al(III) phthalocyanine tetrasulphonated and lipophilic Zn(II) phthalocyanine administered in liposomes, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 36, p. 127-133, 1996.

RUSSELL, J. A.; DIAMOND, K. R.; COLLINS, T. J.; TIEDJE, H. F.; HAYWARD, J. E.; FARRELL, T. J.; PATTERSON, M. S.; FANG, Q. Y. Characterization of fluorescence lifetime of Photofrin and delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in living cells using single- and two-photon excitation, ***Journal of Selected Topics in Quantum Electronics***, v. 14, p. 158-166, Jan.2008.

SATO, T.; SUNAMOTO, J. Sites specific liposomes coated with polysaccharides. In: GREGORIADIS, G. **liposome Technology**. 2nd .ed. v.3, 1993. cap.12, 179p.

SAXENA, V.; SADOQI, M.; SHAO, J. Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems, **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 74, p. 29-38, Mar.2004.

SEGOTA, S.; TEZAK, D. Spontaneous formation of vesicles, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 121, p. 51-75, Sept.2006.

SHAH, G. K.; SANG, D. N.; HUGHES, M. S. Verteporfin Combination Regimens in the Treatment of Neovascular Age-Related Macular Degeneration, **Retina-the Journal of Retinal and Vitreous Diseases**, v. 29, p. 133-148, Fev.2009.

SHARMA, S.; DUBE, A.; BOSE, B.; GUPTA, P. K. Pharmacokinetics and phototoxicity of purpurin-18 in human colon carcinoma cells using liposomes as delivery vehicles, **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 57, p. 500-506, Apr.2006.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 507-517, Nov.1999.

SIDOROWICZ, A.; POLA, A.; DOBRYSZYCKI, P. Spectral properties of 3,3'-diethyloxadicyanobenzene included in phospholipid Liposomes, **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 38, p. 94-97, Mar.1997.

SIMIONI, A. R.; MARTINS, O. P.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LIMA, E. C. D.; LACAVA, B. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Cell toxicity studies of albumin-based nanosized magnetic beads, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, p. 2413-2415, Aug.2006.

SIMIONI, A. R.; PELISSON, M. M. M.; BELTRARNE, M.; TEDESCO, A. C. Photophysical and photobiological studies of a silicon tribenzonaphthoporphyrinato incorporated into liposomes for photodynamic therapy use, **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 3208-3215, June.2008.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos, **Química Nova**, v. 25, p. 801-807, Dec.2002.

SMITS, T.; KLEINPENNING, M. M.; VAN ERP, P. E. J.; VAN DE KERKHOF, P. C. M.; GERRITSEN, M. J. P. A placebo-controlled randomized study on the clinical effectiveness, immunohistochemical changes and protoporphyrin IX accumulation in fractionated 5-aminolaevulinic acid-photodynamic therapy in patients with psoriasis, **British Journal of Dermatology**, v. 155, p. 429-436, Aug.2006.

SOFOU, S. Surface-active liposomes for targeted cancer therapy, **Nanomedicine**, v. 2, p. 711-724, Oct.2007.

SOLBAN, N.; SELBO, P. K.; SINHA, A. K.; CHANG, S. K.; HASAN, T. Mechanistic investigation and implications of photodynamic therapy induction of vascular endothelial growth factor in prostate cancer, **Cancer Research**, v. 66, p. 5633-5640, June2006.

SPIKES, J. D. Phthalocyanines As Photosensitizers in Biological-Systems and for the Photodynamic Therapy of Tumors, **Photochemistry and Photobiology**, v. 43, p. 691-699, June1986.

STEENVOORDEN, D. P.; VAN HENEGOUWEN, G. M. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection, **Journal Photochemistry and Photobiology B Biology**, v. 41, p. 1-10, Nov.1997.

STELLA, V. J.; HE, Q. R. Cyclodextrins, **Toxicologic Pathology**, v. 36, p. 30-42, Jan.2008.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. Second generation photodynamic agents: a review, **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 11, p. 233-241, 1993.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy, **Tetrahedron**, v. 54, p. 4151-4202, Apr.1998.

STRAUSS, O. The retinal pigment epithelium in visual function, **Physiological Reviews**, v. 85, p. 845-881, July2005.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1743-1753, July1998.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: Therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 52, p. 1-11, June.2005.

SZOKA, F.; PAPAHAADJOPOULOS, D. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes), **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 9, p. 467-508, 1980.

TAKEMURA, T.; OHTA, N.; NAKAJIMA, S.; SAKATA, I. The Mechanism of Photosensitization in Photodynamic Therapy - Chemiluminescence Caused by Photosensitization of Porphyrins in Saline Containing Human Serum-Albumin, **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, p. 137-140, Jan.1992.

TANDON, Y. K.; YANG, M. F.; BARON, E. D. Role of photodynamic therapy in psoriasis: a brief review, **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 24, p. 222-230, Oct.2008.

TAPAJOS, E. C. C.; LONGO, J. P.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; SANTOS, M. F. M. A.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine, **Oral Oncology**, v. 44, p. 1073-1079, Nov.2008.

TAU, P.; OGUNSIPI, A. O.; MAREE, S. Influence of cyclodextrins on the fluorescence, photoestability and singlet oxygen quantum yields of zinc phthalocyanine and naphthalocyanine complexes, **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 7, p. 439-446, 2003.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4th ed. São Paulo: . Atheneu, 2004, p. 1-720.

TRIESSCHEIJN, M.; BAAS, P.; SCHELLENS, J. H. M.; STEWART, F. A. Photodynamic therapy in oncology, **Oncologist**, v. 11, p. 1034-1044, 2006a.

TRIESSCHEIJN, M.; RUEVEKAMP, M.; ANTONINI, N.; NEERING, H.; STEWART, F. A.; BAAS, P. Optimizing meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin-mediated photodynamic therapy for basal cell carcinoma, **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 1686-1690, Nov.2006b.

TURRO, N. J. **Modern molecular photochemistry**. California: Benjamin in/Cummings Pub.Co, 1978, p. 1-616.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Encapsulation of A Water-Soluble Drug in A Liposome Preparation - Removal of Free Drug by Washing, **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 21, p. 1329-1338, 1995.

VIA, L. D.; MAGNO, S. M. Photochemotherapy in the treatment of cancer, **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 1405-1418, Oct.2001.

VITOLS, S.; ANGELIN, B.; ERICSSON, S.; GAHRTON, G.; JULIUSSON, G.; MASQUELIER, M.; PAUL, C.; PETERSON, C.; RUDLING, M.; SODERBERGREID, K.; TIDEFELT, U. Uptake of Low-Density Lipoproteins by Human Leukemic-Cells In vivo - Relation to Plasma-Lipoprotein Levels and Possible Relevance for Selective Chemotherapy, ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 87, p. 2598-2602, Apr.1990a.

VITOLS, S.; SODERBERGREID, K.; MASQUELIER, M.; SJOSTROM, B.; PETERSON, C. Low-Density-Lipoprotein for Delivery of A Water-Insoluble Alkylating Agent to Malignant-Cells - Invitro and In vivo Studies of A Drug Lipoprotein Complex, ***British Journal of Cancer***, v. 62, p. 724-729, Nov.1990b.

VOSZKA, I.; BUDAI, M.; SZABO, Z.; MAILLARD, P.; CSIK, G.; GROF, P. Interaction of photosensitizers with liposomes containing unsaturated lipid, ***Chemistry and Physics of Lipids***, v. 145, p. 63-71, Fev.2007.

WAGNER, B. D.; JAMES, D. R.; WARE, W. R. Fluorescence Lifetime Distributions in Homotryptophan Derivatives, ***Chemical Physics Letters***, v. 138, p. 181-184, July1987.

WAGNER, S. J.; SKRIPCHENKO, A.; ROBINETTE, D.; FOLEY, J. W.; CINCOTTA, L. Factors affecting virus photoinactivation by a series of phenothiazine dyes, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 67, p. 343-349, Mar.1998.

ZHANG, X. M.; PATEL, A. B.; DE GRAAF, R. A.; BEHAR, K. L. Determination of liposomal encapsulation efficiency using proton NMR spectroscopy, ***Chemistry and Physics of Lipids***, v. 127, p. 113-120, Jan.2004.

ZUCKER, D.; MARCUS, D.; BARENHOLZ, Y.; GOLDBLUM, A. Liposome drugs' loading efficiency: A working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties, ***Journal of Controlled Release***, v. 139, p. 73-80, Oct.2009.