UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudos fotofísicos e fotobiológicos da ftalocianina NzPc e de nanotubos de carbono aplicáveis a processos fotodinâmicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Carolina Bortolatti Vaccari

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Ribeirão Preto
2011

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.

Vaccari, Carolina Bortolatti
Estudos fotofísicos e fotobiológicos da ftalocianina NzPc e de nanotubos de carbono aplicáveis a processos fotodinâmicos.
62 pág.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Tedesco, Antonio Claudio

1.Ftalocianina. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Nanotubos de Carbono.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Bortolatti Vaccari

Estudos fotofísicos e fotobiológicos da ftalocianina NzPc e de nanotubos de carbono aplicáveis a processos fotodinâmicos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Antonio Claudio Tedesco

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico, a minha melhor amiga, melhor companheira, melhor confidente. A pessoa que mais amo nesse mundo, minha mãe.

Agradecimentos

Agradeço a minha família que tanto amo.

Ao meu irmão Vitor Bortolatti Vaccari, por sempre me valorizar a cima das médias, me apoiando incondicionalmente. Valeu Alexandre, INHA!!! Te amo.

A minha avó Maria Enoy M. Bortolatti, por sempre pedir a Deus o melhor caminho.

Ao meu pai Sergio Rosa Vaccari (*In memorian*), que me deixou valorozos ensinamentos. "*Quem não tem competência, não se estabelece*"

A minha irmã Carla Werneck, pela imensa amizade e carinho. Te amo Ca!!

Ao Cláudio M. D. De Souza, pela amizade e companherismo em todos esses anos de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos, Reinaldo Hamaguchi, Gleice Cristina Colombari, Vitor Gardenal R., Juliana Munhoz, Greyce Kelly S. de Alcantara, Luiz Carlos Ferreira , Rute dos Santos, Céli Tagliari, Camila Kammerer, Anelise Fontoura e Juliana S. Alponti, por se tornarem minha família nos anos de graduação e pós-graduação em Ribeirão Preto.

"Eu poderia suportar,embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se moressem todos os meus amigos"

Vinícius de Moraes

As minhas amigas e companheiras de república, Daniela e Flávia, pela paciência e pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas do laboratório de Fotobiologia.

A Dra. Andreza Ribeiro Simioni, por todos os ensinamentos e pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco pelo seu precioso tempo dedicado a minha formação, obrigada por esses anos de convivência e ensinamentos.

A Olimpia, pela sua competência como técnica, por sempre estar disposta a ajudar e pela amizade.

A todos que contribuíram para minha formação e pra realização deste trabalho, mesmo que indiretamente.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”
Jonh F. Kennedy

RESUMO

Vaccari, C. B. **Estudos fotofísicos e fotobiológicos da ftalocianina NzPc e de nanotubos de carbono aplicáveis a processos fotodinâmicos.** 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O câncer de pele, no Brasil, é responsavel por 25% de todos os tipos de câncer. Uma alternativa aos tratamentos usuais é a Terapia Fotodinâmica (TFD). Os processos fotodinâmicos em geral dependem da retenção de um composto fotossensível nos tecidos alvos e posterior irradiação com luz visível em comprimento de onda adequado. Após ativação, o fármaco tranfere energia para outras moléculas do meio, podendo gerar espécies como o oxigênio singlete ($^1O_2$) , radicais livres ($^{\bullet}O_2$,$^{\bullet}OH$) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), essas, são responsáveis pelo processo fotooxidativo e indução da morte celular.

Neste trabalho, o fármaco fotossensível NzPc (uma ftalocianina) foi estudado para verificar se suas características fotofísicas e fotoquímicas são adequadas a TFD, e, em seguida, foi associado a nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) funcionalizados com o tensoativo Pluronic F-127. Esse sistema de liberação de fármaco desenvolvido, foi caracterizado através de ensaios *in vitro* nas linhagens de melanoma de rato B16-F10 e carcinoma humano OSCC .

O sistema NzPc/NTCPM/PF-127 apresentou atividade fotodinâmica superior ao fármaco na forma livre, possibilitando, maior interiorização do fármaco nas linhagens celulares e maior morte celular após irradiação.

Palavras-chave: Ftalocianinas, Terapia Fotodinâmica, Nanotubos de Carbono.

ABSTRACT

Vaccari, C. B. **Studies of photophysical and photobiological of the NzPc phthalocyanine and carbon nanotubes used for photodynamic processes**. 2011. 62 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Skin cancer in Brazil are responsible for 25% of all cancers. An alternative to the usual treatments is photodynamic therapy (PDT). Photodynamic processes in general depend on the retention of a photosensitive compound in target tissues and subsequent irradiation with visible light at an appropriate wavelength. After activation, the drug, transfer energy to other molecules of the medium, which can generate species reactivate such as singlet oxygen ($^1O_2$), free radicals ($O_2^{\bullet}$, $^{\bullet}OH$) and other reactive oxygen species (ROS), these are responsible for photo-oxidative process and induction of cell death.

In this work, NzPc photosensitive drug (a phthalocyanine) was studied to see if their photophysical and photochemical characteristics are suitable for PDT, and then was associated with multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) functionalized with surfactant Pluronic F-127. This drug delivery system developed was characterized by in vitro assay on strains of mouse melanoma B16-F10 and carcinoma human OSCC.

The system presented NzPc/NTCPM/PF-127 photodynamic activity than the drug in the free form, enabling greater internalization of the drug in cell and increased cell death after irradiation.

Keywords: Phtalocyanines, Photodynamic Therapy, Carbon nanotubes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração da pele, mostrando as três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme.....1

Figura 2- Esquema representando simplificadamente a ação da TFD.....3

Figura 3- Diagrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização.....4

Figura 4- Estrutura química do fármaco fotossensibilizador [bis (dimetilaminoetanoxi)] silicone ftalocianina (NzPc).....7

Figura 5- Estrutura básica de (a) um conjunto de nanotubos de parede simples NTCPS; (b) nanotubo de carbomo de parede dupla NTCPD; e, (c) nanotubo de carbono de parede multipla NTCPM.....9

Figura 6- Estrutura química do co-polímero não iônico Pluronic F-127 usado como agente dispersante dos NTC, M.M. = 12.600.....11

Figura 7- Representação esquemática do sistema laser Nd-YAG utilizado em fotólise por pulso de laser.....15

Figura 8- (a) Câmara de Neubauer e (b) esquema dos quadrantes localizados no interior da câmara de Neubauer.....19

Figura 9- Esquema representando o processo de associação do fármaco NzPc e dos NTCPM/PF-127 nas concentrações não citotóxicas pré-estabelecidas. A técnica é chamada de Freeze- Dry pois a solução ápos ser congelada é liofilizada.....24

Figura 10- Espectro de absorção da NzPc livre em tampão Hank's na concentração de 5 μmol/L, banda Soret centrada em 370 nm e um conjunto de bandas Q em 683 nm.....27

Figura 11- Espectro de fluorescência da NzPc livre em tampão Hank's na concentração de 5 μmol/L, excitação fixa em 613 nm e emissão máxima em 690 nm.....27

Figura 12- Diagrama de energia, moléculas no estado fundamental, S^0, são excitadas para estados de maior energia, singlete, decaindo rapidamente para o estado metaestável de menor energia do estado singlete, S^1. O processo radiativo é então detectado em função do tempo de decaimento dos fótons emitidos.....29

Figura 13- Curva de decaimento e ajuste exponencial para a NzPc (5,0 μmol/L) (■) e decaimento da lâmpada (■). O inserto abaixo representa a resíduo médio.....30

Figura 14- Sinal de decaimento do transiente, variação da densidade óptica em função do tempo, obtido através da técnica de fotólise por pulso de laser. NzPc (—) e padrão ZnPC (—), após a excitação em 355nm.....31

Figura 15- Espectro de absorção dos transientes da NzPc (laranja) e da ZnPc (preto) com comprimento de onda de absorção máxima triplete centrada em 480 nm. O fotobranqueamento do estado fundamental está centrado em 350 nm e 680 nm.....33

Figura 16- Porcentagem de células vivas após 3h de incubação com soluções de Pluronic F-127 em tampão Hank's em diferentes concentrações. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de *p < 0,05.....35

Figura 17- Soluções de NTCPM/PF-127 após 2 horas de ultra-sonicação e 30 minutos de repouso em 3 diferentes concentrações, 1: 0,5 mg/mL; 2: 1,0 mg/mL e 3: 1,5 mg/mL. Observa-se que apenas a solução 1 encontra-se totalmente dispersa e homogênea.....36

Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) dos NTCPM na concentração de 0,5 mg/mL. As imagens foram ampliadas em 50.000, 65.000, 100.000 e 150.000 vezes respectivamente. Pode-se observar sua estrutura cilindica com poucos namonetros de diâmetro em relação ao seu extenso comprimento, dispostos na forma de rede entrelaçada.....37

Figura 19- Porcentagem de células vivas após incubar por 3h com varias concentrações do sistema associado NTCPM/PF-127. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de *p < 0,05.....38

Figura 20- Porcentagem de células vivas após incubar por 3h com varias concentrações da NzPc livre em solução. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de *p < 0,05.....39

Figura 21- Representação esquemática de (A) moléculas de fármaco associadas a rede de NTC; (B) moléculas de fármaco ligadas covalentemente as paredes do NTC; e, (C) moléculas de fármaco dentro dos nanocanais dos NTC.....39

Figura 22- Infravermelho do NTCPM/PF-127, podemos observar alguns picos característicos como 3629, 2919, 1653 e 1559 cm^{-1}.....41

Figura 23- Infravermelho da NzPc, podemos observar alguns picos característicos como 1061, 1115, 2890 e 1343 cm^{-1}.....41

Figura 24- Infravermelho do NTCPM/PF-127/NzPc, podemos observar alguns picos característicos do NTCPM e da NzPC, caracterizando uma mistura física sem a formação de ligação química 42

Figura 25- Curva analítica de concentração do fármaco NzPc versos a área do espectro de emissão de fluorescência. Equação da reta: y = 0,1865 + 73,273; R2 = 0,9904. Ao lado, os espectros de emissão de fluorescência da NzPc em tampão Hank's 1% PF-127.....43

Figura 26- Espectros de fluorescência das adições de NTCPM à solução de 2 μg/mL da NzPc em Hank's 1% PF-127. A presença dos NTCPM diminui a intensidade de fluorescência do fármaco NzPc pois dificultam a passagem da luz pela solução. A partir da diferença entre a área do primeiro e do último espectro foi criado um fator de correção da concentração da NzPc quando em presença dos NTCPM.....45
Figura 27 - Porcentagem de células vivas da linhagem B16-F10 após 3 horas de incubação com solução de NzPc na forma livre na concentração de 2μg/mL e posterior irradiação com diferentes doses de energia. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de p< 0,001, valores de alta significância.....47
Figura 28- Porcentagem de células vivas da linhagem OSCC após 3 horas de incubação com solução de NzPc na forma livre na concentração de 2μg/mL e posterior irradiação com diferentes doses de energia. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de p< 0,001, valores de alta significância.....48
Figura 29- Porcentagem de células vivas da linhagem B16-F10 após 3 horas de incubação com o sistema associado de NTCPM/NzPc e posterior irradiação com diferentes doses de energia. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de p< 0,001, valores de alta significância.....49

Figura 30- Porcentagem de células vivas da linhagem OSCC após 3 horas de incubação com o sistema associado de NTCPM/NzPc e posterior irradiação com diferentes doses de energia. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de p< 0,001, valores de alta significância.....49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Rendimento quântico de fluorescência do padrão ZnPc e da NzPc em etanol.....28

Tabela 2- Tempo de vida de fluorescência do singlete (τ^1) e amplitude relativa (A) para o fármaco fotossensibilizador.....30

Tabela 3- Tempo de vida dos estados excitados triplete dos fármacos fotossensibilizadores ZnPc e NzPc medidos no comprimento de onda de absorção máxima triplete de 480 nm. Os transientes foram obtidos por fotólise por pulso de laser após excitação em 355 nm em meio aerado.....32

Tabela 4- Rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi\Delta$) do Feoforbide-a e do fármaco fotossensibilizador NzPc ambos em etanol.....34

Tabela 5- Valores das médias das áreas dos espectros de emissão de fluorescência das amostras, incubadas por 3 horas nas linhagens B16-F10 e OSCC; quantidade em ng/mL de fármaco interiorizado; a concentração real do fármaco interiorizado usando o fator de correção e a porcentagem de incorporação do fármaco.....46

SUMÁRIO

Resumo
Abstract
Lista de figuras
Lista de tabelas

1 Introdução.....1
1.1 Câncer de pele.....1
1.2 Processos Fotodinâmicos.....3
1.3 Os Fármacos Fotossensibilizadores.....6
1.4 Sistemas de liberação de fármaco.....7
1.4.1 Nanotubos de Carbono (NTC).....8
1.4.2 Síntese dos NTC.....9
1.4.3 Funcionalização dos NTC.....10
2. Objetivos.....12
3 Materiais e métodos.....12
3.1 Caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da NzPc....12
3.1.1 Estudos da NzPc no estado estacionári.....12
3.2 Estudos da NzPc resolvida no tempo.....13
3.2.1 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ΦF).....13
3.2.2 Medidas de fluorescência resolvida no tempo: determinação do tempo de vida singlete-singlete (τ_s).....13
3.2.3 Estudos dos estados tripletes por fotólise por pulso de laser.....14
3.2.4 Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete.....16
3.3 Cultura de linhagens celulares tumorogênicas.....17
3.3.1 Linhagem de carcinoma humano OSCC.....17
3.3.2 Linhagem de melanona de rato B16-F10.....18
3.4 Teste de azul de trypan e câmara de Neubauer.....18
3.5 Teste de viabilidade celular MTT.....20
3.6 Citotoxicidade do Pluronic F-127 sobre a linhagem de B16-F10 MTT.....21
3.7 Caracterização dos NTCPM -Funcionalização com Pluronic F-127.....21

3.8 Citotoxicidade NTCPM/PF-127 sobre a linhagem B16-F10.....22
3.9 Citotoxicidade NzPc em solução de Pluronic F-127 sobre a linhagem B16-F10.....23
3.10 Associação da NzPc aos NTCPM/PF-127.....23
3.11 Uptake celular - Quantificação da NzPc por espectrofotometria de fluorescência.....25
3.12 Fototoxicidade em linhagem B16-F10 e OSCC.....25
4 Resultados e Discussão.....26
4.1 Caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da NzPc no estado estacionário.....26
4.2 Caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da NzPc no tempo.....28
4.2.1 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ΦF).....28
4.2.2 Medidas de fluorescência resolvidas no tempo: determinação do tempo de vida singlete-singlete (τ_S).....29
4.2.3 Estado excitado triplete por fotólise de pulso por laser.....31
4.2.4 Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete.....33
4.3 Citotoxicidade do Pluronic F-127 sobre a linhagem de B16-F10.....34
4.4 Caracterização dos NTCPM -Funcionalização com Pluronic F-127.....35
4.5 Citotoxicidade NTCPM/PF-127 sobre a linhagem B16-F10.....37
4.6 Citotoxicidade NzPc em solução de Pluronic F-127 sobre a linhagem B16-F10.....38
4.7 Associação da NzPc aos NTCPM/PF-127 (NTCPM/F-127/NzPc).....39
4.8 Uptake celular - Quantificação da NzPc por espectrofotometria de fluorescência.....43
4.9 Fototoxicidade em linhagem B16-F10 e OSCC.....46
5 Conclusões.....51
6 Referências bibliográficas.....52

1 Introdução

1.1 Câncer de pele

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos de doenças que têm em comum o crescimento desordenado das células. Com a divisão celular ocorrendo rapidamente de forma agressiva e incontrolável, há a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Um tumor benigno é uma massa de células localizadas que se multiplicam de forma menos agressiva e se assemelham ao seu tecido original, raramente costituindo risco de vida.

A pele é o maior órgão do corpo humano e serve de barreira contra ataques físicos, químicos e biológicos. Ela é divida em três camadas histológicas principais: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). O câncer de pele se inicia na epiderme e pode apresentar neoplasias de diferentes linhagens, os mais frequentes são: carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele; o carcinoma epidermóide, com 25% dos casos; e, o melanoma, detectado em 4% dos pacientes. Felizmente, o carcinoma basocelular mais frequente é também o menos agressivo.

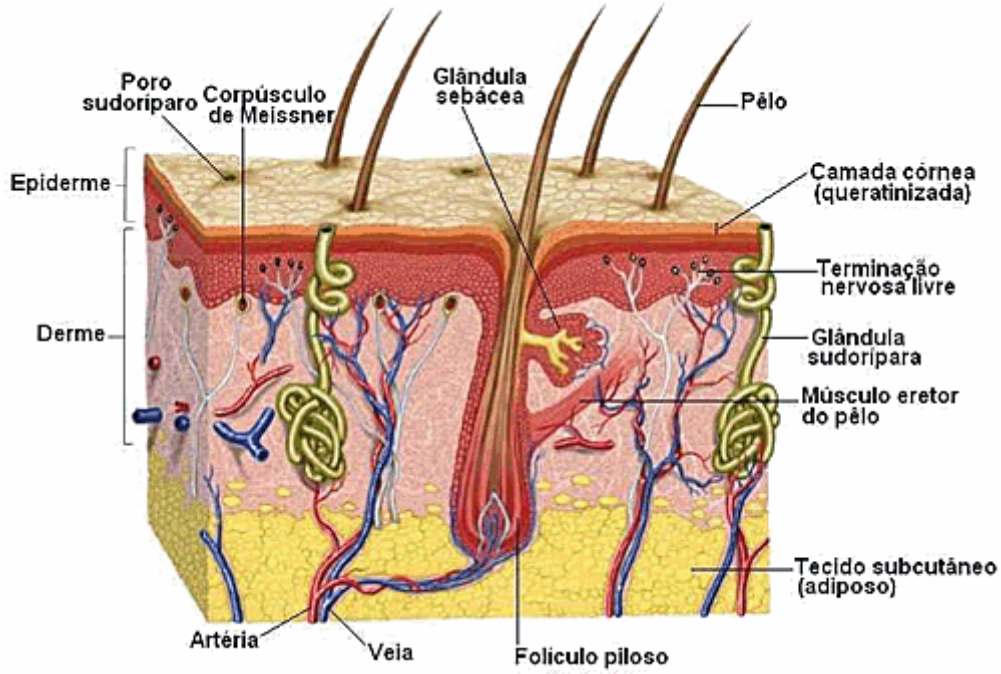

Figura 1- Ilustração da pele, mostrando as três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme.(BEAR e CONNORS, 2002)

O câncer de pele é o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores registrados no país, segundo as estimativas 2010 do Instituto Nacional do Câncer (INCA).

As neoplasias cutâneas estão relacionadas a alguns fatores de risco: químico (arsênico), radiação ionizante, processo irritativo crônico (úlcera de Marjolin), genodermatoses (xeroderma pigmentosum) e, principalmente, à exposição aos raios ultravioletas do sol. Câncer de pele é mais comum em indivíduos com mais de 40 anos, sendo relativamente raro em crianças e negros. Indivíduos de pele clara, sensível à ação dos raios solares, com doenças cutâneas prévias ou que trabalham com exposição direta ao sol são as principais vítimas do câncer de pele. A maior incidência deste tipo de câncer se dá na região da cabeça e do pescoço, que são justamente os locais de exposição direta aos raios solares.

A cirurgia é o tratamento mais indicado, porém, dependendo da extensão, o carcinoma basocelular pode, também, ser tratado através de medicamento tópico ou radioterapia. No caso do carcinoma epidermoide, o tratamento usual é feito basicamente através de procedimento cirúrgico e radioterapia.

A cirurgia, apesar de remover a massa tumoral, é um tratamento apenas para tumores de pequeno e médio porte, mas nem sempre garante que o câncer deixe de se reproduzir e pode, em alguns casos, desfigurar o paciente.

A radioterapia é o tratamento mais utilizado em câncer de pele, nela a radiação ionizante é a responsável pela morte das células cancerosas, entretanto, a pele que recebe radiação, pode sofrer efeitos colaterais como coceira, vermelhidão, irritação, queimaduras e manchas escuras, tornando-se seca e escamosa.

Na quimioterapia, os fármacos quimioterápicos trabalham prejudicando a mitose celular, mas esse dano celular também afeta células normais, levando a vários efeitos colaterais comobaixa contagem de celulas sanguíeas, vômito, diarreia, queda de pelos, fraqueza e desconforto generalizado no paciente.

Uma alternativa de tratamento que visa menos efeitos colaterais é a Terapia Fotodinâmica (TFD) que usa basicamente um fármaco fotossensíbilizador e luz monocromada para matar as células cancerosas.

1.2 Processos Fotodinâmicos

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é designada como terapêutica para o tratamento de câncer desde o começo de 1980 (SCHUITMAKER et al., 1996). Comparado aos tratamentos como cirurgia, radio e quimioterapia, a TFD oferece a vantagem de ser um método eficiente, não-invasivo e que age apenas na destruição dos tecidos doentes sem danificar os tecidos saudáveis ao redor da massa tumoral (DOUGHERTY et al., 1998). A terapêutica já é reconhecida por parte do FDA (U.S. Food and Drug Administration) como uma terapia eficaz para o tratamento de câncer e outras doenças de pele (OLEINICK e EVANS, 1998) (BOEHNCKE et al., 2000).

Essa terapia incide na combinação de dois agentes terapêuticos: (1) um fármaco fotossensibilizador e (2) luz monocromática com comprimento de onda específico, que agem na presença de oxigênio molecular levando à destruição do tecido tumoral (MICHELS e SCHIMIDT-ERFURTH, 2003; MIRONOV et al., 2003; NYMAN e HYNNINEN, 2004) (Figura 2).

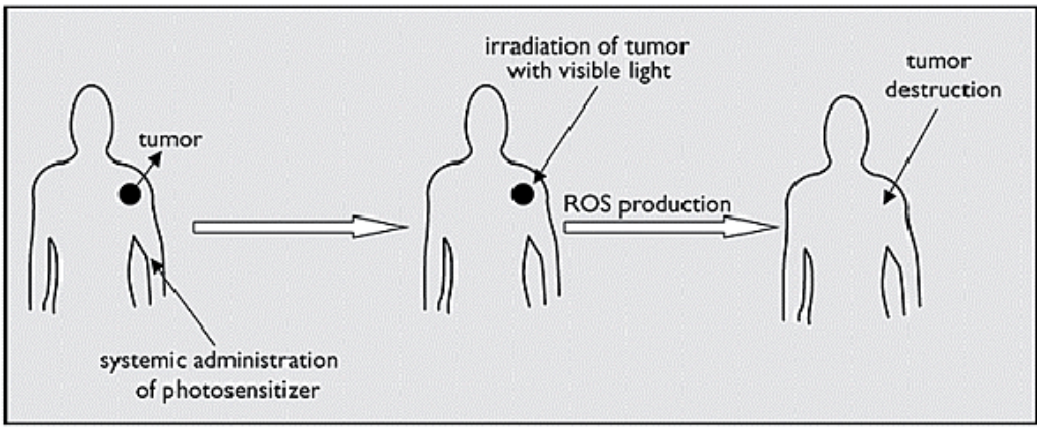

Figura 2- Esquema representando simplificadamente a ação da TFD

Considerando que o principal agente ativador deste processo fotodinâmico é a utilização do fármaco fotossensibilizador, esta molécula deve possuir características físico-químicas, farmacológicas e fotobiológicas que a qualifiquem como bom agente fotossensibilizador para a TFD. (TEDESCO; NUNES; SGUILLA, 2004).

A Terapia Fotodinâmica fundamenta-se na utilização de uma molécula fotossensibilizadora que:

(i) não seja decomposta rapidamente pela luz, evitando assim que a mesma seja destruída antes de efetuar o dano fotodinâmico previsto;

(ii) possua alta afinidade e penetração no tecido doente alvo;

(iii) e, seja fotodinâmicamente eficiente na destruição do tecido tumoral sob ação de baixos níveis de luz visível (STERNBERG et al., 1998).

O objetivo essencial da TFD é induzir uma morte celular do tecido neoplásico por um processo de fotossensibilização do tecido tumoral, minimizando os danos causados aos tecidos vizinhos e os efeitos colaterais indesejáveis no tratamento.

A atividade fotodinâmica do fármaco fotossensíbilizador é baseada nas reações fotooxidativas, que induzem múltiplas e consecutivas alterações bioquímicas e morfológicas no sistema biológico. No diagrama de Jablonski, esquematizado na Figura 3, estão representadas, de forma geral, as etapas fotoquímicas e fotofísicas envolvidas no processo de fotossensibilização da molécula após absorver energia.

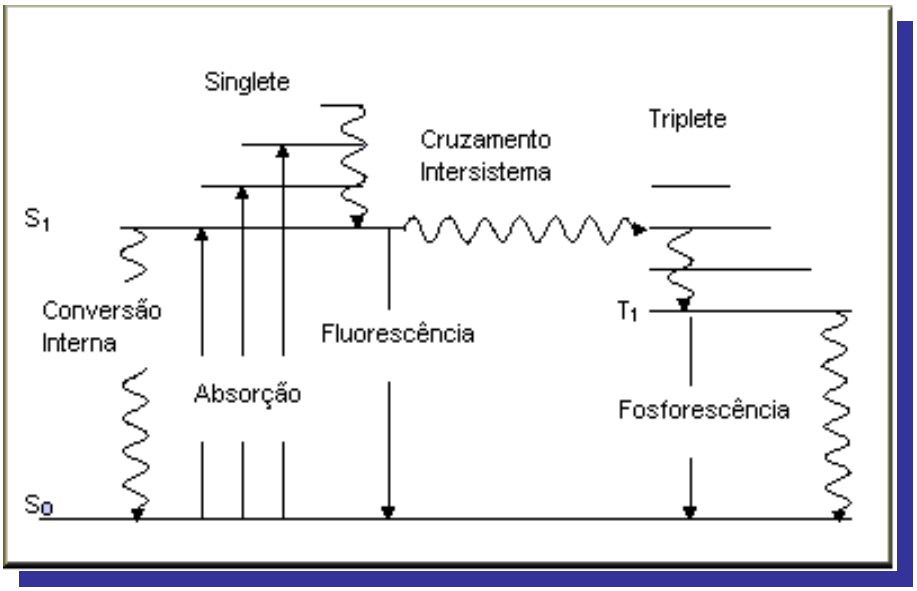

Figura 3- Diagrama de Jablonski para o processo de fotossensibilização

Após a absorção de luz, o fármaco fotossensibilizador, inicialmente no estado fundamental (S_0), é ativado para um estado excitado singlete de vida curta (S_1), podendo retornar ao estado S_0 por um processo radiativo, emitindo um fóton (fluorescência) ou por conversão interna (como perda de energia na forma de calor, que é um processo não radiativo). Ainda no estado excitado S_1, o fármaco fotossensíbilizador pode, por uma inversão de spin via cruzamento intersistema, produzir um estado excitado triplete de tempo vida mais longa (T_1).

O fármaco fotossensibilizador no estado excitado triplete tem uma energia mais baixa do que no estado excitado singlete S_1, porém, apresenta um tempo de vida mais longo, o que aumenta a probabilidade de transferência de energia a outras moléculas, como por exemplo, o oxigênio molecular presente no meio (SOBOLEV et al., 2004).

A principal função do estado excitado singlete S_1 no processo de fotossensibilização é atuar como um bom precursor para o estado excitado triplete T_1, que o é o estado fotoativo (MAREE et al., 2001). No estado fotoativo, o fármaco fotossensibilizador pode transferir sua energia para o oxigênio molecular presente no meio e gerar espécies citotóxicas conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROS = $^1O_2$, $^{\bullet}O_2^-$,$^{\bullet}OH$, H_2O_2). A transferência de energia ocorre por dois mecanismos de reação: mecanismo Tipo I e mecanismo Tipo II.

Reações do Tipo I produzem radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, como ânions superóxidos, radicais hidroxilas, peróxidos de hidrogênio etc, resultantes da transferência de elétrons ou hidrogênios entre a molécula fotossensibilizadora no estado excitado T_1 e outras moléculas biológicas (FOOTE, 1991). As espécies reativas de oxigênio são responsáveis pelo dano irreversível a várias membranas celulares, incluindo a plasmática, a mitocondrial, a lisossomal e a nuclear (KONAN e GURNY, 2002).

Reações do Tipo II envolvem a transferência de energia entre o estado excitado triplete T_1 do fármaco fotossensibilizador e o oxigênio molecular, ocorrendo formação do oxigênio singlete ($^1O_2$), que é a principal espécie citotóxica na TFD. Essa espécie citotóxica pode reagir com substratos biológicos, como oxidação e cicloadição em sítios de elevada densidade eletrônica (colesterol, triptofano, guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídeos insaturados) (NYMAN e HYNNINEN, 2004), levando à interrupção de processos biológicos.

O fármaco fotossensibilizador quando no estado excitado singlete S_1 possui propriedades fluorescentes, podendo também ser usado como sonda de diagnóstico para detectar e localizar a presença de tumores em estados iniciais de desenvolvimento (WITJES et al., 1996).

Um outro processo que o fármaco fotossensibilizador pode sofrer é o de fotobranqueamento, causado por modificações na estrutura molecular da molécula por reações paralelas. No fotobranquemaneto, o produto formado não irá mais absorver luz no comprimento de onda de incidência, deixando assim de exercer sua ação terapêutica (SIMPLICIO; MAIONCHI e HIOKA, 2002).

1.3 Os Fármacos Fotossensibilizadores

Os fármacos fotossensibilizadores, como descrito anteriormente, são os agentes ativos nos processos fotodinâmicos. Essas moléculas apresentam várias propriedades as quais são responsáveis pelo início de uma série de reações fotofísicas e fotoquímicas desencadeadas pela absorção de energia (BATLLE, 1993).

Há disponível vários fármacos fotossensibilizadores, porém um dos mais utilizado e aprovado clinicamente é um derivado da Hematoporfirina (HpD) conhecido comercialmente como Photofrin II (BELLNIER et al., 2003; CHALEIX et al., 2003). Entretanto, esses derivados, chamados de fármacos fotossensibilizadores de primeira geração, apresentaram algumas desvantagens com relação ao seu uso no processo terapêutico. Os derivados da HpD possuem uma baixa seletividade com respeito à incorporação e retenção das células tumorais, causam fotossensibilidade cutânea por algumas semanas e exibem fraca absorção de energia na região do vermelho do espectro eletromagnético (próximo a 600 nm), onde usualmente ocorre a máxima penetração de luz através dos tecidos (JORI, 1996).

Os problemas encontrados com os compostos derivados da HpD levaram ao desenvolvimento de novas moléculas, chamadas de fármacos fotossensibilizadores de segunda e terceira geração, como as ftalocianinas (MARTI et al., 2000), clorinas e bacterioclorinas (GILLIES et al., 1996; ROBERTS, 1988; SPIKES e BOMMER, 1993).

Dentre esses compostos de segunda geração, as ftalocianinas recebem destaque frente aos derivados da HpD por apresentarem diversas vantagens. Elas são eficientes geradoras de oxigênio singlete e possuem um alto coeficiente de absortividade na faixa de 600-800 nm (dentro da Janela Terapêutica), ou seja, dentro da faixa de comprimentos de onda na qual a penetração da luz no tecido é aumentada e não sofre interferência de cromóforos endógenos do próprio sistema biológico (WILSON, 1989), como a hemoglobina que absorve a luz em torno de 500 nm ou o triptofano e outros aminoácidos e proteinas que absorvem na região de 280 nm.

Muitas ftalocianinas têm um elevado nível de hidrofobicidade, propriedade que pode aumentar a afinidade do fármaco fotossensibilizador pelo tecido neoplásico (DOUGHERTY et al., 1998), mas a baixa solubilidade em água limita a manipulação, uma vez que impede sua administração via intravenosa clássica (meio fisiológico). Para superar este problema, substituintes periféricos polares, como carboxilatos, sulfonatos e grupos hidroxilas são

frequentemente adicionados ao macrociclo da ftalocianina (PELISSON et al., 2004; ROTTA et al., 2003; WOHRLE et al., 1999), aumentando sua solubilidade.

Neste estudo, foi usado o fármaco fotossensibilizador [bis (dimetilaminoetanoxi)] silicone ftalocianina (NzPc) (figura 4), uma fitalocianina com substituintes periféricos. A NzPc tem como átomo metálico central, o silício, que apresenta quatro valências, sendo possível assim a inserção de ligantes axias. Esses ligantes aumentam o impedimento estérico das moléculas, diminuindo a agregação molecular e aumentando a solubilidade do fármaco em meio aquoso. A NzPc foi sintetizada pelo grupo do Prof. Dr. Milton Betrami Jr. da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

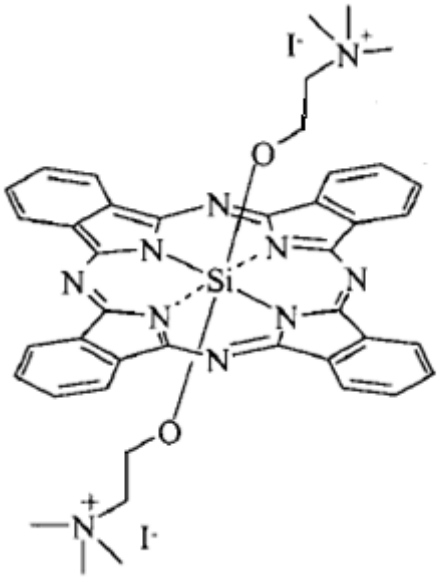

Figura 4- Estrutura química do fármaco fotossensibilizador [bis (dimetilaminoetanoxi)] silicone ftalocianina (NzPc)

1.4 Sistemas de liberação de fármacos

A escolha de um sistema de liberação que tenha afinidade com os tecidos tumorais contribui para a eficiência farmacocinética e fotodinâmica do fármaco quando administrado *in vivo*. O material que compõe o sistema deve ser quimicamente inerte, livre de impurezas, ter uma estrutura física apropriada e ser rapidamente degradada ou escretada do meio biológico .

Atualmente as principais formas farmacêuticas de liberação controlada e/ou sustentada podem ser agrupadas em glóbulos revestidos, matrizes de desintegração lenta, bombas osmóticas (Oros), adesivos transdérmicos, géis, pellets, implantes poliméricos, lipossomas,

micropartículas (microesferas e microcápsulas), nanopartículas (nanoesferas e nanocápsulas) (COUVREUR et al., 1994; CROMMELIN et al., 2002; DAVIS.S.S. et al., 1985) e mais recentemente nanotubos de carbono (TRZASKOWSKI et al., 2006; VERMA e GARG, 2001).

1.4.1 Nanotubos de Carbono (NTC)

Na década passada a descoberta dos nanotubos de carbono (NTC) por Iijima (1991) (IIJIMA, 1991) abriu novas fronteiras para o campo da nanotecnologia e nanociência. A estrutura única, as propriedades mecânicas, físicas, químicas e eletrônicas dos NTC foram inicialmente exploradas pela ciência de materiais. Mais tarde esse novo tipo de nanoestruturas foi combinado com proteínas e produtos naturais, incluindo ácidos nucléicos e polissacarídeos, iniciando assim os estudos de compatibilidade desse sistema com sistemas biológicos (KLUMPP, 2006).

Os NTC pertencem à família dos fulerenos, $C_{60,}$ classificado como uma das três formas alotrópicas do carbono além da grafite e do diamante (LACERDA, 2006). Os NTC são estruturas cilíndricas e ocas formadas por redes de átomos de carbono, sendo que cada carbono esta ligado a três outros carbonos em uma forma hexagonal planar, a extremidade do tubo pode ser aberta ou fechada (MAMALIS et al., 2004).

Os NTC podem ser nanotubos de carbono de parede simples (NTCPS), (figura 5) o qual contem uma única rede de átomos de carbono, podendo ter diâmetro de 0,4 a 2,4 nm; nanotubos de carbono de parede dupla (NTCPD), formados por duas paredes de átomos de carbono concêntricas com diâmetros de 1 a 3,5 nm; ou nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) com várias paredes cilíndricas concêntricas de átomos de carbono com diâmetros externos de 2 a 100 nm (ROSOLEN, 2006; SALVADOR-MORALES, 2006) e diâmetros internos de 1,5 a 15 nm, com uma distância entre as camadas de 0,3 a 0,4 nm.

Os NTCPM têm uma grande proporção entre seu comprimento e seu diâmetro, eles podem ser muito longos com até vários micrômetros e bastantes finos com poucos nanômetros (BIANCO et al., 2005), essa característica confere numa grande área superficial, que influencia na sua biodisponibilidade. Devido ao grande número de camadas concêntricas, a quantidade de defeitos nas paredes dos NTCPM é maior, quando comparado aos outros dois tipos (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008). Assim neste trabalho, é proposto, que a

associação do fármaco fotossensibilizador NzPc ocorra no interior dos nanocanais bem como nos defeitos das paredes dos NTCPM.

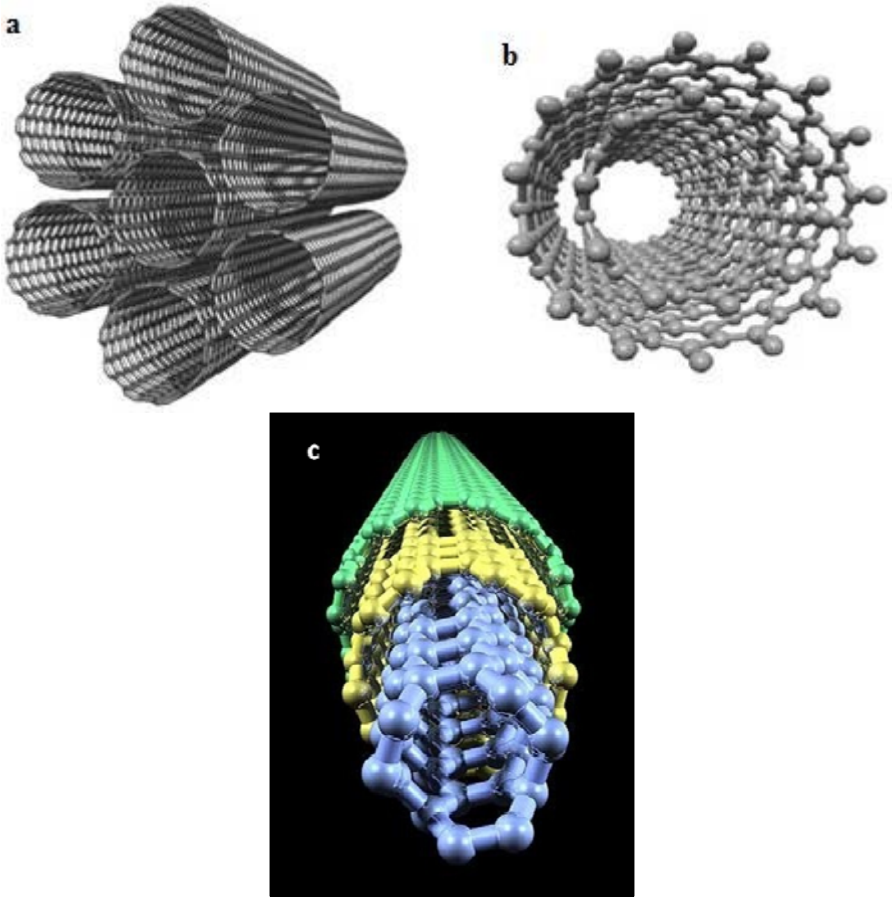

Figura 5- Estrutura básica de (a) um conjunto de nanotubos de parede simples NTCPS; (b) nanotubo de carbomo de parede dupla NTCPD; e, (c) nanotubo de carbono de parede multipla NTCPM

1.4.2 Síntese dos NTC

De forma geral, até o presente há três métodos principais para síntese de NTC:

- Descarga em arco elétrico (Eletric arc discharge – EAD);
- Ablação a laser (Laser ablation – LA);
- Deposição por vapor químico (Chemical vapour deposition – CVD).

O método EAD foi o primeiro a sintetizar NTC entre eletrodos de carbono dentro de um gás nobre, como argônio ou hélio, usando altas temperaturas de 2000-3000°C. O uso de catalisadores (Fe, Co, Ni, Mg) aumentou o rendimento do processo e favoreceu a formação de

NTCPS. O método de Ablação a laser produz nanotubos bem alinhados, usando temperaturas mais baixas, entre 1100-1200°C, nessa técnica as condições de crescimento são mantidas constantes resultando em NTC de diâmetro bastante uniforme, a desvantagem deste método é que ele requer lasers de alto custo. O método CVD é capaz de controlar o crescimento dos nanotubos sobre um substrato, bem como, produzir uma grande quantidade dos mesmos, o que o torna interessante para aplicação em escala industrial. Nesse processo uma mistura de gases hidrocarbonetos (acetileno, metano ou etileno) e nitrogênio são introduzidos numa câmara de reação. A decomposição dos hidrocarbonetos através da pirólise forma os NTC em temperatura entre 700-900°C e em pressão atmosférica. Catalisadores como Fe, Co e Ni são usados para diminuir a temperatura de pirólise, tendo essa técnica a importante vantagem de trabalhar em temperaturas mais baixas comparada com os outros métodos (HIRSCH, 2002; MAMALIS et al., 2004)

O passo seguinte à produção dos NTC é a purificação do material obtido, uma vez que, impurezas como carbono amorfo, nanopartículas metálicas e fulerenos são comuns em nanotubos recém fabricados. Os principais processos de purificação disponíveis atualmente são: separação física (filtração, centrifugação e cromatografia); oxidação em fase gasosa (mistura de ar, O_2, Cl_2 em 300-600°C); e, oxidação em fase aquosa (soluções ácidas de HNO_3 ou misturas H_2SO_4/HNO_3 ou $H_2SO_4/KMnO_4$). NTC de alta pureza são essenciais para a aplicação ou estudos dos mesmos, sobretudo em meio biológico (GEORGAKILAS et al., 2002; MONTORO e ROSOLEN, 2006).

1.4.3 Funcionalização dos NTC

Várias aplicações biológicas dos NTC foram propostas nos últimos anos, o maior desafio para a introdução dos nanotubos no campo na biotecnologia é a insolubilidade e baixa biocompatibilidade desse novo material em meio biológico, contudo a utilização recente da modificação química -a funcionalização- dos NTC têm tornado possível solubilizar e dispersar esse material em meio aquoso (LACERDA, 2006; LIN, 2004).

Os NTC são insolúveis em praticamente todos os tipos de solventes, essa insolubilidade é devida à fortes interações de Van Der Waals entre os tubos, mantendo-os agrupados com interação mútua, dificultando assim sua manipulação e caracterização analítica e biológica (LACERDA, 2006; MARTIN e KOHLI, 2003; TAGMATARCHIS e PRATO, 2004).

A funcionalização dos NTC pode ser feita por dois métodos básicos: a funcionalização covalente e a funcionalização não-covalente.

Na funcionalização covalente, os NTC se tornam solúveis devido às modificações químicas em sua estrutura orgânica. Essas modificações podem ser feitas nas paredes laterais e/ou nas extremidades dos tubos. Grupos funcionais são ligados aos nanotubos por tratamento oxidativo, usando ácidos fortes e reações orgânicas de adição e/ou substituição (RAMANATHAN, 2005).

A funcionalização não-covalente utiliza tensoativos como SDS (dodecilsufato de sódio), SDSA (dodecilsulfonato de sódio), SDBS (dodecilbenzenosulfonato de sódio), polímeros ou biopolímeros em procedimentos de impacto físico como ultrassonicação, centrifugação e filtração. Esses métodos preservam a estrutura química dos nanotubos, não modificando as características mecânica e eletrônica da superfície aromática, além de fornecerem a energia suficiente para superar as forças de Van Der Waals existentes entre os NTC, diminuindo assim sua agregação. A dispersão em tensoativos não iônicos é proporcional ao tamanho da cadeia alquílica, assim, quanto maior o peso molecular do tensoativo, melhor é a dispersão dos NTC. Tensoativos são rotineiramente incorporados às formulações farmacêuticas para melhorar os sistemas de liberação, dessa forma nesse estudo usaremos o co-polímero não iônico Pluronic F-127 (figura 6), disponível comercialmente, como agente dispersante dos NTC (PETROV, 2003).

O Pluronic F-127 (PF-127) (PEO_{99}-PPO_{67}-PEO_{99} – M.M. = 12.600) é o mais amplamente estudado devido a suas longas cadeias carbônicas laterais e apropriada relação entre n/m (99/67 = 1,47). Esta composição química do PF-127 assegura uma boa solubilidade em água através do grande conteúdo de PEO e alta capacidade de interação hidrofóbica dos longos blocos de PPO formando uma ampla rede polimérica capaz de modular a liberação (sustentada e/ou controlada) de fármacos (YUEN et al., 2008).

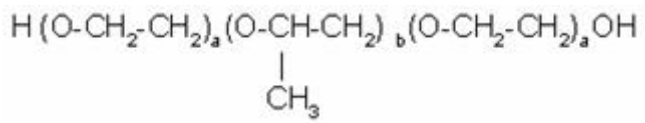

Figura 6- Estrutura química do co-polímero não iônico Pluronic F-127 usado como agente dispersante dos NTC, M.M. = 12.600

Uma das propriedades mais relevantes dos NTC é sua grande área superficial, essa característica influência diretamente na sua biodisponibilidade em sistemas biológicos. Com o

aumento da sua solubilidade, após a funcionalização com surfactante, a interação dos NTC com o meio celular se torna maior. O caráter hidrofobico das paredes e a grande área superficial dos NTC fazem com que esse possa aproximar-se e transpor as paredes proteicas das células (GOGOTSI et al., 2002), e assim, os NTC tornam-se potenciais carreadores de moléculas.

2 Objetivos

Com base nos princípios apresentados, os objetivos deste trabalho são:

• caracterizar as propriedades fotofísicas e fotoquímicas do fármaco [bis (dimetilaminoetanoxi)] silicone ftalocianina (NzPc);

• funcionalizar os NTCPM com o co-polimero Pluronic F-127 (NTCPM/PF-127);

• viabilizar a biocompatibilidade dos NTCPM em sistema biológico, utilizando a linhagem B16-F10 de melanoma de rato;

• associar o fármaco NzPc aos NTCPM funcionalizados (NTCPM/PF-127/NzPc);

• realizar estudos de up-take celular *in vitro* a partir do fármaco NzPc na forma livre e dos NTCPM/PF-127/NzPc com as linhagens B16-F10 de melanoma de rato e carcinoma humano OSCC;

• realizar estudos fotobiológicos *in vitro* a partir da NzPc livre e dos NTCPM/PF-127/NzPc com as linhagens B16-F10 de melanoma de rato e carcinoma humano OSCC.

3 Materiais e Métodos

3.1 Caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da NzPc

3.1.1 Estudos da NzPc no estado estacionário

Todos os experimentos de caracterização fotoquímica e fotofísica, no estado estacionário, foram realizados com uma solução de NzPc 5μmol/L em meio tamponado (tampão Hank's pH 7.4) com 1% de Pluronic F-127 , que é a concentração ideal para os estudos biológicos, que será demonstrado no ítem 4.3.

As medidas de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro de absorção UV/visível, modelo Lambda 20 Perkin Elmer, da Hitachi na faixa entre 300 e 800 nm.

As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro F4500 da Hitachi, na faixa entre 650 e 800 nm, fendas de 5,0/5,0, com excitação fixa em 613 nm.

3.2 Estudos da NzPc resolvida no tempo

3.2.1 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) foi determinado para o fármaco fotossensibilizador NzPc utilizando uma solução de zinco ftalocianina (ZnPc) em meio orgânico (etanol) como padrão, com uma absorbância constante na faixa de 0,04, de modo a minimizar o efeito filtro (BONNETT et al., 1999) (LAKOWICZ, 1999).

O método relativo descrito por (EATON, 1988) utiliza a área dos espectros corrigidos de emissão de fluorescência do padrão de ZnPc (Φ_F = 0,28, λ_{exc}= 614 nm) na faixa de 650 – 850 nm e da amostra NzPc para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência. Os cálculos foram realizados com base na seguinte equação descrita por Demas e Crosby (DEMAS;CROSBY, 1971):

$$\Phi_F = [(A_x/A_p)\cdot(DO_p/DO_x)\cdot(n_p^2/n_x^2)]\cdot\Phi_p \qquad (1)$$

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

3.2.2 Medidas de fluorescência resolvida no tempo: determinação do tempo de vida singlete-singlete (τ_s)

O tempo de vida de fluorescência do fármaco fotossensibilizador foi obtido pela técnica de contagem múltipla de fótons. Em celas de quartzo de 1 cm, foram adicionadas alíquotas de 3,0 mL de soluções etanólicas contendo os fármacos fotossensibilizadores ZnPc (padrão) e a NzPc. O comprimento de onda de excitação e de emissão utilizados foram determinados pelos estudos de absorbância e fluorescência no estado fotoestacionário.

A fluorescência resolvida no tempo foi realizada utilizando-se como fonte de excitação um diodo laser que irradia em estado sólido ($Nd:YVO_4$ - Millenia Xs - Spectra Physics) passando depois por um cristal dobrador de frequência e o feixe final, com potência máxima de 10 W e comprimento de onda 532 nm. Este equipamento produz uma irradiação laser de titânio-safira (Tsunami - Spectra Physics). O cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz, com agitação e temperatura contínua.

As curvas de decaimento de fluorescência foram analisadas utilizando-se o software operacional do próprio equipamento. Os ajustes foram validados através do valor mínimo na função chi-quadrado (χ^2). Este estudo foi realizado com o auxílio do Laboratório de Biofísica Molecular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto –Universidade de São Paulo (FFCLRP/USP), o qual é coordenado pelo Prof. Dr. Amando Siuiti Ito.

3.2.3 Estudos dos estados tripletes por fotólise por pulso de laser

O método de fotólise por pulso de laser consiste na excitação de uma amostra por um pulso de luz de alta intensidade (laser). Essa alta intensidade de luz promove uma grande população de moléculas do estado fundamental para os estados excitados singletes superiores. Após um segundo disparo de laser, as moléculas que se encontram no estado excitado singlete sofrem o cruzamento intersistema para um estado excitado triplete. Intermediários (ou espécies transientes), de vida curta, são formados. Esses intermediários podem ser radicais peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e/ou radical superóxido ($O_2^{\cdot}$) e/ou hidroxila ($^{\cdot}OH$).

O estudo determina a cinética de decaimento do transiente (tempo de vida do transiente) e o monitoramento da mudança da absorção ou da emissão da amostra é feito em um período de tempo de micro ou milesegundos, começando imediatamente após o segundo pulso do laser.

Para o fármaco fotossensibilizador estudado, utilizou-se como fonte de excitação, o terceiro harmônico do laser Nd-YAG (355 nm) modelo SURELITE I-10 do Continuum (Figura 7). A energia média utilizada foi da ordem de 30 mJ/cm^2, através de uma fenda de 5,0 mm de diâmetro. A uma distância de 10,0 cm da fenda do laser, foi posicionado um suporte termostatizável para celas com agitação magnética (Hellmam CUV-O-Stir). A intensidade de luz foi determinada antes e após o conjunto de pulsos por um “Power Meter” (Field Master da Coherent), usando uma cabeça de detecção LM-30 V, posicionada 5,0 cm a partir do suporte

para celas. Os sinais dos transientes gerados foram detectados por uma fotomultiplicadora R928P, Hamamatsu, transferidos para um osciloscópio digital TDS 340 A, Tektronix com o software Gem, Edinburgh Analytical Instruments.

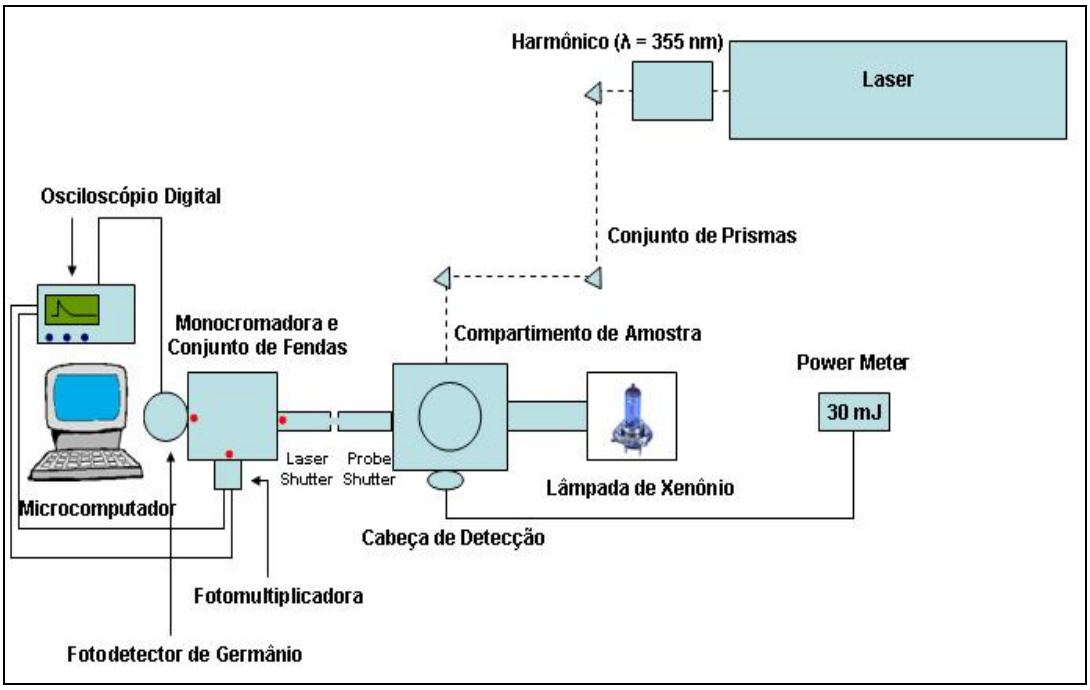

Figura 7- Representação esquemática do sistema laser Nd-YAG utilizado em fotólise por pulso de laser (PRIMO, F. L., 2006)

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

O espectro de absorção do transiente foi registrado ponto a ponto, em intervalos de 10,0 nm na faixa de comprimento de onda de 310 a 800 nm, com 3 "tiros" de laser para cada ponto com excitação do laser em 355 nm e 650 nm. As solucões das amostras foram trocadas a cada 30 nm para se evitar a degradação e fotobranqueamento.

O espectro de absorção do transiente gerado pela fotólise por pulso de laser não fornece um valor absoluto para a absorbância, obtem-se a diferença da absorção do fármaco fotossensibilizador no estado fundamental (chamado genericamente de precursor) para o transiente formado. O espectro de absorção do transiente é dependente da concentração do fármaco fotossensibilizador no estado fundamental, assim uma valor negativo de absorbância indica a formação de um intermediário com uma absortividade menor que a do precursor.

3.2.4 Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete

Para a detecção de oxigênio singlete, o sinal de emissão de fosforescência deste foi identificado em 1270 nm, utilizando-se um detector de germânio da North Coast Scientific Corporation, modelo 823A. Para eliminar qualquer emissão abaixo de 900 nm, a emissão de fosforescência do oxigênio singlete foi detectada em ângulo reto com o feixe de excitação, utilizando-se um filtro de silício na entrada do detector de análise.

Os sinais dos transientes gerados e do oxigênio singlete foram detectados por um osciloscópio digital (Tektronix modelo TDS 340A), transferido para um computador compatível e, então, processado e analisado utilizando o software operacional do próprio instrumento.

Utilizou-se o método direto (BAUTISTA-SANCHEZ et al., 2005) para determinação do tempo de vida (τ_Δ) e o rendimento quântico de produção do oxigênio singlete (Φ_Δ) gerado pelo fármaco fotossensibilizador NzPc. O valor Φ_Δ foi obtido relativamente ao feoforbide-a em etanol (Φ_Δ = 0,59), que é usado como composto padrão devido sua capacidade de transferir energia eficientemente para o oxigênio molecular ($^3O_2$) formando oxigênio singlete $^1O_2$ (DEROSA e CRUTCHLEY, 2002).

A relação entre a intensidade de fosforescência do oxigênio singlete produzido pelo composto de referência e pelo fármaco fotossensibilizador é dada pela equação 2 (SPILLER, 1998).

$$\mathbf{\Phi_\Delta = (I / I_{ref}) \,.\, \Phi_{\Delta ref} \,.\, (\tau_{\Delta ref} / \tau_\Delta)} \qquad \mathbf{(2)}$$

Onde I e I_{ref} são as intensidades de fosforescência da amostra e do composto de referência, respectivamente; τ_Δ e $\tau_{\Delta ref}$ são os tempos de vida do oxigênio singlete da amostra e do composto de referência, respectivamente; e, Φ_Δ e $\Phi_{\Delta ref}$ é o rendimento quântico de oxigênio singlete da amostra e do composto de referência, respectivamente.

As soluções, padrão e NzPc foram saturadas com O_2 durante 30 minutos em cubetas de quartzo com os quatro lados transparentes . Para a cinética foi usado a janela de tempo de 1μs para todas as soluções.

3.3 Cultura de linhagens celulares tumorogênicas

3.3.1 Linhagem de carcinoma humano OSCC

A linhagem de carcinoma humano OSCC foi cultivada em atmosfera úmida com 5% CO_2 a 37°C, em meio de cultura Dubleco Eagle's Minimum Essential Médium (DMEM-Gibco Vida Tecnologias, Eragny, França) contendo 100 U/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina (Gibco), 2.5 ug/mL de anfotericina (Gibco), 200 μmol/L de glutamina (Gibco) constituindo uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular, agindo como uma solução nutritiva (HASINA et al., 2003; PEREIRA et al., 2009). Esse meio é destinado à cultura de células humanas e de outros animais.

Ao final da adição de todos os componentes, esse meio foi filtrado, utilizando-se uma membrana de 0,22 μm em capela de fluxo e posteriormente distribuído em garrafas de vidro estéreis, contendo cada uma 90,0 mL de DMEM, sendo que, antes da sua utilização, o meio de cultura foi enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL).

A solução de soro fetal bovino foi pré-aquecida a 56ºC, para inativação das enzimas. Em seguida, estocou-se em frascos de 150 mL e conservou-se no freezer a -20ºC. O soro fetal bovino apresenta em sua composição básica a albumina, insulina, hormônios e vários outras substâncias indispensáveis ao crescimento celular.

As células foram cultivadas até atingirem a fase logarítmica de crescimento ($1,5 \times 10^6$ células/mL ,confluência), retiradas das garrafas de cultura (Corning Incorporated, estéril, 25 cm^2) com solução de tripsina (0,05%), EDTA (0,53 mmol/L) (Invitrogen) em tampão PBS 1X (NaCl 140 mmol/L, KCl 3 mmol/L, Na_2HPO_4 4,3 mmol/L, KH_2PO_4 1,4 mmol/L) e então submetidas à centrifugação em 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com 2 mL de meio de cultura, as células foram, então, distribuidas em duas novas garrafas de 75 cm^2 estéreis. O meio foi trocado de duas a três vezes por semana para a manutenção das condições biológicas na cultura celular. Sempre que a garrafa encontrava-se no estado de confluência celular ou preparava-se uma nova subcultura ou a congelava.

No processo de congelamento as células foram lavadas com o tampão Hank's 10X, retiradas da garrafas com solução de tripsina e posteriormente adicionadas a tubos criogênicos contendo uma solução de SFB e DMSO (dimetil-sulfóxido) (80/20) em uma proporção final de 1:1 v/v.

Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados com n = 3, sendo cada n referente a uma placa de 96 poços.

3.3.2 Linhagem de melanona de rato B16-F10

A linhagem melanocítica B16-F10 proveniente de camundongos C57BL – 6J altamente tumorogênica e com capacidade metastática (FIDLER, 1973) foi cultivada em atmosfera úmida com 5% CO_2 a 37°C, em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen), pH 6.9, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Cultilab), L-glutamina 2 mmol/L, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, HEPES 10 mmol/L, penicilina G (10.000 U/mL), estreptomicina (10.000 μg/mL) e anfotericina (25 μg/mL) (Invitrogen). As células foram cultivadas até atingirem a fase logarítmica de crescimento (1,5 x 10^6 células/mL ,confluência), retiradas das garrafas de cultura (Corning Incorporated, estéril, 25 cm^2) com soluçãoo de tripsina (0,05%), EDTA (0,53 mmol/L) (Invitrogen) em tampão PBS 1X (NaCl 140 mmol/L, KCl 3 mmol/L, Na_2HPO_4 4,3 mmol/L, KH_2PO_4 1,4 mmol/L) e então submetidas à centrifugação em 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com 2 mL de meio de cultura, as células foram, então, distribuidas em duas novas garrafas de 75 cm^2 estéreis. O meio foi trocado de duas a três vezes por semana para a manutenção das condições biológicas na cultura celular.

Sempre que a garrafa encontrava-se no estado de confluência celular ou preparava-se uma nova subcultura ou a congelava. No processo de congelamento as células foram lavadas com tampão Hank's 10X, retiradas da garrafas com solução de tripsina e posteriormente adicionadas a tubos criogênicos contendo uma solução de SBF e DMSO (dimetil-sulfóxido) (80/20) em uma proporção final de 1:1 v/v.

Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados com n = 3, sendo cada n referente a uma placa de 96 poços.

3.4 Teste de azul de trypan e câmara de Neubauer

O azul de trypan é uma molécula de grande peso molecular que, em solução aquosa (tampão PBS) tem a coloração azul, em meio biológico ela apresenta grande afinidade pela parede citoplasmática. Quando uma cultura celular na presença de azul de trypan é observada através do microscópio, pode-se diferenciar as células que têm a membrana celular intacta, das

células mortas. As células vivas em perfeito estado devem ser observadas de forma incolor, enquanto as células com rompimento de membrana devem apresentar a cor azul. Para a contagem do número de células vivas, usa-se a câmara de Neubauer acoplada ao micoscópio.

A câmara de Neubauer (Figura 8a), em seu interior, possui o desenho de uma grade composta por 4 quadrantes localizados em cada extremidade (Figura 8b), sendo que cada quadrante possui 0,1 mm^3 de volume, essa medida padronizada possibilita a quantificação da suspensão celular. É feita a média aritmética do número de células dos 4 quadrantes e em seguida multiplicada pela diluição inicial e por 1 x 10^4/mL que é a ordem de grandeza da câmara.

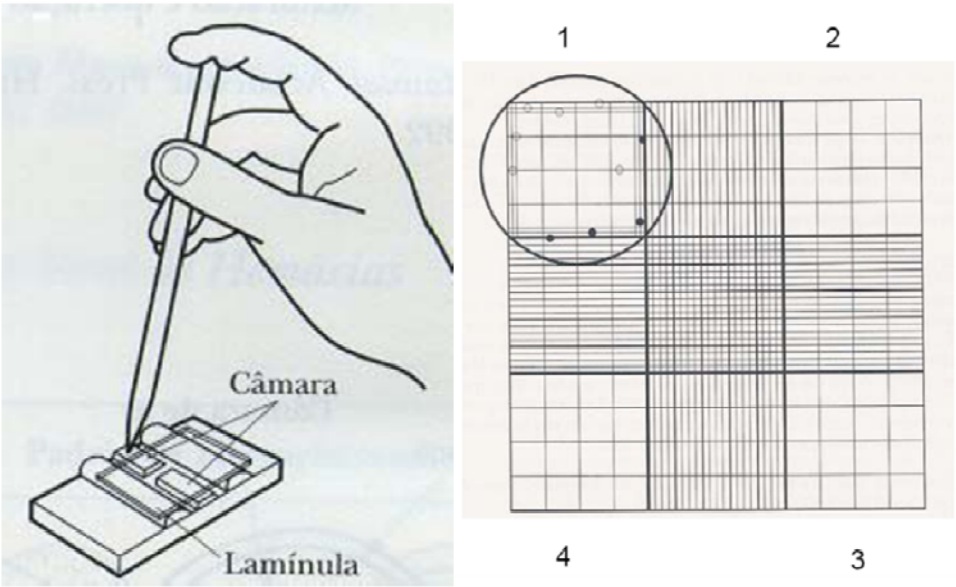

Figura 8- (a) Câmara de Neubauer e (b) esquema dos quadrantes localizados no interior da câmara de Neubauer

$$\text{n° de células/mL} = \frac{\text{n° total de células}}{\text{n° de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \qquad (3)$$

Usando a câmara de Neubauer, para que se alcance a precisão da contagem de células, a diluição total deve permitir uma contagem de 20 a 200 células totais, entre vivas e mortas, por quadrante (GARETH, 1996).

A partir dessa quantificação, pode-se plaquear as células em placa de poços múltiplos com um número desejável de células por poço, sendo 20.000 células por poço em placas de 96 poços e 100.000 células por poço em placas de 24 poços.

3.5 Teste de viabilidade celular MTT

Para um resultado confiável, simples e reprodutível, usa-se o método MTT. Este ensaio determina espectrofotometricamente o número total de células, com a função da atividade mitocondrial intacta (células vivas).

O componente chave é o corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) ou MTT. Soluções de MTT são de cor amarelada, quando dissolvidas em meio de cultura sem indicador vermelho de fenol ou em soluções tampão.

A dehidrogenase mitocondrial das células vivas atuam sobre o anel tetrazolium do MTT, produzindo cristais de formazam de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa. Após retirada a solução aquosa do poço, com uma seringa, os cristais são dissolvidos com a adição de isopropanol acidificado. O produto obtido é monitorado espectrofotometricamente em 560 e 690 nm através de um sistema SAFIRE II (TECAN) de análise de multiplaca. O aumento ou a diminuição do número de células nos poços, resulta em uma mudança concomitante na concentração do formazan, assim em relação ao controle, obtem-se o grau de citotoxicidade (MOSMANN, 1983; VISTICA et al., 1991).

Esse ensaio de citotoxicidade *in vitro* é bem estabelecido para o uso com placas de poços múltiplos. Para melhores resultados, devem ser empregadas as células na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não deve exceder $1{,}0 \times 10^6$ células/mL. Cada ensaio deve incluir um controle (branco), contendo meio de cultura completo nas células.

Inicialmente, as células foram removidas da incubadora, sendo levadas à capela de fluxo laminar e distribuídas nas placas de poços múltiplos. A estas células foi adicionado a solução de MTT 1,0 mg/mL, a cultura foi re-encubada por 4 horas. Após o período de incubação, as células foram removidas da estufa de CO_2 e os cristais de formazam resultantes solubilizados em solução de isopropanol foram avaliados por espectroscopia. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem relativa às células controle.

3.6 Citotoxicidade do Pluronic F-127 sobre a linhagem de B16-F10 MTT

O Pluronic F-127 é um tensoativo sólido de peso molecular 12.600 (Sigma). Sua citotoxicidade foi estabelecida *in vitro* através do ensaio colorimétrico de viabilidade celular-MTT.

As células B16-F10 foram plaqueadas em 3 placas de 96 poços (n = 3). Em cada poço, após contagem na câmara de Neubauer, foram plaqueadas 20.000 células.

A linhagem foi incubada por 3 horas em soluções de tampão Hank's com 1%, 3%, 5%, 7% e 10% de Pluronic F-127 em meio de cultura RPMI com 3% de SFB.

Usou-se a concentração de 3% de SFB para a incubação porque o SFB é rico em albumina, que tem um grande número de sítios de ligações em sua estrutura, os quais poderiam se ligar à substância incubada, interferindo na interiorização da mesma na célula.

Após 3h de incubação, as células foram retiradas da incubadora, levadas à capela de fluxo laminar, lavadas com tampão Hank's e então adicionou-se o meio de cultura RPMI com 10% de SFB.

No dia seguinte, a essas células, adicionou-se a solução de MTT 1,0 $mg.mL^{-1}$ e a cultura foi então re-incubada por 4 horas seguindo o protocolo apresentado no item 3.5.

Todos os estudos biológicos *in vitro* foram realizados em triplicata (n = 3); os valores apresentados são as médias dos valores de cada n. O teste de validação utilizado foi o One-Way ANOVA e Tukey com $p < 0,05$.

3.7 Caracterização dos NTCPM -Funcionalização com Pluronic F-127

Os nanotubos de carbono foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Prof Dr. José Mauricio Rosolen do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP, colaborador deste projeto de pesquisa.

O Prof. Dr. José Mauricio Rosolen disponibilizou 4 tipos de NTC diferentes, após alguns testes preliminares de citotoxicidade e solubilidade, foi selecionado os NTC do tipo parede multipla (NTCPM) para esse estudo.

Alguns testes preliminares de citotoxicidade na linhagem B16-F10 foram realizados com os NTCPM, seguindo o protocolo celular de cultivo, incubação com as amostras e quantificação por MTT, esses testes confirmaram alguns resultados encontrados na literatura: a alta citotoxicidade dos NTC (SON, 2006) (LIU et al., 2009). Para minimizar esse efeito

citotóxico, os NTC passaram por tratamento oxidativo com ácidos fortes (H_2SO_4/HNO_3) (RAMANATHAN, 2005) eliminando impurezas como carbono amorfo, nanopartículas metálicas e fulerenos.

No tratamento oxidativo os NTCPM foram lavados, em funil a vácuo, 3 vezes com uma mistura de ácidos H_2SO_4 e HNO_3 ; 3 vezes com água ultra pura e secos em dissecardor por 48 horas.

Após o tratamento oxidativo, os NTCPM foram funcionalizados em solução 1% de Pluronic F-127, segundo método descrito por Monteiro-Riviere *et al*. (MONTEIRO-RIVIERE, 2005b). Durante 2 horas três diferentes concentrações de NTCPM (0,5; 1,0 e 1,5 mg/mL) foram ultra-sonicadas, ultrasom Branson modelo 2210, em solução de PF-127 a 1%, em seguida essas dispersões foram mantidas em repouso por 30 minutos, e, então, avaliadas pela observação macroscópica.

3.8 Citotoxicidade NTCPM/PF-127 sobre a linhagem B16-F10

A citotoxicidade dos NTC é um parâmetro muito estudado (HELLAND et al., 2007; MULLER et al., 2008a; MULLER et al., 2008b; SHVEDOVA et al., 2003) e um dos mais importantes na sua caracterização em meio biológico. Nesse experimento varias faixas de concentração de NTCPM foram avaliadas sobre a linhagem B16-F10.

A citotoxicidade dos NTCPM funcionalizados com Pluronic F-127 (NTCPM/PF-127) foi avaliada pelo ensaio de MTT já descrito no item 3.5.

As células B16-F10 foram plaqueadas em 3 placas de 96 poços (n = 3). Em cada poço, após contagem na câmara de Neubauer, foram plaqueadas 20.000 células.

Soluções de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 μg/mL de NTCPM/F-127 em tampão Hank's foram incubadas na linhagem de B16-F10 por 3 horas, em meio de cultura a 3% de SFB e após 24 horas incubadas com solução de MTT.

Todos os estudos biológicos *in vitro* foram realizados em triplicata (n = 3); os valores apresentados são as médias dos valores de cada n. O teste de validação utilizado foi o One-Way ANOVA e Tukey com $p < 0,05$.

3.9 Citotoxicidade NzPc em solução de Pluronic F-127 sobre a linhagem B16-F10

A citotoxicidade da NzPc em solução PF-127 a 1% foi avaliada pelo metodo de MTT já descrito no item 3.5.

As células B16-F10 foram plaqueadas em 3 placas de 96 poços (n = 3). Em cada poço, após contagem na câmara de Neubauer, foram plaqueadas 20.000 células.

Soluções de 2, 3, 4, 5, 7, 10 e 14 μg/mL de NzPc/PF-127 em tampão Hank's foram incubadas em linhagem de B16-F10 por 3 horas, em meio de cultura a 3% de SFB e após 24 horas incubadas com solução de MTT.

Todos os estudos biológicos *in vitro* foram realizados em triplicata (n = 3); os valores apresentados são as médias dos valores de cada n. O teste de validação utilizado foi o One-Way ANOVA e Tukey com $p < 0,05$.

3.10 Associação da NzPc aos NTCPM/PF-127

Estabelicidas as concentrações não citotóxicas do fármaco fotossensibilizador NzPc e dos NTCPM funcionalizados com PF-127, apresentadas nos ítens 4.7 e 4.8, foi realizada a associação não covalente (LIU et al., 2005) da NzPc com os NTCPM/F-127 utilizando a técnica de Freeze-Dry (Figura 9).

O fármaco fotossensibilizador foi adicionado à solução de NTCPM/PF-127 em tampão Hank's e permaneceram sob agitação durante 24 horas, com temperatura controlada. Em seguida a solução foi congelada em freezer -70°C por 4 horas e, então, liofilizada por 6 horas.

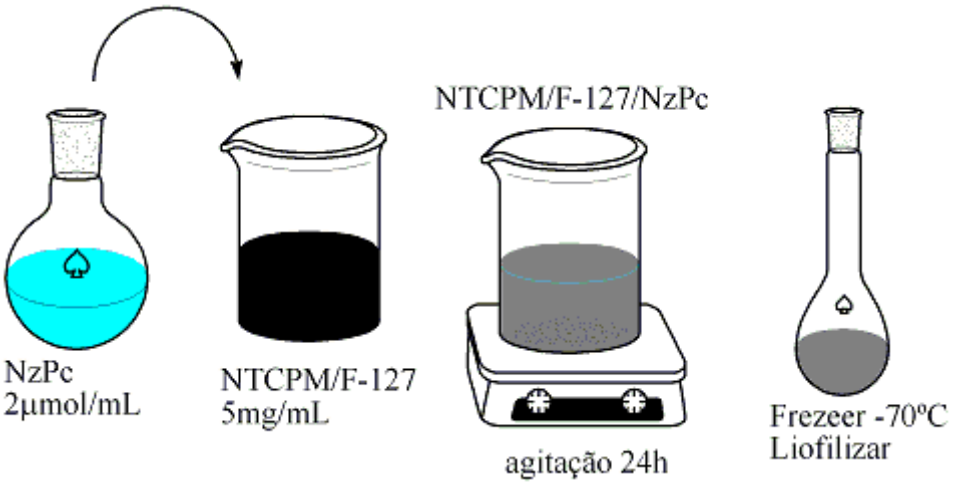

Figura 9- Esquema representando o processo de associação do fármaco NzPc e dos NTCPM/PF-127 nas concentrações não citotóxicas pré-estabelecidas. A técnica é chamada de Freeze- Dry pois a solução ápos ser congelada é liofilizada

Espectros de infravermelho da NzPc, dos NTCPM/PF-127 e do novo sistema carreador produzido foram realizados e comparados.

A associação do fármaco as NTC so foi conseguida com sucesso ápos a realização de outros dois experimentos que não obtiveram éxito. A proposta inicial deste trabalho era associar o fármaco no interior dos NTC, de forma que esses, canalizassem o fármaco para o interior das células quando em meio biológico. Partindo desse princípio e de alguns resultados encontrados em literatura (GOGOTSI et al., 2002) o primeiro experimento realizado para a associação foi utilizando uma autoclave. Com o aumento da pressão sobre uma solução de fármaco e NTCPM/PF-127, e a propriedade de capilaridade dos NTC o fármaco poderia alojar-se dentro dos canais dos NTC. Entretanto as autoclaves disponíveis no laboratório de Fotobiologia são automáticas e as funções pressão e temperatura não são ajustáveis separadamentente. Com pressões em torno de 5 psi a autoclave atinge 88ºC, a essa temperatura ocorre uma degradação térmica do fármaco. Em estudo realizado separadamente observou-se através da emissão de fluorescência que a estabilidade térmica da NzPc ocorre até 72ºC.

O segundo experimento alavancou a proposta do método de Frezeer-Dry. Uma solução da NzPc e dos NTCPM/PF-127 ficou em agitação por 24 horas, com temperatura controlada. Com a agitação, as moléculas do fármaco colidem com os NTC e podem alojar-se tanto no seu interior como nos defeitos das paredes multiplas, ocorrendo a associação. Entretanto após 5 dias observou-se que a solução não apresentava as mesmas características,

parte dos NTCPM haviam precipitado e o fármaco solubilizado no sobrenadante começava a se degradar.

3.11 Uptake celular - Quantificação da NzPc intracelular por espectrofotometria de fluorescência

O estudo de uptake celular é fundamental para a análise da eficiência fotodinâmica do fármaco e do sistema de liberação desenvolvido. Nesse estudo, quantifica-se o quanto de fármaco incubado realmente interiorizou-se nas células, pois, é o fármaco intracelular que, após irradiado, irá realizar o dano fotodinâmico.

Seguindo o protocolo de incubação das linhagens B16-F10 e OSCC, o fármaco NzPc na forma livre em tampão Hank's 1% PF-127 e o sistema de liberação desenvolvido NzPc/NTCPM/PF-127 foram incubados, separadamente, por 3 horas nas concentrações não citotóxicas (2 μg/mL da NzPc e 5 μg/mL dos NTCPM/PF-127/NzPc) em cada uma das culturas celulares.

Após 3 horas de incubação as células foram lavadas 3 vezes com tampão Hank's para garantir a eliminação de fármaco e NTCPM que não interiorizaram nas células. A quantificação do fármaco interiorizado foi feita através da sua propriedade de fluorescência. A lise celular foi realizada com ultrasom, durante 5 minutos as placas com as culturas celulares foram sonicadas com potência de 70 W, em seguida foram analizadas em microscópio, evidenciando a lise celular completa.

Para a quantificação do fármaco NzPc no estudo de uptake celular, foi feito uma curva analítica de concentração do fármaco versos a área do espectro de fluorescência. Sucessivas diluições de uma solução de NzPc em tampão Hank's 1% PF-127 foram realizadas, e para cada diluição tirou-se um espectro de emissão fluorescência, com excitação fixa em 613 nm e fendas de 5,0/5,0 nm.

3.12 Fototoxicidade em linhagem B16-F10 e OSCC

Nos experimentos de fototoxicidade, as culturas celulares foram preparadas seguindo os protocolos apresentados nos ítens 3.3.1 e 3.3.2.

As células B16-F10 e OSCC foram plaqueadas em 3 placas de 24 poços (n = 3). Em cada poço, após contagem na câmara de Neubauer, foram plaqueadas 100.000 células.

O primeiro ensaio de fototoxicidade foi realizado com o fármaco fotossensibilizador. Na concentração não citotóxica (2 μmol/L) o fármaco NzPc na forma livre, em tampão Hank's, foi incubado por 3 horas nas linhagens de B16-F10 e OSCC, em triplicata, para avaliação do efeito dose-dependente. Após o periodo de incubação as células foram tratadas com luz visível. O laser contínuo utilizado foi o sistema Eagle da Quantum Tech operado em 650 nm com potência máxima de 1W. O ensaio de MTT foi realizado 24 horas após a irradiação. Foi utilizado como controle, células incubadas com o fármaco fotossensíbilizador na concentração não citotóxica na ausência de irradiação.

O segundo ensaio de fototoxicidade foi realizado com o sistema carreador desenvolvido, NTCPM/PF-127/NzPc. Na concentração não citotóxica (5 μg/mL de NTCPM) o sistema foi incubado por 3 horas nas linhagens de B16-F10 e OSCC, em triplicata, para avaliação do efeito dose-dependente. Após o periodo de incubação as células foram tratadas com luz visível e após 24 horas realizado o ensaio de MTT.

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da NzPc no estado estacionário

Uma das características básicas de uma molécula a ser utilizada como fármaco fotossensibilizador em TFD está relacionada diretamente com sua absorção na chamada "janela terapêutica", faixa de comprimento de onda situada entre 600 e 800 nm, região de máxima penetração da luz nos tecidos.

As propriedades fotofísicas no estado estacionário do fármaco NzPc livre, foram obtidas utilizando-se a concentração de 5μmol/L em meio tamponado (LO et al., 2003). Seu espectro de absorção possui banda Soret centrada em 370 nm e um conjunto de bandas Q em 683 nm, Figura 10.

O coeficiênte de absortividade molar (ε) foi calculado através da Lei de Lambert-Beer (equação 4), usando soluções diluidas consecutivamente a partir da solução de 5μmol/L de NzPc. A absorbância foi medida no comprimento de onda máximo de absorção, 683 nm, e o valor encontrado para o ε foi de 7,3 x 10^4.

$$\mathbf{A_{683} = \varepsilon \times c \times b} \qquad \mathbf{(4)}$$

Onde A_{683} é a absorção da NzPc em 683 nm; ε é o coeficiênte de absortividade molar da NzPc; c é a concentração do analíto (NzPc); e, b o comprimento do caminho óptico em cm.

A emissão de fluorescência foi medida entre 650 e 800 nm, fendas de 5,0/5,0 nm, com excitação fixa em 613 nm e emissão máxima em 690 nm figura 11.

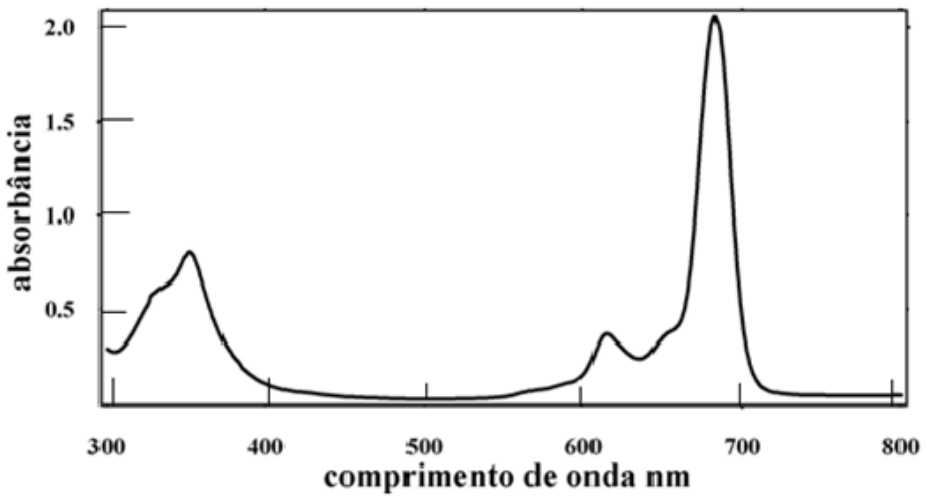

Figura 10- Espectro de absorção da NzPc livre em tampão Hank's na concentração de 5 μmol/L, banda Soret centrada em 370 nm e um conjunto de bandas Q em 683 nm

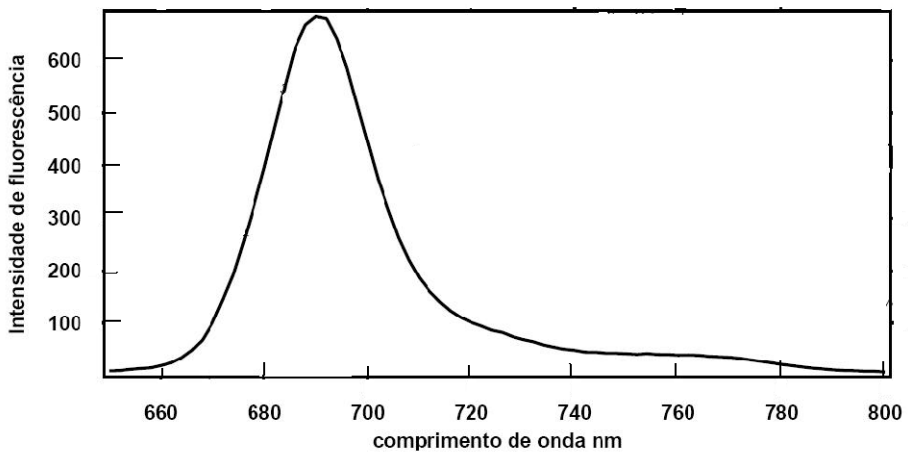

Figura 11- Espectro de fluorescência da NzPc livre em tampão Hank's na concentração de 5 μmol/L, excitação fixa em 613 nm e emissão máxima em 690 nm

4.2 Caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas da NzPc no tempo

4.2.1 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)

Para a determinação do rendimento quântico de fluorescência, a ZnPc (Zinco-Ftalocianina) em EtOH (etanol) foi adotada como padrão, uma vez que tal composto apresenta suas propriedades bem caracterizadas na literatura (NUNES, 2004).

Fixando a absorbância em 613 nm a DO padrão ZnPc é de 413,3 e a DO da NzPc é de 399,6. O índice de refração do meio, etanol, é de 1,359 e o rendimento quântico de flourescência do padrão Φ_p é 0,28, a área do espectro foi calculada pelo software. Com a equação 1 apresentada no item 3.2.1 o rendimento quântico de fluorescência do fármaco NzPc foi calculado e está apresentado na tabela a seguir.

Tabela 1- Rendimento quântico de fluorescência do padrão ZnPc e da NzPc em etanol

Fámaco fotossensibilizador	**Rendimento quântico Φ_F**
ZnPc	0,28
NzPc	0,30

Pode-se observar que o rendimento quântico de fluorescência da NzPc em relação à ZnPc é muito próximo. Compostos altamente fluorescentes usualmente são pouco eficientes para a TFD, pois um baixo rendimento quântico de fluorescência pode implicar em um alto rendimento quântico de produção do estado excitado triplete, de onde se originam os processos de fotossensibilização celular.

Os baixos valores de Φ_F encontrados indicam que pode estar ocorrendo competições entre os processos radiativos de fluorescência, de desativação por conversão interna e principalmente cruzamento intersistema entre o estado excitado singlete S_1 e o estado excitado triplete T_1.

Como a NzPc apresenta uma baixa velocidade de conversão interna podemos supor que o baixo rendimento quântico de fluorescência apresentado pode ser um indicativo de uma maior taxa de cruzamento intersistema e consequentemente de uma maior formação dos estados excitados triplete, o que levaria a uma melhora na atividade fotodinâmica deste fármaco fotossensibilizador devido à maior probabilidade de transferência de energia através

dos processos de fotossensibilização Tipo I (formação de espécies reativas de oxigênio, os EROS) e Tipo II (formação de oxigênio singlete, $^1O_2$).

4.2.2 Medidas de fluorescência resolvidas no tempo: determinação do tempo de vida singlete-singlete (τ_s)

O tempo de vida singlete de uma substância fluorescente representa o tempo médio que essa molécula permanece no estado excitado S_1 antes de retornar ao estado fundamental S_0 (DEPAOLI, 2002). Um espectro de emissão de fluorescência resolvida no tempo fornece informações sobre o comportamento das moléculas, a frequência de colisões com agentes supressores, como o oxigênio e a velocidade de transferência de energia, envolvendo reações dos estados excitados.

Um dos métodos utilizados para medir os decaimentos de fluorescência é a contagem simples de fótons (PHILLIPS, 1984). Esse método é baseado no princípio de que as moléculas são excitadas por um flash de luz e passam para um maior nível de energia decaindo rapidamente para um estado metaestável de energia que é o mais baixo estado excitado singlete. O estado metaestável caracteriza uma inversão de população, pois concentra mais moléculas no estado excitado do que no estado fundamental.

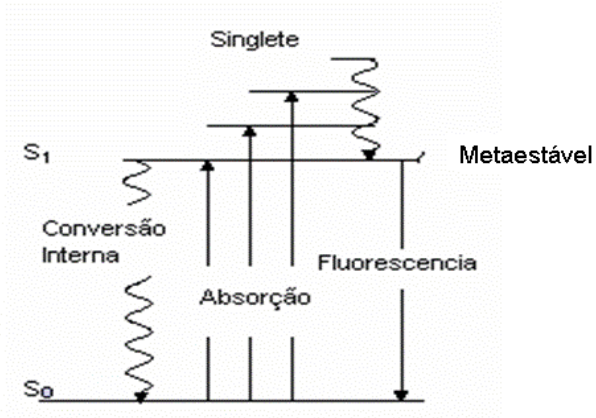

Figura 12- Diagrama de energia, moléculas no estado fundamental, S_0, são excitadas para estados de maior energia, singlete, decaindo rapidamente para o estado metaestável de menor energia do estado singlete, S_1. O processo radiativo é então detectado em função do tempo de decaimento dos fótons emitidos

O sistema consegue detectar o número de fótons que passam do estado excitado para o estado fundamental pelo processo radiativo por unidade de tempo, sendo que o tempo de chegada reflete o decaimento resolvido no tempo. A distribuição dos tempos de chegada de cada fóton é representada por um histograma que traduz a curva de decaimento (Figura 13). A tabela 2 mostra os tempos de vida de fluorescência do singlete.

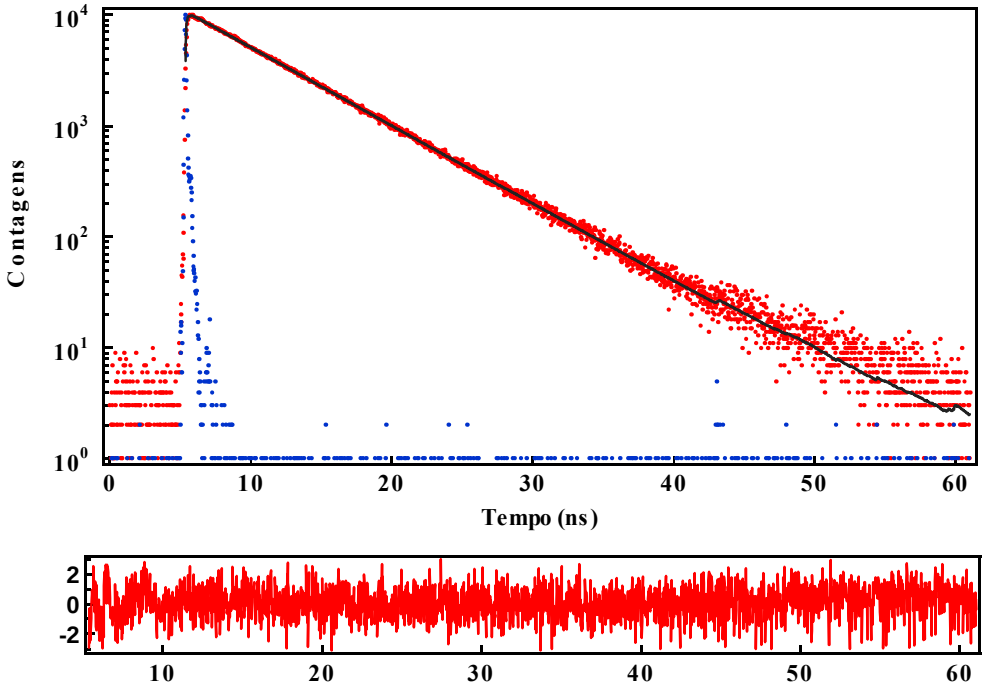

Figura 13- Curva de decaimento e ajuste exponencial para a NzPc (5,0 μmol/L) (■) e decaimento da lâmpada (■). O inserto abaixo representa a resíduo médio

Tabela 2- Tempo de vida de fluorescência do singlete (τ_1) e amplitude relativa (A) para o fármaco fotossensibilizador

Fármaco fotossensibilizador	τ_s (ns)	A_1 (%)
ZnPc	4,00	100,0
NzPc	6,16	100,0

A NzPc apresentou uma cinética tipicamente monoexponencial, indicando uma única população do fármaco no estado singlete, este comportamento também é observado para a NzPC e outros fármacos fotossensíveis adequados a TFD (SIBATA et al., 2004).

4.2.3 Estado excitado triplete por fotólise de pulso por laser

Seguindo a caracterização fotoquímica e fotofísica da NzPc, foram realizados experimentos para determinar o estado excitado triplete em meio orgânico. Estas medidas compreendem a formação da espécie transiente triplete a partir de excitação laser em 355 nm e posteriormente aquisição e tratamento do decaimento exponencial para estudo da cinética do estado excitado.

Para identificação do transiente triplete típico desta classe de compostos, utilizou-se como referência a ZnPc em etanol espectroscópico (GROFCSIK, 2004).

As amostras foram preparadas de modo que sua concentração molar tenha uma absorbância mínima de 0,3 no comprimento de onda de excitação.

Os decaimentos para os transientes obtidos estão apresentados na figura 14 a seguir.

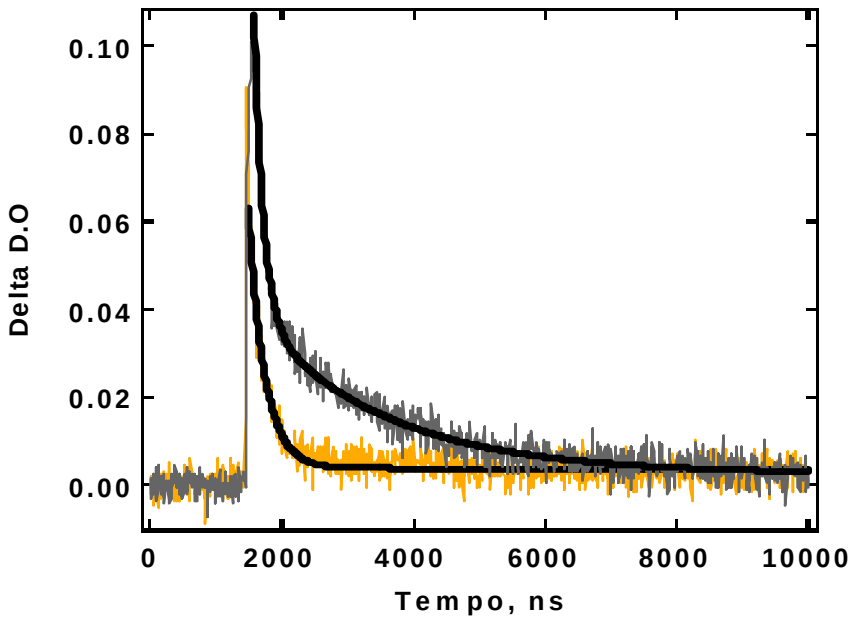

Figura 14- Sinal de decaimento do transiente, variação da densidade óptica em função do tempo, obtido através da técnica de fotólise por pulso de laser. NzPc (—) e padrão ZnPC (—), após a excitação em 355nm

O cálculo de ajuste realizado pelo software do equipamento apresentou um decaimento ajustado por uma função bi-exponencial para NzPc, pressupondo populações distintas no estado excitado triplete com tempos de vida de desativação diferentes. O tempo de vida encontrado para o padrão ZnPc teve um ajuste mono exponencial (OLIVEIRA, D. M., 2006). Os valores estão na tabela 3 abaixo.

Tabela 3- Tempo de vida dos estados excitados triplete dos fármacos fotossensibilizadores ZnPc e NzPc medidos no comprimento de onda de absorção máxima triplete de 480 nm. Os transientes foram obtidos por fotólise por pulso de laser após excitação em 355 nm em meio aerado

Fármaco fotossensibilizador	Tempo de vida τ_1(μs)	A (%)	Tempo de vida τ_2 (μs)	A (%)
ZnPc	0,25	100,0	-------	------
NzPc	0,15	25,32	2,0	74,68

Com base nestes resultados tem-se que o fármaco NzPc apresenta uma espécie de desativação rápida de 0,15 μs, e uma outra espécie de tempo de vida mais longa de 2,0 μs. A vantagem de duas populações é que o fármaco pode transferir energia mais eficientemente para o oxigênio molecular, levando a uma maior produção de oxigênio singlete.

A eficiência fotodinâmica do fármaco fotossensibilizador é extremamente dependente do rendimento quântico e do tempo de vida do estado excitado triplete (FOOTE, 1991). Portanto quanto maior o tempo de vida do estado excitado triplete do fármaco, maior é a probabilidade do fármaco transferir energia para o oxigênio molecular do meio e, consequentemente, haver uma maior produção de oxigênio singlete.

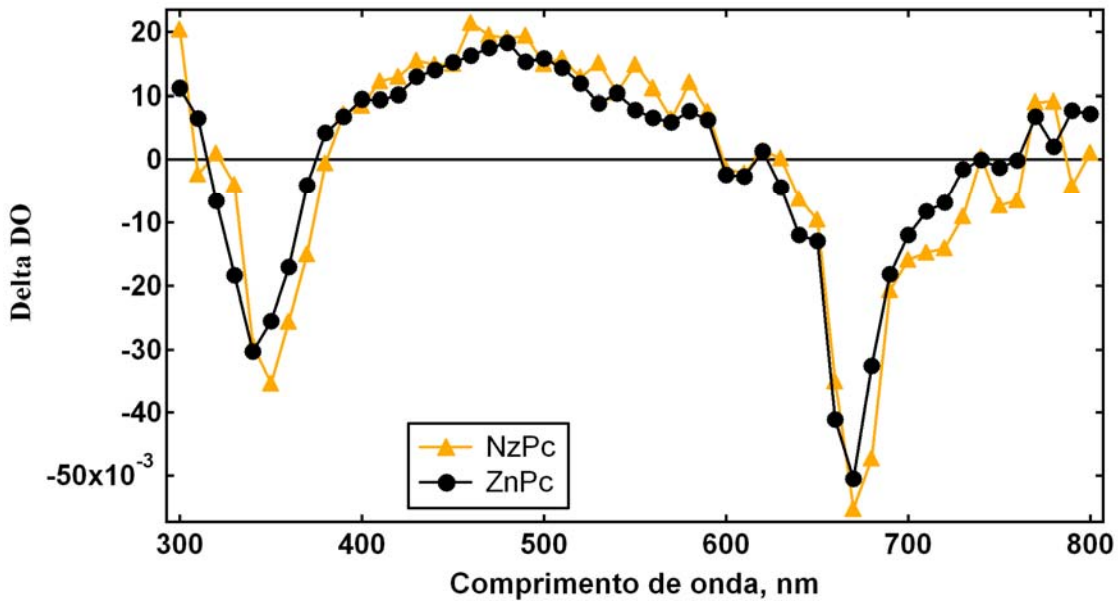

Figura 15- Espectro de absorção dos transientes da NzPc (laranja) e da ZnPc (preto) com comprimento de onda de absorção máxima triplete centrada em 480 nm. O fotobranqueamento do estado fundamental está centrado em 350 nm e 680 nm

O espectro de absorção do estado excitado triplete mostra a absorção máxima do transiente triplete em 480 nm (região visível do espectro eletromagnético) e a região onde ocorre o fotobranqueamento no estado fundamental, que é a região que o fármaco fotossensibilizador perde absorção por causa da radiação visível (BONNETT et al., 1999).

Comparando o espectro de absorção da NzPc (Figura 15) no estado excitado triplete com o espectro de absorção na NzPc (Figura 10) apresentado no item 4.1, observa-se que o fotobranqueamento ocorre justamente nas bandas Soret e Q, confirmando a baixa taxa de absorção de fótons pela espécie transiente nesses comprimentos de onda.

4.2.4 Determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete

A partir da determinação deste rendimento quântico podemos analisar a produção da principal espécie reativa responsável pela destruição celular, o oxigênio singlete. Esta espécie reativa em conjunto com outras espécies radicalares são responsáveis por uma série de processos foto-oxidativos que ocorrem diretamente em substratos celulares e outros sítios endógenos, conduzindo a morte celular através de fenômenos apoptóticos e/ou necróticos.

O rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) foi determinado para o fármaco fotossensibilizador NzPc em ambiente saturado com $O_{2(g)}$ grau espectroscópico. Foi usado

como padrão uma solução etanólica de Feoforbide-a 10,0 μmol/L, uma substância que possue elevado potencial de produção da espécie radicalar (Φ_Δ = 0,59 em etanol), conforme descrito por DeRosa (DEROSA e CRUTCHLEY, 2002).

A partir dos ajustes exponenciais para cada decaimento de fosforêscencia, foi possível determinar por extrapolação a intensidade máxima de emissão para cada amostra.

Os valores de rendimento quântico de oxigênio singlete produzido estão apresentados na tabela 4 a seguir.

Tabela 4- Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) do Feoforbide-a e do fármaco fotossensibilizador NzPc ambos em etanol

Composto	Φ_Δ
Feoforbide-a	0,59
NzPc	0,73

As interações intermoleculares entre os anéis da ftalocianina levam a uma diminuição da atividade fotodinâmica devido ao aumento na probabilidade de decaimento não radiativo do estado excitado. Entretanto, os substituintes nas posições axiais previnem a associação ou agregação dos anéis do macrociclo, resultando em um alto rendimento quântico de oxigênio singlete (MAREE et al., 2001).

4.3 Citotoxicidade do Pluronic F-127 sobre a linhagem de B16-F10

Após a caracterização do fármaco iniciou-se os ensaios de citotoxicidade de todos os componentes do sitemas proposto, estabelecendo, então, as concentrações não citotoxicas para a formulação final.

Baseado no tabalho de (MONTEIRO-RIVIERE, 2005) varias concentrações de Pluronic F-127 foram incubadas em linhagem B16-F10 como descrito no item 3.4. Os resultados estão representados na figura 16 e mostram as porcentagens de células vivas após serem incubadas por 3h com o surfactante. Estabeleceu-se então que a concentração de 1% de Pluronic F-127 em tampão Hank's é a menos citotoxica para linhagem B16-F10.

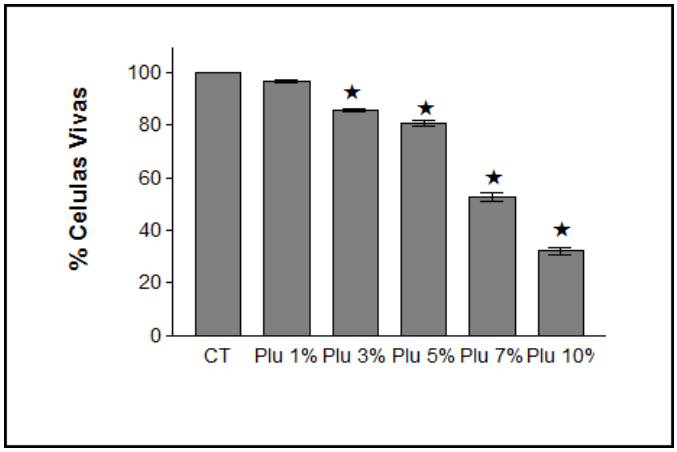

Figura 16- Porcentagem de células vivas após 3h de incubação com soluções de Pluronic F-127 em tampão Hank's em diferentes concentrações. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de *$p < 0,05$

4.4 Caracterização dos NTCPM -Funcionalização com Pluronic F-127

Os NTCPM foram funcionalizados não covalentemente com solução de tampão Hank's 1% Pluronic F-127. Concentrações diferentes de NTCPM (0,5 mg/mL; 1,0 mg/mL e 1,5 mg/mL) foram adicionadas as solucões tampão Hank's 1% Pluronic e ultra-sonicadas por 2 horas, sua avaliação foi feita macroscopicamente após 30 minutos de repouso (Figura 17).

Através da observação macroscopica a solução de 0,5 mg/mL apresentou-se homogênea e melhor dispersa, enquanto que as soluções de 1,0 e 1,5 mg/mL apresentaram-se mais agregadas e com corpo de fundo. A solução de 0,5 mg/mL foi então avaliada pela técnica de microscopica eletrônica de varredura com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (MEV-FEG) figura 18. Observa-se pela figura 18 a grande proporção entre o diâmetro e o comprimento dos NTCPM, caracterizando sua grande área superficial (ARNOLD et al., 2005).

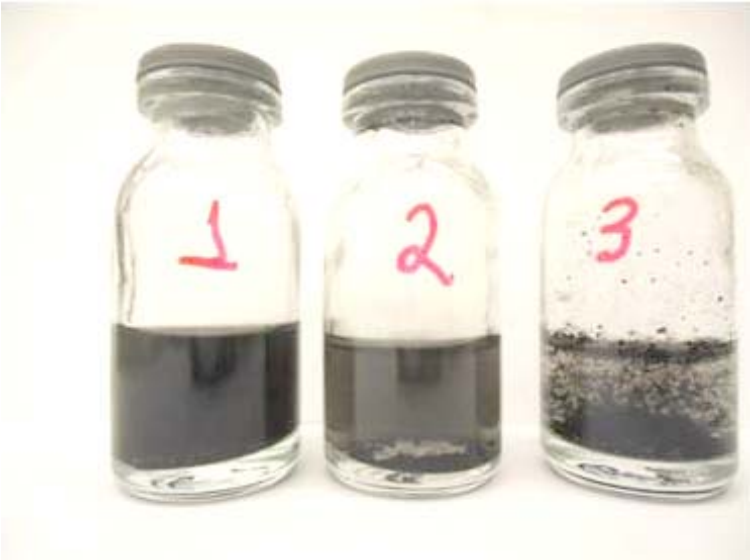

Figura 17- Soluções de NTCPM/PF-127 após 2 horas de ultra-sonicação e 30 minutos de repouso em 3 diferentes concentrações, 1: 0,5 mg/mL; 2: 1,0 mg/mL e 3: 1,5 mg/mL. Observa-se que apenas a solução 1 encontra-se totalmente dispersa e homogênea

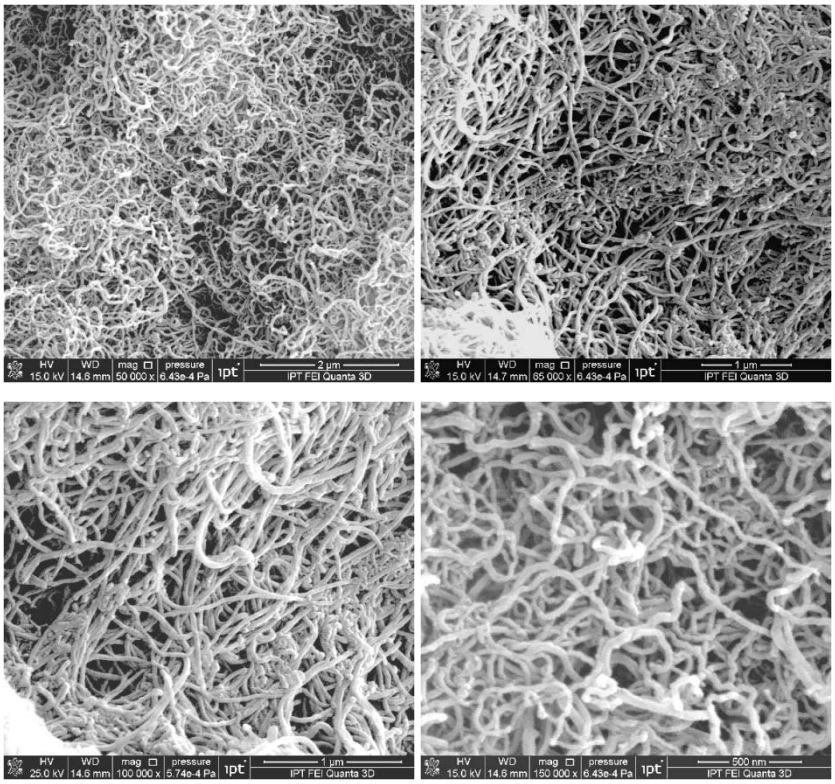

Figura 18- Microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) dos NTCPM na concentração de 0,5 mg/mL. As imagens foram ampliadas em 50.000, 65.000, 100.000 e 150.000 vezes respectivamente. Pode-se observar sua estrutura cilindica com poucos namonetros de diâmetro em relação ao seu extenso comprimento, dispostos na forma de rede entrelaçada

4.5 Citotoxicidade NTCPM/PF-127 sobre a linhagem B16-F10

Com os NTCPM funcionalizados com o surfactante PF-127, o ensaio de citotoxicidade foi realizado com a linhagem B16-F10 e quantificado pelo teste de MTT. Os NTCPM/PF-127 foram incubados por 3 horas com as concentrações de 5; 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 e 100 µg/mL em placa de 96 poços, a figura 19 mostra os resultados.

A concentração de 5µg/mL de NTCPM/PF-127 é a menos citotoxica para linhagem B16-F10, não apresentando diferença estatística com relação ao controle e com uma viabilidade celular de 80%.

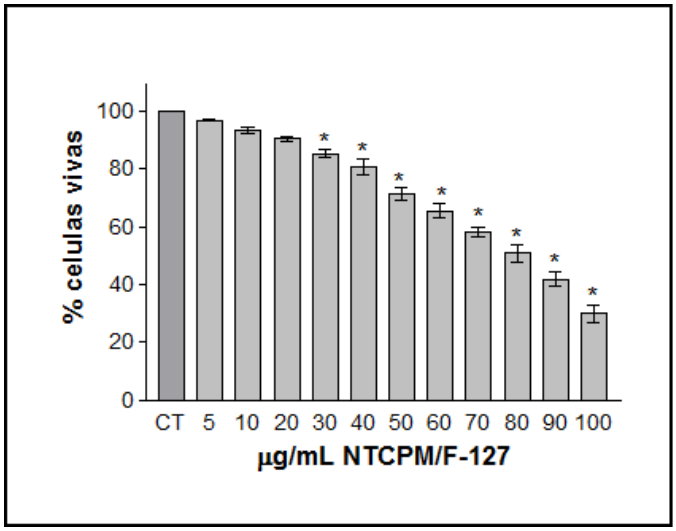

Figura 19- Porcentagem de células vivas após incubar por 3h com varias concentrações do sistema NTCPM/PF-127. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de *$p < 0,05$

4.6 Citotoxicidade NzPc em solução de Pluronic F-127 sobre a linhagem B16-F10

O ensaio de citotoxicidade do fármaco fotossensibilizador NzPc foi realizado com linhagem B16-F10 e quantificado pelo teste de MTT. A NzPc foi incubada por 3 horas nas concentrações de 2; 3; 4; 5; 7; 10 e 14 µg/mL em tampão Hank's com 1% PF-127, em placa de 96 poços, a figura 20 mostra os resultados.

A concentração de 2 µg/mL é a menos citotóxica para linhagem B16-F10, não apresentando diferença estatística com relação ao controle e com uma viabilidade celular de 91%.

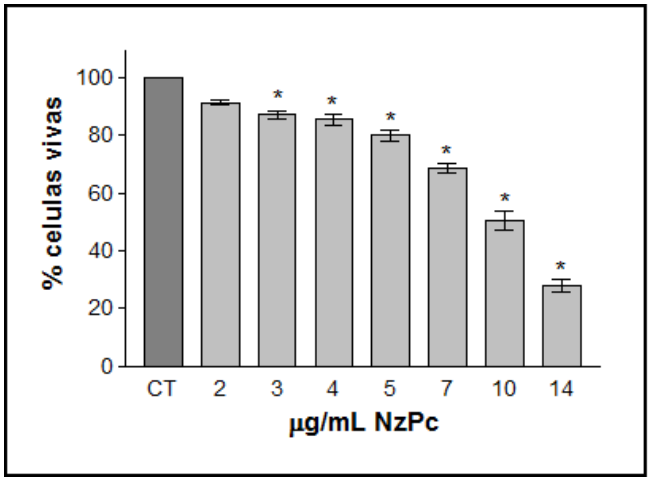

Figura 20- Porcentagem de células vivas após incubar por 3h com varias concentrações da NzPc livre em solução. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de *$p < 0,05$

4.7 Associação da NzPc aos NTCPM/PF-127 (NTCPM/F-127/NzPc)

Existem três formas possíveis de interação entre NTC e moléculas farmacológicamente ativas: a primeira consiste em associar o fármaco de forma que ele fique preso a rede dos NTC e aos defeitos nas suas paredes; a segunda é a formação de uma ligação covalente entre o fámaco e as paredes do NTC; e a terceira envolve o uso de NTC como nanocanais (FOLDVARI e BAGONLURI, 2008b). Os três exemplos estão representados na figura 21 abaixo.

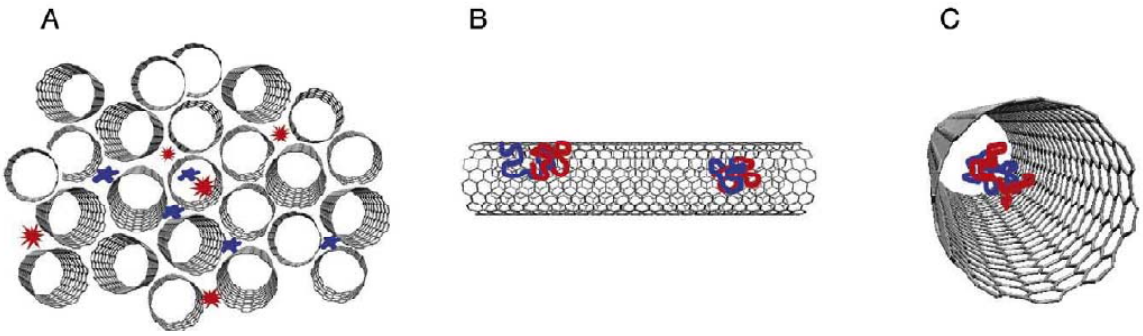

Figura 21- Representação esquemática de (A) moléculas de fármaco associadas a rede de NTC; (B) moléculas de fármaco ligadas covalentemente as paredes do NTC; e, (C) moléculas de fármaco dentro dos nanocanais dos NTC

O fármaco fotossensibilizador foi adicionado a solução de NTCPM/PF-127 nas concentrações não citotoxicas pré-estabelecidas de 2 μmol/L de NzPc e 5μg/mL de NTCPM/PF-127, essa solução ficou sob agitação durante 24 horas, em seguida foi congelada por 4 horas em freezer -70ºC e então liofilizada por 6 horas.

O método Frezzer-Dry obteve exito pois garante que após a agitação da solução por 24 horas, o fármaco NzPc e os NTCPM/PF-127 continuem associados (NzPc/NTCPM/PF-127) de forma não covalente. Após a liofilização, o sistema na forma solida, pode ser armazenado e apenas ser solubilizado em tampão quando necessário. Abaixo temos os espectros de infrevermelho do NTCPM/PF-127 (figura 22), do fármaco NzPc (figura 23) e da associação NTCPM/PF-127/NzPc (figura 24).

Alguns picos caracteristicos do NTCPM, 3629 e 3565 cm^{-1} indicando O-H de ácido carboxilico; 1650 cm^{-1} de C-C conjugado; e, alguns picos da NzPc, 1061 cm^{-1} de C-O primário e 1115 cm^{-1} do C-I, aparecem, sem alteração, no espectro referente ao sistema carreador desenvolvido (NzPc/NTCPM/PF-127). Conclui-se que o fármaco encontra-se disperso e preso à malha e aos defeitos das paredes dos NTCPM como uma mistura física, sem à formação de ligação entre as duas espécies.

A associação do fármaco com os NTCPM sem a formação de ligação química é de extrema importância, pois uma ligação química poderia modificar as propriedas químicas e físicas tanto do fármaco fotossensibilizador como dos NTCPM. Uma modificação nas propriedades químicas da NzPc poderia interferir diretamente nas suas características espectroscópicas e consequentemente na sua eficácia fotodinâmica. Dessa a forma a associação não covalente pelo método Frezzer-Dry é a melhor opção para este sistema de liberação desenvolvido, preservando as caracterísicas individuais dos componentes e contribuindo com essas para melhoria da efeito fotodinâmico.

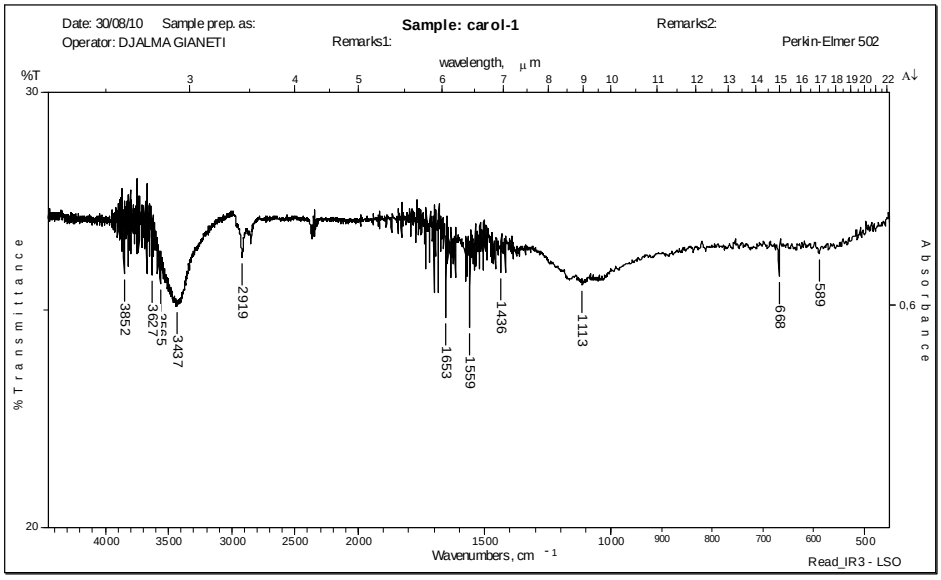

Figura 22- Infravermelho do NTCPM/PF-127, observa-se picos característicos como 3629, 2919, 1653 e 1559 cm^{-1}

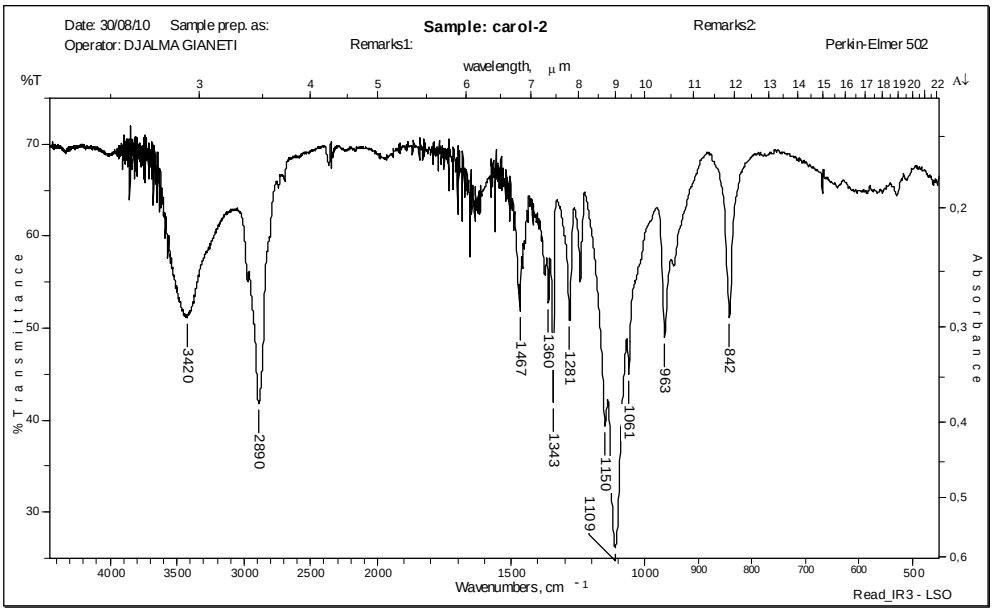

Figura 23- Infravermelho da NzPc, observa-se alguns picos característicos como 1061, 1115, 2890 e 1343 cm^{-1}

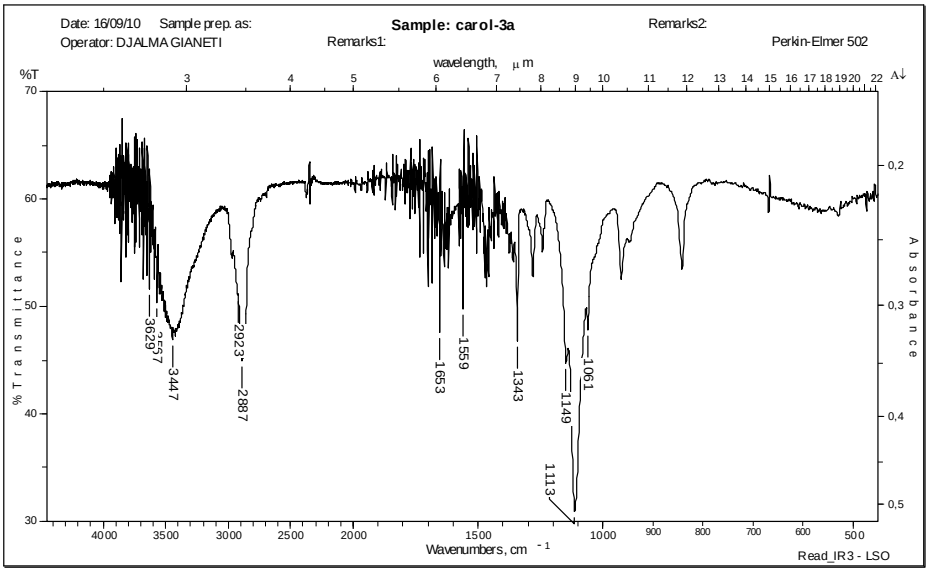

Figura 24- Infravermelho do NTCPM/PF-127/NzPc, observa-se alguns picos característicos tanto dos NTCPM como da NzPc, caracterizando uma mistura física sem a formação de ligação química

4.8 Uptake celular - Quantificação da NzPc intracelular por espectrofotometria de fluorescência

Para quantificação do fármaco NzPc, foi feita uma curva analítica de concentração do fármaco versos a área do espectro de emissão de fluorescência. A curva analítica e os espectros de emissão de fluorescência estão apresentados na figura 25.

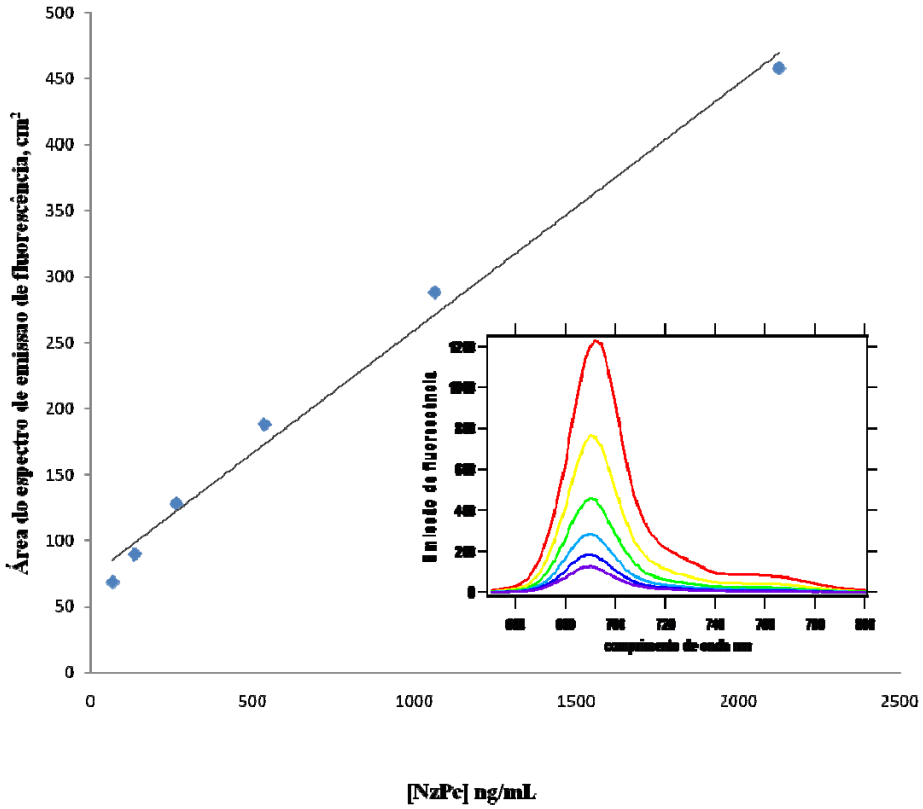

Figura 25- Curva analítica de concentração do fármaco NzPc versos a área do espectro de emissão de fluorescência. Equação da reta: y = 0,1865 + 73,273; R^2 = 0,9904. Ao lado, os espectros de emissão de fluorescência da NzPc em tampão Hank's 1% PF-127

Observa-se pela figura 17 as suspensões de NTC em tampão Hank's 1% PF-127, apesar de homogeneas, são turvas e pretas. Dessa forma, torna-se dificil realizar medidas de fluorescência do fármaco quando associado aos NTC, uma vez que esses impedem a passagem do feixe luz pela suspensão.

Uma alternativa foi realizar um estudo, dentro da faixa de concentração não citotóxica da NzPc e dos NTCPM, para determinar qual a influência na diminuição da fluorescência da NzPc na presença dos NTCPM.

Uma solução de 5 mL de tampão Hank's 1% PF-127 na concentração de 2 μg/mL da NzPc (concentração não citotóxica) foi preparada. Sucessivas adições de NTCPM foram feitas à solução da NzPc, usando a solução estoque de NTCPM de 0,5 mg/mL funcionalizados em 1% PF-127, essas adições atingiram uma concentração de 5 μg/mL de NTCPM (concentração não citotóxica).

A partir dos resultados da diminuição da fluorescência do fármaco NzPc, devido a dificuldade na passagem de luz pela suspensão de NTCPM, foi desenvolvido matematicamente um fator de correção. Esse fator, correlaciona o quanto de NTCPM diminui a verdadeira emissão de fluorescência da NzPc.

O estudo para a construção do fator de correção da emissão de fluorescência do fármaco NzPc quando na presença de NTCPM foi realizado com uma solução de 5 mL de tampão Hank's 1% PF-127 da NzPc. As adições de solução de NTCPM/PF-127 aumentaram o volume da solução de 5 mL da NzPc em 100 μL. Um estudo paralelo foi realizado e verificou-se que a adição de 100 μL de tampão Hank's 1% PF-127 em 5 mL de solução de NzPc (2 μg/mL) não modificou a fluorescência da solução.

A cada adição de NTCPM à solução da NzPc, espectros de fluorescência foram retirados (Figura 26). Observou-se no fim das adições que a solução final (2 μg/mL de NzPc e 5 μg/mL de NTCPM) apresentava uma fluorescência menor que a solução inicial (2 μg/mL de NzPc sem NTCPM). Essa diminuição da fluorescência é devido a dificuldade da luz atravessar a solução na presenção dos NTCPM. Comparando a área dos espectro da solução inicial com a área do espectro da solução final, tem-se uma diminuição de ± 126 cm^2.

Calculando a concentração real da solução inicial da NzPc usando a equação de reta da curva analítica, obtivemos o valor de 1,9 μg/mL. A solução final continua tendo 1,9 μg/mL da NzPc mas, na presença dos NTCPM, o valor da área do espectro de fluorescência indica, através da equação de reta da curva analítica, a concentração de 0,68 μg/mL. Dessa forma, um fator matemático de correção foi construido, e será sempre aplicado sobre o valor de concentração da NzPc quando em presença de NTCPM. O fator de correção tem o valor de 2,77.

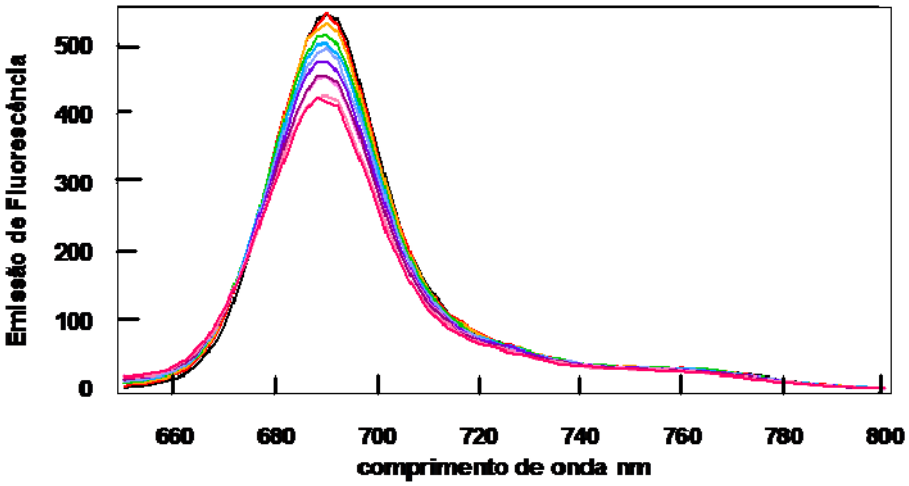

Figura 26- Espectros de fluorescência das adições de NTCPM à solução de 2 μg/mL da NzPc em Hank's 1% PF-127. A presença dos NTCPM diminui a intensidade de fluorescência do fármaco NzPc pois dificultam a passagem da luz pela solução. A partir da diferença entre a área do primeiro e do último espectro foi criado um fator de correção da concentração da NzPc quando em presença dos NTCPM

O estudo de uptake celular foi realizado com duas linhagens, B16-F10 e OSCC. Durante 3 horas, 2 μg/mL da NzPc em Hank's 1% PF-127 e o sistema NTCPM/PF-127/NzPc foram incubado nas duas linhagens, após a tempo de incubação as células foram lavadas 3 vezes com tampão Hank's, lisadas por sonicação, transferidas para cubetas e a emissão de fluorescência foi detectada em 690 nm com fendas de 5 nm e excitação em 613 nm.

A quantidade inicial de NzPc, tanto na forma livre como associada aos NTCPM, incubada foi de 2 μg/mL, representando 100% de uptake celular. A Tabela 5 resume os valores das médias das áreas dos espectros de emissão de fluorescência das amostras incubadas por 3 horas; a quantidade em ng/mL de fármaco interiorizado; a concentração real do fármaco interiorizado usando o fator de correção e a porcentagem de incorporação do fármaco. O estudo foi realizado com n = 3.

Tabela 5- Valores das médias das áreas dos espectros de emissão de fluorescência das amostras, incubadas por 3 horas nas linhagens B16-F10 e OSCC; quantidade em ng/mL de fármaco interiorizado; a concentração real do fármaco interiorizado usando o fator de correção e a porcentagem de incorporação do fármaco

Amostra (linhagem)	Médias das áreas dos espectros de fluorescência, cm^2	[NzPc]ng/mL do fármaco interiorizado	Fator de correção	Concentração real do fármaco interiorizado em ng/mL	% de incorporação do fármaco
NzPc (B16-F10)	97,074	127,8		127,8	6,39
NzPc (OSCC)	101,35	150,5		150,5	7,53
NTCPM/PF-127/NzPc (B16-F10)	85,69	66,6	2,77	184,5	9,23
NTCPM/PF-127/NzPc (OSCC)	93,4	107,9	2,77	298,9	14,9

A porcentagem de NzPc intracelular na presença do NTCPM é consideravelmente maior que a porcentagem de NzPc intacelular sem os NTCPM nas duas linhagens estudadas. Pode-se concluir que os NTCPM contribuem acentuadamente para uma maior interiorização do fármaco nas células estudadas (BIANCO et al., 2005; CHEN et al., 2006; KAM, 2005).

Observa-se também, que a porcentagem de NzPc intracelular na linhagem de carcinoma humano OSCC é maior quando comparada a linhagem melanocítica de rato B16-F10, e, chega a quase 15% quando o fármaco esta associado aos NTCPM. A interação dos NTCPM com a linhagem de carcinoma humano OSCC aparentemente é maior que a interação com a linhagem melanocítica de rato B16-F10 (MONTEIRO-RIVIERE, 2005), fato esse que pode contribuir para estudos *in vivo* de tratamentos cutâneos em humanos.

4.9 Fototoxicidade em linhagem B16-F10 e OSCC

A TFD é baseada na interação do fármaco fotossensibilizador com luz visível no tecido alvo. Realizamos experimentos de fototoxicidade para o fármaco na forma livre, solubilizado em tampão Hank's, e incorporado ao sistema de NTCPM.

A linhagem B16-F10 é uma linhagem melanocítica proviniente de ratos, melanomas não apresentam bons resultados quando tratados com TFD. A melanina absorve a luz irradiada, diminuindo assim, o efeito fotodinâmico do fármaco fotossensíbilizador. Assim,

apesar da linhagem B16-F10 ser de facil cultivo e manuseio, nos experimentos de fototoxicidade, além dessa linhagem, a linhagem de carcinoma humano OSCC também foi usada para avaliar e comparar o efeito dose resposta.

As duas linhagens foram incubadas nas concentrações não citotóxicas do fármaco (2 µg/mL) e do sistema NTCPM/PF-127/NzPc (2 µg/mL de NzPc e 5 µg/mL de NTCPM) por 3 horas, e, então iradiadas com diferentes doses de energia, os resultados estão nas figuras 27, 28, 29 e 30.

Os experimentos *in vitro* do fármaco NzPc na forma livre demonstram uma substancial fototoxicidade em 10 J/cm^2, com uma pequena, porém, melhor morte celular na linhagem de OSCC (96% de células mortas) em relação a linhagem de B16-F10 (95% de células mortas), esses resultados são compatíveis com outros fármacos fotossensibilizadores já estudados (BACHOR et al., 1991). A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos, para cada dose de energia, apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos esses valores de p, de cada dose em relação ao controle, são de p< 0,001, valores de alta significância estastística.

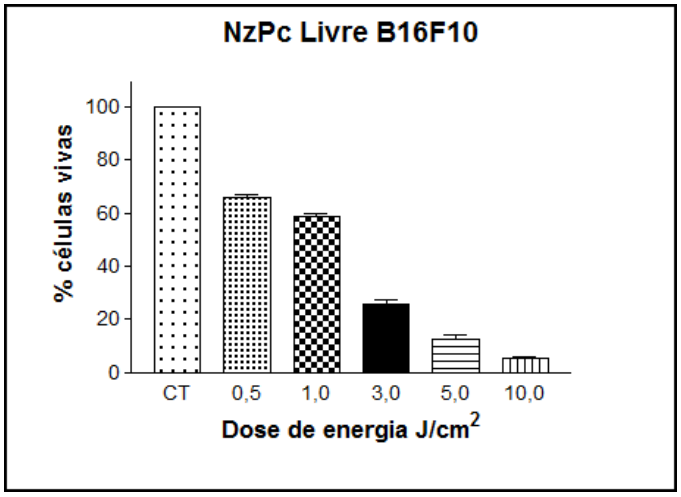

Figura 27 - Porcentagem de células vivas da linhagem B16-F10 após 3 horas de incubação com solução de NzPc na forma livre na concentração de 2µg/mL e posterior irradiação com diferentes doses de energia. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos os valores de p em relação ao controle são de p< 0,001, valores de alta significância

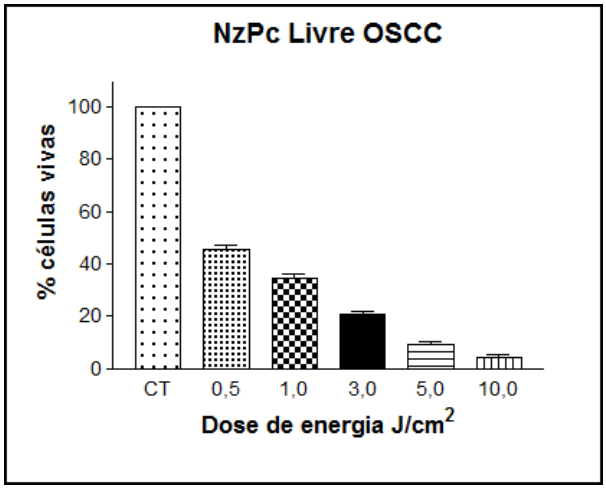

Figura 28- Porcentagem de células vivas da linhagem OSCC após 3 horas de incubação com solução de NzPc na forma livre na concentração de 2 μg/mL e posterior irradiação com diferentes doses de energia. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n = 3). Todos os valores de p em relação ao controle são de $p< 0,001$, valores de alta significância

Os experimentos *in vitro* de fototoxicidade do sitema desenvolvido NTCPM/PF-127/NzPc, também demonstraram uma substancial fototoxicidade em 10 J/cm^2, com uma melhor morte celular na linhagem de OSCC (98% de células mortas) em relação a linhagem de B16-F10 (96% de células mortas). A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos, para cada dose de energia, apresentam as médias de ± SEM (n=3). Todos esses valores de p, de cada dose em relação ao controle, são de $p< 0,001$, valores de alta significância estastística.

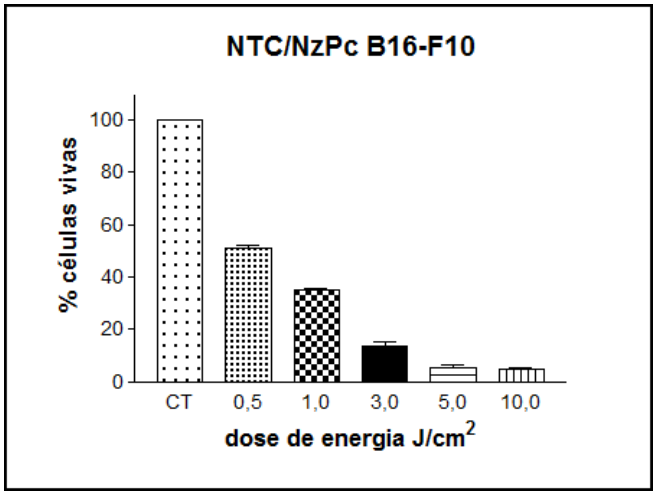

Figura 29 - Porcentagem de células vivas da linhagem B16-F10 após 3 horas de incubação com o sistema associado de NTCPM/NzPc e posterior irradiação com diferentes doses de energia. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n = 3). Todos os valores de p em relação ao controle são de p< 0,001, valores de alta significância

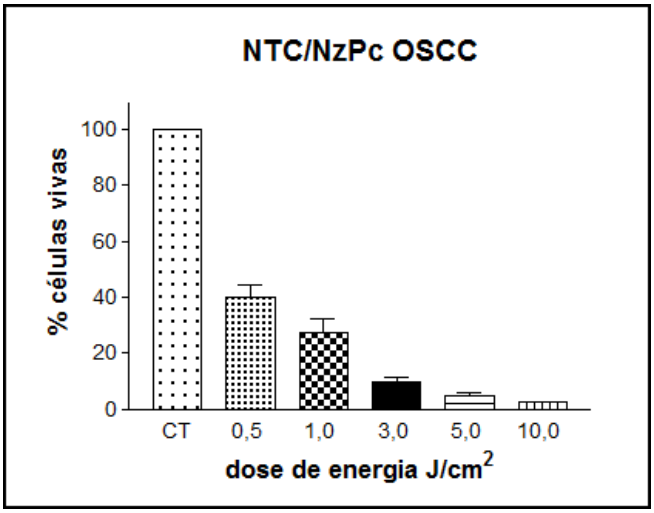

Figura 30 - Porcentagem de células vivas da linhagem OSCC após 3 horas de incubação com o sistema associado de NTCPM/NzPc e posterior irradiação com diferentes doses de energia. A análise de significância estatística entre o controle e os outros grupos foi determinada por One-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey para comparação multipla. Os valores obtidos apresentam as médias de ± SEM (n = 3). Todos os valores de p em relação ao controle são de p< 0,001, valores de alta significância

Com esses resultados observa-se que o sistema de liberação de fármaco desenvolvido NTCPM/PF-127/NzPc realmente melhora a eficiência fotodinâmica do fármaco NzPc, tanto na linhagem B16-F10 como na linhagem OSCC, com maior eficiência na linhagem de carcinoma humano. Os resultados da fototoxicidade estão de acordo com os resultados de uptake celular, os quais mostraram que a presença dos NTCPM aumentou a interiorização do fármaco nas células, e, assim, houve um maior dano fotodinânico no tecido alvo.

5 Conclusões

O fármaco fotossensibilizador NzPc apresenta parâmetros fotofísicos, fotoquímicos adequados e aplicáveis a TFD. Quando comparado a um fármaco fotossensibilizador clássico, a ZnPc, o fármaco NzPc teve seus parâmetros espectroscópicos máximizados, isso ocorreu devido a presença dos grupos axiais na molécula.

A funcionalização dos NTCPM com o surfactante Pluronic F-127, após o tratamento oxidativo, proporcionou uma melhor dispersão dos NTCPM em tampão, contribuindo também para a diminuição da citotoxicidade.

Os estudos de up-take celular confirmam que a presença dos NTCPM aumentam a interiorização do fármaco nas linhagens, e que, na linhagem celular humana a interiorização é maior quando comparada a linhagem celular de rato, fato que pode contribuir para os estudos *in vivo* de tratamentos cutâneos.

O fármaco NzPc associado a NTCPM funcionalizados com Pluronic F-127, apresentou um dano fotodinâmico mais acentuado quando comparado à sua forma livre. O aumento da sua potencialidade terapeutica se dá pela maior concentração intracelular, do mesmo, nas linhagens, mas com maior eficiência na linhagem de carcinoma humano OSCC do que na linhagem melanocítica de rato B16-F10.

6 Referências Bibliográficas

1. ARNOLD, M. S.; STUPP, S. I.; HERSAM, M. C. Enrichment of single-walled carbon nanotubes by diameter in density gradients, Nano Letters, v. 5, p. 713-718, Apr.2005.

2. BACHOR, R.; SHEA, C. R.; GILLIES, R.; HASAN, T. Photosensitized destruction of human bladder carcionoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres., Proceendings of the Natonal Academy of Sciences of United States of America, v. 88, p. 1580-1584, 1991.

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

4. BAUTISTA-SANCHEZ, A.; KASSELOURI, A.; DESROCHES, M. C.; BLAIS, J.; MAILLARD, P.; DE OLIVEIRA, D. M.; TEDESCO, A. C.; PROGNON, P.; DELAIRE, J. Photophysical properties of glucoconjugated chlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins, Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, v. 81, p. 154-162, Dec.2005.

5. BEAR, M. F.; CONNORS, B. W. Ciências - Desvendando o sistema nervoso 2º Edição ed. 2002.

6. BELLNIER, D. A.; GRECO, W. R.; LOEWEN, G. M. Population pharmacokinetics of the photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a in cancer patients, Cancer Res, v. 63, p. 1806-1813, 2003.

7. BIANCO, A.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery, Current Opinion in Chemical Biology, v. 9, p. 674-679, 2005.

8. BOEHNCKE, W. H.; ELSHORST-SCHMIDT, T.; KAUFMANN, R. Systemic photodynamic therapy is a safe and efective treatment for psoriasis [letter], Archives of Dermatology, v. 136, p. 271-272, 2000.

9. BONNETT, R.; CHARLESWORTH, P.; DJELAL, B. D.; FOLEY, S.; MCGARVEY, D. J.; TRUSCOTT, T. G. Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin-(m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (m-THPBC): a comparative study, Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2 p. 325-328, Feb.1999.

10. CHALEIX, V.; SOL, V.; HUANG, Y. M. RGD-porphyrin conjugates: Synthesis and potential application in photodynamic therapy, EUR J ORG CHEM p. 1486-1493, 2003.

11. CHEN, X.; TAM, U. C.; CZLAPINSKI, J. L.; LEE, G. S.; RABUKA, D.; ZETTL, A.; BERTOZZI, C. R. Interfacing carbon nanotubes with living cells, Journal of the American Chemical Society, v. 128, p. 6292-6293, May2006.

12. COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled Drug Delivery with Nanoparticles: Current Possibilities and Trends Future, European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics, v. 41, p. 2-13, July1994.

13. CROMMELIN, D. J. A.; BOS, G. W.; STORM, G. Lipossomes: Successful carrier systems for target delivery of drugs, The drug Delivery Companies Report 2002.

14. DAVIS.S.S.; UNNEYBALL, I. M.; LLUM, L.; ATCLIFFE, G. H.; MITH, A.; WILSON, C. G. Recent advances in the use of microspheres for targeted therapy, Drug Experimental Clinical Research, v. 11, p. 633-640, 1985.

15. DEMAS,J.N.; CROSBY,G.A. Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review, The Journal of Physical Chemistry, v. 75, p. 992-1024, 1971.

16. DEPAOLI, V. M. Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH2 associated with micelles and DNA, 2002.

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

18. DOUGHERTY, T.; GOMER, C.; ANDRESON, B.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy, Journal Natl. Cancer Inst, v. 90, p. 889-905, 1998.

19. EATON, D. F. Reference Materials for Fluorescence Measurement, International Union of Pure and Applied Chemistry, v. 60, p. 1107-1114, 1988.

20. FOLDVARI, M.; BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties, Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, v. 4, p. 173-182, Sept.2008a.

21. FOLDVARI, M.; BAGONLURI, M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues, Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, v. 4, p. 183-200, Sept.2008b.

22. FOOTE, C. S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation, Journal of Photochemistry and Photobiology, v. 54, p. 659, 1991.

23. GARETH, E. J. Human Cell Culture Protocols 1 ed. 1996.

24. GEORGAKILAS, V.; VOULGARIS, D.; VAZQUEZ, E.; PRATO, M.; GULDI, D. M.; KUKOVECZ, A.; KUZMANY, H. Purification of HiPCO carbon nanotubes via organic functionalization, Journal of the American Chemical Society, v. 124, p. 14318-14319, Dec.2002.

25. GILLIES, R.; KOLLIAS, N.; HASAN, T.; DIDDENS, H. Spectral characterization of the benzoporphyrin derivative monoacid ring-A photoproduct formed in fetal calf solutions during irradiation with 694 nm continuous-wave radiation , Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology, v. 33, p. 87-90, 1996.

26. GOGOTSI, Y.; NAGUIB, N.; LIBERA, J. A. In situ chemical experiments in carbon nanotubes, Chemical Physics Letters, v. 365, p. 354-360, Nov.2002.

27. GROFCSIK, A. Triplet state properties of tetrasubstituted zinc phthalocyanine derivates, 2004.

28. HASINA, R.; HULETT, K.; BICCIATO, S.; DI BELLO, C.; PETRUZZELLI, G. J.; LINGEN, M. W. Plasminogen activator inhibitor-2: A molecular biomarker for head and neck cancer progression, Cancer Research, v. 63, p. 555-559, Feb.2003.

29. HELLAND, A.; WICK, P.; KOEHLER, A.; SCHMID, K.; SOM, C. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes, Environmental Health Perspectives, v. 115, p. 1125-1131, Aug.2007.

30. HIRSCH, A. Functionalization of single-walled carbon nanotubes, Angewandte Chemie-International Edition, v. 41, p. 1853-1859, 2002.

31. IIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon, Nature, v. 354, p. 56-58, 1991.

32. JORI, G. Tumour photosensitizers: approahes to enhance the selectivity and effeciency of phtodynamic therapy., Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biology, v. 36, p. 87-93, 1996.

33. KAM, N. W. S. e. a. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction, PNAS, v. 102, p. 11600-11605, Aug.2005.

34. KLUMPP, C. e. al. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics, Biochimica Et Biophysica Acta, v. 1758, p. 404-412, 2006.

35. KONAN, Y. N.; GURNY, R. 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.

36. LACERDA, L. e. a. Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology, Advanced Drug Delivery Reviews, v. 58, p. 1460-1470, 2006.

37. LAKOWICZ, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy 2 ed. Baltimore, Maryland: Kluwer Academic, 1999, p. 1-362.

38. LIN, Y. e. a. Advances toward bioapplications of carbon nanotubes, Journal of Materials Chemistry, v. 14, p. 527-541, 2004.

39. LIU, Y.; WU, D. C.; ZHANG, W. D.; JIANG, X.; HE, C. B.; CHUNG, T. S.; GOH, S. H.; LEONG, K. W. Polyethylenimine-grafted multiwalled carbon nanotubes for secure noncovalent immobilization and efficient delivery of DNA, Angewandte Chemie-International Edition, v. 44, p. 4782-4785, 2005.

40. LIU, Z.; TABAKMAN, S.; WELSHER, K.; DAI, H. J. Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery, Nano Research, v. 2, p. 85-120, Feb.2009.

41. LO, P.-C.; WANG, S.; ZEUG, A.; MEYER, M.; RODER, B.; NG, D. K. Preparation and photophysical properties of halogenated silicon(IV) phthalocyanine substituted axially with poly(ethylene glycol) chains, Tetrahedron, v. 44, p. 1967-1970, 2003.

42. MAMALIS, A. G.; VOGTLÄNDER, L. O. G.; MARKOPOULOS, A. Nanotechnology and nanostrutured materials: trends in carbon nanotubes, Precision Engineering, v. 28, p. 16-30, 2004.

43. MAREE, M.; KUZNESTSOVA, N.; NYOKONG, T. Silicon octaphenoxyphthalocyanine: photostability and singlet oxygen quantum yields, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, v. 140, p. 117-125, 2001.

44. MARTI, C.; NONELL, S.; NICOLAU, M.; TORRES, T. Photophysical properties of neutral and cationic tetrapyridinoporphyrazines, Photochemistry and Photobiology, v. 71, p. 53-59, 2000.

45. MARTIN, C. R.; KOHLI, P. The emerging field of nanotubes biotechnology, Nature Reviews Drug Discovery, v. 2, p. 29-37, 2003.

46. MICHELS, S.; SCHIMIDT-ERFURTH, U. Sequence of early vascular events after photodynamic therapy I, Invest Ophth Vis Sci, v. 44, p. 2147-2154, 2003.

47. MIRONOV, A. F.; GRIN, M. A.; TSIPROVSKII, A. G. New photosensitizers of bacteriochlorin series for photodynamic cancer therapy, Russ J. Bioorg. Chem., v. 29, p. 190-197, 2003.

48. MONTEIRO-RIVIERE, N. A. e. al. Mult-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes, Toxicology Letters, v. 155, p. 377-385, 2005a.

49. MONTEIRO-RIVIERE, N. A. e. al. Surfactant effects on carbon nanotubes interactions with human keratinocytes, Nanomedicine, v. 1, p. 293-299, 2005b.

50. MONTORO, L. A.; ROSOLEN, J. M. A multi-step treatment to effective purification of single-walled carbon nanotubes, Carbon, v. 44, p. 3293-3301, Dec.2006.

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

52. MULLER, J.; DECORDIER, I.; HOET, P. H.; LOMBAERT, N.; THOMASSEN, L.; HUAUX, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells, Carcinogenesis, v. 29, p. 427-433, Feb.2008a.

53. MULLER, J.; HUAUX, F.; FONSECA, A.; NAGY, J. B.; MOREAU, N.; DELOS, M.; RAYMUNDO-PINERO, E.; BEGUIN, F.; KIRSCH-VOLDERS, M.; FENOGLIO, I.; FUBINI, B.; LISON, D. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: toxicological aspects, Chemical Research in Toxicology, v. 21, p. 1698-1705, Sept.2008b.

54. NUNES, S. M. T. S. F. S. T. A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminium phtalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives., Brazilian Journal of Medical and Biology Research 2004.

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

56. OLEINICK, N. L.; EVANS, H. H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms, Radiation Research, v. 150, p. 146-156, 1998.

57. OLIVEIRA, D. M. Estudos Sinergicos de fármacos fotossensibilizadores utilizados na Terapia Fotodinâmica e fluidos magnéticos utilizados em Hipertermia celular. 2006. 2006.

58. PELISSON, M.; TOMÉ, F.; JUNIOR, M.; SIMIONI, A.; TEDESCO, A. Syntheses and photochemical properties of one tribenzonaphtho-condensed porphyrazinato zinc complex, Journal Porphyrin and Phtalocyanine 2004.

59. PEREIRA, L. O.; BICALHO, L. S.; CAMPOS-DA-PAZ LOPES, M.; DE SOUSA, T. M. M.; BAO, S. N.; SANTOS, M. D. M. A.; FONSECA, M. J. P. DNA damage and apoptosis induced by Pteridium aquilinum aqueous extract in the oral cell lines HSG and OSCC-3, Journal of Oral Pathology & Medicine, v. 38, p. 441-447, May2009.

60. PETROV, P. e. al. Noncovalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes by pyrene containing polymers, Chemical Communications, v. 23, p. 2904-2905, 2003.

61. PHILLIPS, D. Time Correlated Single Photon Counting 1984.

62. PRIMO, F. L. Estudos fotofísicos e in vitro em modelo animal do fármaco fotossensibilizador incorporado em nanoemulsão: avaliação como sistema de liberação em Terapia Fotodinâmica do câncer de pele. 2006. 126 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP,Ribeirão Preto - SP,2006.

63. RAMANATHAN, T. e. al. Amino-Functionalized carbon nanotubes for binding to polymers and biological systems, Chemistry of Materials, v. 17, p. 1290-1295, 2005.

64. ROBERTS, W. G. In vitro characterization of monoaspartyl chlorin e6 and diaspartyl chlorin e6 for photodynamic therapy, Journal of National Cancer Institute, v. 80, p. 330-336, 1988.

65. ROSOLEN, J. M. e. a. Carbon nanotubes/felt composite electrodes without polymer binders, Journal of Power Sources, v. 162, p. 620-628, 2006.

66. ROTTA, J.; LUNARDI, C.; TEDESCO, A. Synthesis, Photophysical and Photochemical for Photodynamic Therapy, Current Organic Chemistry, v. 7, p. 187-196, 2003.

67. SALVADOR-MORALES, C. e. al. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes, Molecular Immunology, v. 43, p. 193-201, 2006.

68. SCHUITMAKER, J.; BAAS, P.; LEENGOEDVAN, H.; MEULEN VAN DER, F.; STAR, W.; ZANDWIJKI VAN, N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer., Journal of Photochemistry and Photobiology p. 3-12, 1996.

69. SHVEDOVA, A. A.; CASTRANOVA, V.; KISIN, E. R.; SCHWEGLER-BERRY, D.; MURRAY, A. R.; GANDELSMAN, V. Z.; MAYNARD, A.; BARON, P. Exposure to carbon nanotube material: Assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells, Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, v. 66, p. 1909-1926, Oct.2003.

70. SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use, European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 23, p. 131-138, Oct.2004.

71. SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos 25 ed. 2002, p. 801-807.

72. SOBOLEV, A. S.; JANS, D. A.; ROSENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers, Progress in Biophycs e Molecular Biology, v. 73, p. 51-90, Mar.2004.

73. SON, S. J. e. al. Templete synthesis of multifunctional nanotubes for contolled reales, Journal of Contolled Release, v. 114, p. 143-152, 2006.

74. SPIKES, J.; BOMMER, J. Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 17, p. 135-143, 1993.

75. SPILLER, W. Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, v. 2, p. 145-148, 1998.

76. STERNBERG, E.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic thertapy, Tetrahedron, v. 54, p. 4151, 1998.

77. TAGMATARCHIS, N.; PRATO, M. Functionalization of carbon nanotubes via 1,3 dipolar cycloadditions, Journal of Materials Chemistry, v. 14, p. 437-439, 2004.

78. TEDESCO A. C., S. M. T. NUNES, AND F. S. SGUILLA. Photophysica studies of zinc phtalocyanine and chloroalbuminium phtalocyanine incorporated into liposomes in the presenc of additives. Brazilian Journal of Medical and Biology Research, 2004.

79. TRZASKOWSKI, B.; JALBOUT, A. F.; ADAMOWICZ, L. Molecular dynamics studies of protein-fragment models escapsulated into carbon nanotubes, Chemical Physics Letters, v. 430, p. 97-100, 2006.

80. VERMA, R. K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions, Pharmaceutical Research, v. 25, p. 1-14, 2001.

81. VISTICA, D. T.; SKEHAN, P.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; PITTMAN, A.; BOYD, M. R. Tetrazolium-based assays for cellular viability: Acritical examination of selected parameters affecting formazan production, Cancer Research, v. 51, p. 2515-2520, 1991.

82. WILSON, P. Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use., Wiley Interscience: Chichster p. 73, 1989.

83. WITJES, M.; SPEELMAN, O.; NIKKELS, P.; NOOREN, C.; NAUTA, J.; VAN DER HOLT, B.; VAN LEENGOED, H.; STAR, W.; ROODENBURG, J. In vivo fluorescence kinetics and localisation of aluminum phthalocyanine disulphonate in an autologous tumour model. British , British 1996.

84. WOHRLE, D.; MULLER, S.; SHOPOVA, M.; MANTAREVA, G.; VIETRI, F.; RICCHELLI, F.; JORI, G. Effect of delivery system on the pharmacokinetic and phototherapeutic properties of bis(methyloxyethylenecoxy)silicon-phtalocyanine in tumor-bearing mice, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 50, p. 124-128, 1999.

85. YUEN, F. L. Y.; ZAK, G.; WALDMAN, S. D.; DOCOSLIS, A. Morphology of fibroblasts grown on substrates formed by dielectrophoretically aligned carbon nanotubes, Cytotechnology, v. 56, p. 9-17, Jan.2008.