

Aos meus pais **Aparecida** e **Moacyr**, meus irmãos **Marcio** e **Marcela** e minha madrinha **Maria** pelo amor, apoio, paciência e por acreditarem em mim. Vocês têm a minha eterna gratidão. Muito obrigado.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Hidetake Imasato pela oportunidade de realizar este trabalho, orientação e notável paciência. Obrigado.

À Profa. Dra. Janice R. Perussi pelo incentivo e sugestões durante o trabalho.

Ao Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato pelo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Marcel Tabak por gentilmente permitir o uso das instalações do Grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Química de São Carlos.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio e sua aluna Fernanda Prado do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelas medidas gentilmente realizadas de espectrometria de massa.

Aos amigos Alessandra, Leonardo, e Marilene pela imensurável ajuda, apoio, amizade e incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Muito Obrigado!

À amiga Priscila Menezes pela realização dos ensaios de atividade biológica das frações do Photogem<sup>®</sup> e apoio.

Aos amigos do laboratório: Aline, Cláudia, Diógenes, Ézer, Juliana, Júlio, Patrícia e Renato e pelos bons momentos de descontração e apoio durante todo este trabalho.

À todos os funcionários do IQSC-USP, sempre gentis e prestativos.

Aos funcionários do Grupo de Biofísica do IFSC por gentilmente cederem o uso do concentrador de amostras.

Aos velhos amigos: Nilson A. de Assunção, Adriana Khamis, Edivan Tonhi, Rodrigo, Simone, Tiago, Emília, Flávia, Marlene, Marcelo, Lorival, Leonardo (snoopy), Leonardo (gordo), Fernando (mister), Crauzão, Foca e Milena.

*“Ou nós encontramos um caminho,  
ou abrimos um.”*

Aníbal

## Resumo

O presente trabalho enfocou o isolamento, a análise da atividade biológica e a caracterização dos componentes majoritários do Photogem<sup>®</sup> através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e espectrometria de massa. O Photogem<sup>®</sup> é um derivado de hematoporfirina usado como fotossensibilizador em Terapia Fotodinâmica (TFD). O derivado de hematoporfirina é composto por uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros mas as estruturas químicas destes componentes ainda não estão bem caracterizadas. Empregou-se extração em fase sólida para limpeza e fracionamento dos componentes do Photogem<sup>®</sup>. As três frações principais foram separadas de acordo com suas respectivas polaridades. Em seguida, testes preliminares de atividade biológica foram desenvolvidos com as respectivas frações do Photogem<sup>®</sup> em células tumorais (HEp-2) e normais (VERO). A fração 2 apresentou citotoxicidade cinco vezes maior do que o Photogem<sup>®</sup> tanto nas células tumorais quanto nas células normais. Os componentes majoritários do Photogem<sup>®</sup> foram isolados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e analisados por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e por espectrometria de massa. O componente que corresponde à fração 1 pode ser atribuído à hematoporfirina IX em função do seu espectro de absorção eletrônica (banda de Soret em 396nm e bandas Q em 497, 531, 568 e 619nm), seu coeficiente de absorvidade molar  $((1,30 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L})$  e seu espectro de massa (íon pseudomolecular em  $m/z$  599Da). É importante mencionar que este trabalho proporcionou a elaboração de um procedimento acessível à maioria dos laboratórios brasileiros no que se refere a purificação, separação, isolamento e caracterização das frações constituintes do Photogem<sup>®</sup>, sendo uma contribuição relevante para o avanço da TFD no Brasil. As etapas da metodologia completa são comentadas e discutidas em detalhes.

## Abstract

The present work focused the isolation, the biological activity analysis and the characterization of the major components of Photogem<sup>®</sup> through High Performance Liquid Chromatography (HPLC), UV-Vis electronic absorption spectroscopy (UV-Vis) and mass spectrometry. Photogem<sup>®</sup> is a hematoporphyrin derivative used as photosensitizer in Photodynamic Therapy (PDT). The hematoporphyrin derivative is composed by a mixture of monomers, dimers and oligomers but the chemical structures of these components are not well-characterized yet. It was employed solid phase extraction to clean-up and fractionation of the Photogem<sup>®</sup> components. Three principal fractions was separated as function of their respective polarities. Subsequently, initial biological tests were developed with the respective Photogem<sup>®</sup> fractions in tumoral (Hep-2) and normal (VERO) cells. Fraction 2 presented citotoxicity approximately 5-fold higher than Photogem<sup>®</sup> as in tumoral as in normal cells. The major components of Photogem<sup>®</sup> were isolated by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and analyzed by UV-Vis electronic absorption spectroscopy (UV-Vis) and mass spectrometry. The component that corresponds to fraction 1 can be assigned to hematoporphyrin IX as function of its electronic absorption spectrum (Soret band in 396nm and Q bands in 497, 531, 568 and 619nm), its molar absorptivity coefficient  $((1,30 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L})$  and its mass spectrum (pseudomolecular ion in  $m/z$  599Da). It is important to mention that this work provided the elaboration of an accessible procedure to the most of the brazilian laboratories regarding purification, separation, isolation and characterization of the constituent fractions of Photogem<sup>®</sup>, being a relevant contribution to the advancement of PDT in Brazil. The steps of the complete methodology are commented and discussed in details.

## Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema dos mecanismos de funcionamento da TFD. ....	5
Figura 2 – Estrutura de alguns fotossensibilizadores de segunda geração. ....	8
Figura 3 – Estrutura da hematoporfirina. ....	12
Figura 4 - Procedimento de Lipson para a obtenção do HpD e as versões patenteadas Photofrin <sup>®</sup> e Photogem <sup>®</sup> . ....	13
Figura 5 – Propostas para as estruturas dos dímeros ligados por grupo éter e éster. ....	15
Figura 6 – Fracionamento do Photogem utilizando-se cartucho de extração em fase sólida C <sub>18</sub> e diferentes solventes em uma escala decrescente de polaridade. ....	31
Figura 7 – Oito frações isoladas do Photogem <sup>®</sup> na investigação inicial. Estas frações estão divididas em dois grupos: (a) quatro frações apresentando espectros de absorção semelhantes aos espectros característicos de porfirinas; (b) quatro frações apresentando espectros de absorção significativamente diferenciados em relação aos espectros característicos de porfirinas. ....	33
Figura 8– Estudo comparativo da amostra de Photogem <sup>®</sup> e de sua fração metanólica. Cromatografia em fase reversa (C <sub>18</sub> ); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L <sup>-1</sup> ; gradiente de eluição de 50 a 98% de metanol durante 55min; volume de amostra na injeção: 20µL; fluxo: 0,8mL min <sup>-1</sup> ; absorvância monitorada em 400nm. ....	37
Figura 9 – Cromatograma da separação preliminar da fração metanólica do Photogem <sup>®</sup> obtida por extração em fase sólida. ....	39
Figura 10 – Espectro eletrônico do Photogem <sup>®</sup> e de suas respectivas frações 1, 2 e 3; Concentrações utilizadas: Photogem <sup>®</sup> 25µg mL <sup>-1</sup> ; fração 1 12µg mL <sup>-1</sup> ; fração 2 35µg mL <sup>-1</sup> ; fração 3 120µg mL <sup>-1</sup> ; caminho óptico 0,2; solvente utilizado: tampão PBS. ....	41
Figura 11 – Cromatograma da fração metanólica do Photogem <sup>®</sup> . Cromatografia em fase reversa (C <sub>18</sub> ); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol	

- L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 50 a 98% de metanol durante 55min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorvância monitorada em 400nm..... 52
- Figura 12– Cromatograma da fração 1 do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 60 a 90% de metanol durante 30min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorvância monitorada em 400nm..... 52
- Figura 13 – Cromatograma da fração 2 do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 60 a 90% de metanol durante 30min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorvância monitorada em 400nm..... 53
- Figura 14 – Cromatograma da fração 3 do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 60 a 90% de metanol durante 40min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorvância monitorada em 400nm..... 53
- Figura 15 – Cromatograma da comparação dos tempos de retenção dos compostos isolados com o Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 50 a 98% de metanol durante 55min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorvância monitorada em 400nm..... 54
- Figura 16 – Cromatograma da comparação dos tempos de retenção dos compostos isolados do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 50 a 98% de metanol durante 55min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorvância monitorada em 400nm..... 55
- Figura 17 – Espectro eletrônico típico de uma porfirina base livre..... 58

Figura 18 – Espectro eletrônico dos compostos majoritários isolados do Photogem <sup>®</sup> . Solvente utilizado: metanol; caminho óptico: 1cm. ....	59
Figura 19 – Espectro de massa da hematoporfirina (ESI <sup>+</sup> – MS), voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 75V.....	64
Figura 20 – Espectro de massa do Photogem <sup>®</sup> (ESI <sup>+</sup> -MS), voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V. ....	66
Figura 21 – Espectro de massa dos compostos denominados pico 1 e 2 do Photogem <sup>®</sup> , voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V. ....	68
Figura 22 – Espectro de massa do pico 3, que é um dos componentes majoritários do Photogem <sup>®</sup> , voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V. ....	69
Figura 23 - Espectro de massa do composto majoritário pico 4 do Photogem <sup>®</sup> voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V. ....	70
Figura 24 – Espectro de massa do composto denominado pico 5 do Photogem <sup>®</sup> , voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V. ....	72
Figura 25– Estrutura dos possíveis monômeros encontrados no Photogem <sup>®</sup> ..	74
Figura 26– Estrutura básica das porfinas. ....	80
Figura 27 – Esquema de um cromatógrafo líquido. ....	87
Figura 28 – Esquema de espectrômetro de massa. ....	91

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Rendimento da separação preliminar da fração metanólica utilizando-se SPE na amostra referente à fração metanólica. ....	40
Tabela 2: Ensaio biológico com Photogem <sup>®</sup> e com suas respectivas frações (Frações 1, 2 e 3) na ausência e na presença de radiação de comprimento de onda 630 nm em células normais (VERO), $D = 20,7 \text{ J cm}^{-2}$ , $t = 23 \text{ min}$ e $I = 15 \text{ mW cm}^{-2}$ . ....	44
Tabela 3: Ensaio biológico com Photogem e com suas frações (Frações 1, 2 e 3) na ausência e na presença de luz de comprimento de onda 630nm em células tumorais HEP-2, $D = 20,7 \text{ J cm}^{-2}$ , $t = 23 \text{ min}$ e $I = 15 \text{ mW cm}^{-2}$ . ....	46
Tabela 4 – Absortividade dos compostos majoritários do Photogem <sup>®</sup> .....	62
Tabela 5 – Coeficientes de absortividade molar dos compostos isolados do sensibilizador Photogem <sup>®</sup> .....	63

## Lista de Abreviaturas

- ALA – ácido 5-amino-4-oxopentanóico
- ELL – Extração líquido-líquido
- ESI – MS – Electrospray – Mass Spectrometry
- FAB – Fast Atom Bombardment
- FDA - Food and Drug Administration
- HEp-2 - Células tumorais de laringe humana
- HOMO - Highest Occupied Molecular Orbital
- HpIX– Hematoporfirina IX
- HpD – Hematoporphyrin derivative
- HPLC – High Performance Liquid Chromatography
- HVD - 2(4)-(1-hidroxietil)-vinildeuteroporfirina IX
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- LED – Light Emitting Diode
- LUMO - Lowest Unoccupied Molecular Orbital
- MALDI - Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
- MS/MS – Espectrometria de massa Tandem
- mTHPC - Meso-tetra(hidroxifenil)clorina
- MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio
- PpIX – Protoporfirina IX
- PBS – Tampão fosfato salino
- SFB – Soro fetal bovino
- SPE – Solid Phase Extraction
- TFD – Terapia Fotodinâmica
- UV-Vis – Ultravioleta-visível
- VERO - Células normais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)

**SUMÁRIO**

RESUMO.....	I
ABSTRACT .....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABELAS .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
I. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 INTRODUÇÃO À TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD).....	1
1.1.1 PROCEDIMENTO CLÍNICO E METODOLOGIA EXPERIMENTAL EM TERAPIA FOTODINÂMICA.....	2
1.1.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES.....	3
1.1.3 O TRANSPORTE E OS FOTOSSENSIBILIZADORES MAIS DIFUNDIDOS.....	6
1.2 DERIVADO DE HEMATOPORFIRINA: UMA MISTURA COMPLEXA .....	11
1.2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS.....	11
1.2.2 USO TERAPÊUTICO DO HPD .....	13
1.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO HPD.....	14
1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA NO BRASIL.....	18
1.3.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	18
1.3.2 O EMPREGO DO PHOTOGEM® NO BRASIL .....	20

II. OBJETIVOS .....	22
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.....	23
3.1.1 MATERIAIS UTILIZADOS.....	23
3.1.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS .....	24
3.2 MÉTODOS .....	24
3.2.1 INVESTIGAÇÃO INICIAL DO FOTOSSENSIBILIZADOR.....	24
3.2.2 LIMPEZA (CLEAN-UP) DO PHOTOGEM®.....	24
3.2.3 PRÉ-FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO METANÓLICA .....	25
3.2.4 ENSAIOS CITOTÓXICOS.....	25
3.2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA (HPLC) DOS ANALITOS.....	27
3.2.6 CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES ISOLADOS DA SOLUÇÃO SALINA APÓS CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (HPLC).....	28
3.2.7 ANÁLISES DOS COMPOSTOS ISOLADOS POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV-VIS.....	28
3.2.8 ANÁLISES DOS COMPOSTOS ISOLADOS ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	29
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
4.1.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV-VIS DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA INVESTIGAÇÃO INICIAL DO PHOTOGEM® .....	31
4.1.3 ANÁLISE DO PROCEDIMENTO UTILIZADO NA INVESTIGAÇÃO INICIAL .....	34

4.2.1 LIMPEZA DO PHOTOGEM® ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	34
4.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO METANÓLICA DO PHOTOGEM® .....	38
4.3.1 PRÉ-SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES QUE FORMAM A FRAÇÃO METANÓLICA DO PHOTOGEM® POR MEIO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	38
4.3.2 ANÁLISE DAS FRAÇÕES 1, 2 E 3 POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL .....	41
4.4 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DO PHOTOGEM® APÓS FRACIONAMENTO .....	42
4.4.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	42
4.4.2 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM LINHAGEM DE CÉLULAS NORMAIS (VERO) COM O PHOTOGEM® E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES .....	44
4.4.3 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS (HEP-2) COM O PHOTOGEM® E COM SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES .....	45
4.4.4 ANÁLISE DOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PHOTOGEM® E DE SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES.....	46
4.5 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES NO PHOTOGEM® .....	50
4.5.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	50
4.5.2 ISOLAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES NO PHOTOGEM® .....	51
4.6 ANÁLISE DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO PHOTOGEM® POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV-VIS.....	56
4.6.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	56

4.6.2 ANÁLISE DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO PHOTOGEM® POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NO UV-VIS.....	58
4.7 – ANÁLISE DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO PHOTOGEM® POR ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	63
4.7.1 ANÁLISE DO ESPECTRO DE MASSA DO PADRÃO UTILIZADO	64
4.7.2 ANÁLISE PRELIMINAR DO ESPECTRO DE MASSA DO PHOTOGEM® ÍNTEGRO.....	65
4.7.3 ANÁLISE DO ESPECTRO DE MASSA DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ISOLADOS DO PHOTOGEM® .....	67
V CONCLUSÕES.....	76
VI SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	78
ANEXO A – PORFIRINAS.....	79
ANEXO B – EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	81
ANEXO D – ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (ESI-MS) .....	90
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1 INTRODUÇÃO À TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

As propriedades terapêuticas da luz, tanto isoladamente como combinada com agentes químicos, há muito tempo têm sido reconhecidas pelo homem. Oscar Raab, em 1900, observou o efeito citotóxico do corante chamado acridina sobre *Paramecia* na presença de luz (Raab, 1900). De fato, o que Raab descreveu no início do século passado seria o nascimento de uma nova técnica, empregada hoje para o tratamento do câncer.

Câncer é a denominação comum a um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam como característica comum o crescimento desordenado de células. Estas células invadem tecidos e órgãos, podendo se espalhar para regiões afastadas do foco inicial, fenômeno denominado de metástase. O crescimento desordenado das células cancerosas é acelerado em relação às células normais, determinando a formação de tumores (INCA, 2006) e de outras doenças.

A técnica terapêutica que utiliza a luz para o tratamento do câncer é conhecida como terapia fotodinâmica. O início da era moderna da terapia fotodinâmica (TFD) ocorreu a partir do emprego de derivado de hematoporfirina por Lipson e colaboradores (Lipson, 1961) na localização de tecidos tumorais através de fluorescência. Dougherty e colaboradores (Dougherty, 1978) demonstraram que uma versão do derivado de hematoporfirina (mistura de monômeros, dímeros e oligômeros) enriquecida de sua fração oligomérica era ativada por luz de comprimento de onda 630 nm e causava a destruição do tecido tumoral. Esta droga foi patenteada e recebeu o nome comercial de Photofrin<sup>®</sup>.

O Photofrin<sup>®</sup> foi o primeiro fotossensibilizador aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos para uso em TFD em 1993 (FDA, 2006). O Photofrin<sup>®</sup> foi aprovado para uso também no Canadá, Japão e alguns países europeus, tais como Alemanha, Holanda e França (Sibata, 2000; Wilson,

1995). Um grande esforço tem sido empreendido no estudo de drogas mais eficientes para se utilizar em TFD, o que tem proporcionado novos compostos que foram denominados de fotossensibilizadores de segunda geração (Bonnett, 2001).

Ao longo dos últimos trinta anos, a TFD estabeleceu-se como uma modalidade alternativa de tratamento contra o câncer. A TFD se baseia na interação entre a luz e uma substância fotossensibilizadora. A luz é absorvida pelo fotossensibilizador, sendo excitada até o primeiro estado triplete que transforma o oxigênio em oxigênio singlete, o qual promove a destruição do tecido tumoral.

### **1.1.1 PROCEDIMENTO CLÍNICO E METODOLOGIA EXPERIMENTAL EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

O procedimento que envolve a TFD pode ser basicamente dividido em três etapas, a saber: i) injeção no paciente de um composto fotossensibilizador que possua uma boa seletividade em relação às células tumorais; ii) intervalo de tempo entre a aplicação do fotossensibilizador e a irradiação, necessário para que as células sadias expulsem rapidamente o agente fotossensibilizador, enquanto as tumorais o retém; iii) aplicação de luz ( $\lambda > 630\text{nm}$ ) no local onde há o tumor maligno contendo o fotossensibilizador (Bonnett, 2001).

A fonte de luz mais utilizada em TFD é o *laser* (do inglês, Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ou seja, luz amplificada por radiação de emissão estimulada) O laser é um dispositivo que produz radiação eletromagnética monocromática, coerente e colimada. Luz monocromática apresenta um comprimento de onda definido, enquanto luz coerente exhibe relações de fase definidas e luz colimada propaga-se como um feixe (Tipler, 1995).

Além das propriedades citadas anteriormente, o motivo relevante adicional de se utilizar a luz proveniente de um laser é a alta potência de saída

que leva à possibilidade do laser ser um dispositivo facilmente acoplado a um sistema de fibras ópticas que permitem a irradiação de cavidades ou outros locais de difícil acesso no corpo do paciente. O laser pode ser utilizado para o tratamento quanto para o diagnóstico de câncer.

O laser de diodo (LED) tem se tornado popular em TFD, apesar de sua baixa potência ao se comparar com o laser a gás, mas devido à sua portabilidade, seu baixo custo de aquisição e de operação, o LED vem obtendo preferência no mercado da TFD (Sibata, 2000).

O intervalo de comprimento de onda utilizado em TFD é de 600~800 nm. A razão de se utilizar esse intervalo consiste no fato da hemoglobina, uma proteína muito abundante nos tecidos, possuir bandas de absorção na região de 425, 544, e 577 nm. Conseqüentemente, o tecido precisa ser irradiado com luz de maior comprimento de onda para minimizar a absorção desta proteína, e não prejudicar o efeito fotodinâmico. Enquanto nos comprimentos de 850 e 900nm, as energias dos fótons nesta faixa espectral não correspondem àquelas necessárias para excitar os fotossensibilizadores disponíveis e, portanto, estimular a reação fotoquímica. Desta forma, o intervalo ideal de comprimentos de onda da radiação eletromagnética para se utilizar nesta modalidade de tratamento está entre 600 e 800 nm. Convencionou-se denominar este intervalo de comprimento de onda de “janela terapêutica” para o tratamento clínico de TFD (Sibata, 2000; Schuitmaker, 1996).

### **1.1.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES**

O mecanismo da TFD é iniciado quando o fotossensibilizador absorve o fóton e então ocorre a seqüência de eventos que implicam em decaimentos seqüenciais ou simultâneos de energia dos elétrons excitados, nos quais resultam em processos de transferência intra e intermolecular de energia. Estes processos podem ser divididos em dois tipos principais: reações fotoquímicas através de radicais livres (tipo I) e reações fotoquímicas através da formação do oxigênio singlete (tipo II). Estas duas formas de reações ocorrem de forma

simultânea ou competem entre si, como mostra a Figura 1. Após a droga absorver luz, ocorre uma transição do singlete fundamental ( $S_0$ ) para o estado singlete excitado ( $S_n$ ,  $n>0$ ). Moléculas neste estado podem decair de volta ao estado fundamental, emitindo luz (fluorescência) ou podem passar para o estado triplete ( $T_1$ ), através de um processo chamado cruzamento intersistemas que implica na mudança de orientação do spin eletrônico, ou seja, o número quântico total de spin fica igual a um,  $S=1$  (Cotton, 1987).

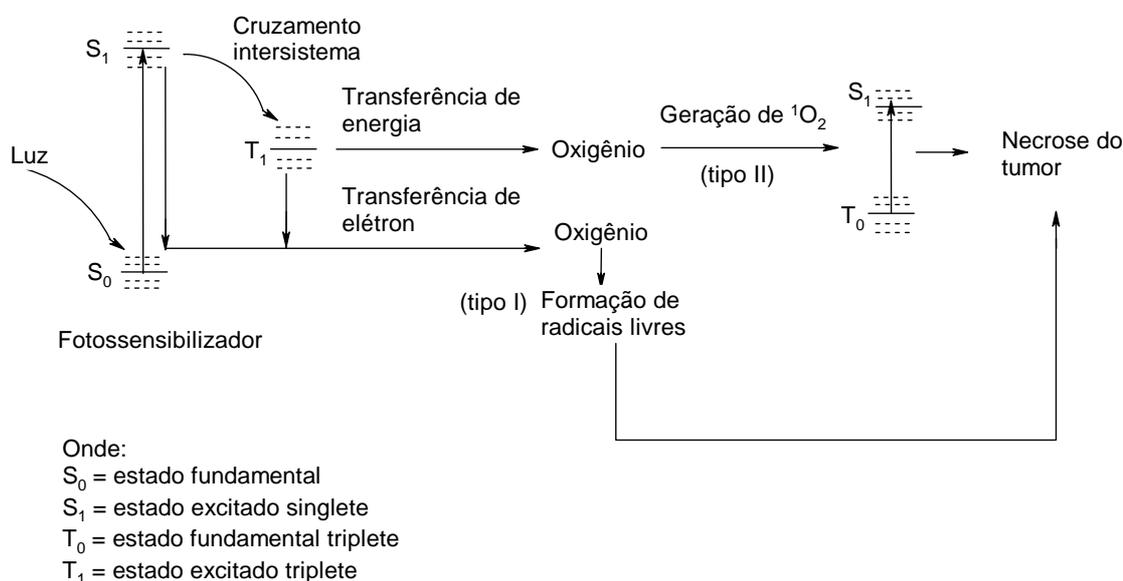
O mecanismo tipo I ocorre com a droga excitada nos estados singlete e triplete (Ochsner, 1997), através de uma transferência de elétron entre o fotossensibilizador no estado excitado para o oxigênio presente no meio, gerando o íon superóxido ( $O_2^-$ ) (Sharman, 1999) e cátions radicais baseados no sensibilizador, que apresentam reações muito rápidas.

No processo tipo II, é formado o oxigênio singlete. Este processo ocorre através da transferência de energia do composto fotossensibilizador para moléculas de oxigênio presentes no meio em questão. Estas moléculas se encontram em um estado triplete, que é o estado mais estável para a molécula de oxigênio. Este processo é genericamente aceito como o principal mecanismo de ação da terapia fotodinâmica (Weishaupt, 1976).

Conforme a Teoria do Orbital Molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental apresenta dois elétrons desemparelhados nos orbitais antiligantes degenerados  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$ , ou seja, o oxigênio é uma molécula paramagnética, apresentando  $S=1$ . Portanto, este sistema apresenta multiplicidade máxima, ou seja, obedece à Regra de Hund, constituindo-se em um estado de menor energia. É por isso que o estado fundamental do oxigênio é um estado triplete (este termo triplete se refere à multiplicidade apresentada por um sistema  $S=1$ , o que é representado pela fórmula  $2n_s + 1$ ).

No estado singlete, por sua vez, o sistema, não obedecendo à regra de Hund, apresenta mínima multiplicidade, isto é, apresenta os elétrons do chamado HOMO (sigla formada pelas iniciais de Highest Occupied Molecular Orbital) emparelhados em um mesmo orbital (um dos orbitais  $\pi^*$  duplamente

degenerados), obviamente, obedecendo ao princípio de exclusão de Pauli (Coton, 1987).



**Figura 1** - Esquema dos mecanismos de funcionamento da TFD.

O tempo de vida do oxigênio singlete em sistemas biológicos é curto, da ordem de  $3\mu\text{s}$  (Skovsen, 2005; Snyder, 2005). Em função disto, sua área de atuação é pequena, abrangendo um raio de ação da ordem de 260 nm (Skovsen, 2005). Este fato garante que somente as células tumorais serão destruídas, poupando as células saudáveis, uma vez que estas últimas apresentariam baixas ou nenhuma concentração de fotossensibilizador.

Na TFD, há duas formas de ocorrer a destruição das células tumorais, sendo a primeira delas através de um ataque direto das espécies reativas a componentes celulares (Milanesi, 1987) como, por exemplo, mitocôndria, membrana plasmática ou núcleo, inviabilizando várias funções fundamentais à vida celular.

Uma segunda forma de destruição celular acontece por via indireta, ou seja, ocorre uma destruição do sistema vascular presente nas circunvizinhanças do tumor por meio das espécies reativas geradas durante a

TFD (Chaudhuri, 1987; Milanesi, 1987; Nelson, 1987). Desta maneira, a irrigação do tecido canceroso é minimizada, inviabilizando o crescimento celular do mesmo. Quanto maior for esse impedimento, menor será a nutrição do tumor por parte do sistema circulatório e mais intensa pode ser considerada a ação do fotossensibilizador.

### **1.1.3 O TRANSPORTE E OS FOTOSSENSIBILIZADORES MAIS DIFUNDIDOS**

A seletividade e o processo de retenção do agente fotossensibilizador em TFD no tecido tumoral permanece pouco esclarecido. Estudos (Chwilkowska, 2003; Gèze, 1993) indicam que, inicialmente, o fotossensibilizador é transportado através das lipoproteínas contidas no plasma sanguíneo e distribuído de maneira seletiva ao tecido e às células tumorais. A seletividade apresentada pelo tecido tumoral é devido ao fato deste tecido possuir características diferentes do tecido normal, tais como: pH mais baixo (Gullino, 1965), uma taxa de multiplicação celular superior e, portanto o sistema de expressão de receptores de lipoproteínas está super ativada pela necessidade de colesterol (Boyle, 1996; Matile, 1996; Hombrecher, 1993). Este último mecanismo garante uma maior concentração de moléculas de sensibilizadores incorporadas na membrana plasmática e organelas das células doentes. A necrose do tecido doente ocorre pela ação tóxica do oxigênio singlete e também pela ação destrutiva que este impõe ao sistema vascular do tumor (Chaudhuri, 1987; Milanesi, 1987; Nelson, 1987).

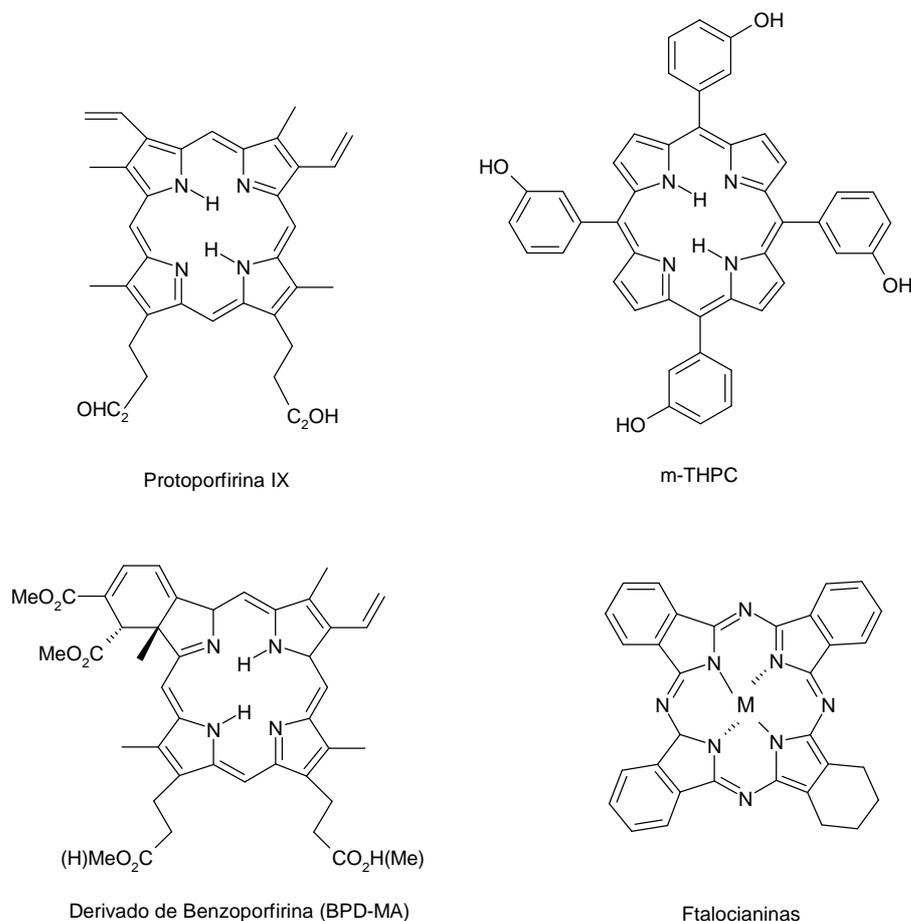
Em geral, os fotossensibilizadores utilizados em terapia fotodinâmica são derivados de porfirinas. Não há motivos para se supor que somente esta série de compostos seja a mais adequada, mas eles possuem propriedades interessantes para serem utilizados para esse fim, tais como: estabilidade aromática, alto rendimento na geração de oxigênio singlete e ausência de toxicidade no escuro, ou seja, enquanto não são excitadas pela irradiação.

Além disso, possuem banda de absorção na região do vermelho no espectro eletrônico.

O derivado de hematoporfirina (HpD) e suas versões enriquecidas com a fração mais rica em oligômeros, tais como o Photofrin<sup>®</sup> de fabricação americana e o Photogem<sup>®</sup> de origem russa, e o Photosan<sup>®</sup> fabricado na Alemanha, são as primeiras drogas empregadas em aplicações clínicas da TFD, denominadas, por esse motivo, de fotossensibilizadores de primeira geração (Bonnett, 2001). O HpD consiste em uma mistura complexa de monômeros, dímeros e oligômeros. A fração que possui atividade em TFD é a que apresenta os oligômeros ligados através de ligações covalentes tipo éter, éster e carbono-carbono, onde as versões purificadas são separadas do HpD original através de cromatografia por exclusão (Pandey, 1991).

Apesar dos resultados animadores obtidos com TFD, principalmente em cânceres de pele, bexiga, sistema digestivo e região do pescoço, os fotossensibilizadores de primeira geração apresentam algumas desvantagens e efeitos colaterais, como, por exemplo, um indesejável acúmulo do sensibilizador na pele do paciente gerando uma fotossensibilidade à luz que pode durar até 7 semanas (Razum, 1987). Vale acrescentar igualmente que o coeficiente de absorção destes agentes fotossensibilizadores na região do vermelho é fraca, tornando o tratamento de tumores mais profundos algo não trivial.

Uma série de compostos chamados de fotossensibilizadores de segunda geração têm sido estudada atualmente com grandes avanços visando à aplicação em TFD. Pode-se citar, como exemplo, as porfirinas reduzidas (clorinas e bacterioclorinas), as ftalocianinas e os derivados de benzoporfirinas. A Figura 2 contém as estruturas de alguns fotossensibilizadores de segunda geração.



**Figura 2** – Estrutura de alguns fotossensibilizadores de segunda geração.

Dos derivados de porfirinas do tipo clorinas e bacterioclorinas, um exemplo muito estudado é o meso-tetra(hidroxifenil)clorina (mTHPC) encontrado no mercado com o nome comercial de Foscan<sup>®</sup>. Este composto se apresenta atualmente na fase II de testes clínicos para o tratamento de câncer no cérebro e no pescoço nos Estados Unidos e na Europa (Sibata, 2000). Esta clorina absorve luz em 652 nm e possui dose de administração de 0,3 mg.Kg<sup>-1</sup> (mg de droga por quilograma de massa do paciente), sendo assim, uma dose muito menor que o Photofrin<sup>®</sup>, 2,0 mg.Kg<sup>-1</sup>. O paciente apresenta pouca ou nenhuma fotossensibilidade uma vez que o agente fotossensibilizador é rapidamente eliminado de seu corpo.

Além deste fotossensibilizador, há outros compostos, como, por exemplo, o derivado de benzoporfirina (BPD-MA) ou Visudyne<sup>®</sup>, que foi aprovado em 2000 (FDA, 2006) para o tratamento de degeneração macular da retina e a ftalocianina ou Pc4<sup>®</sup> que está na chamada fase II de testes clínicos contra a psoríase (Sharman, 1999).

Outro tipo de fotossensibilizador de segunda geração são os chamados endógenos, baseados na administração por via oral ou mesmo por uso tópico do ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA – ácido 5-amino-4-oxopentanóico ou Levulan<sup>®</sup> Kerastick – Cloridrato de ácido aminolevulínico). Este composto é o precursor metabólico da protoporfirina IX (PpIX) da rota biossintética do heme. Enquanto o ALA é inativo para a TFD, a protoporfirina é ativa. Todavia, a PpIX, assim como o Photofrin<sup>®</sup>, apresenta baixa absorção em 630 nm, o que dificulta o tratamento de tumores mais profundos. Entretanto, o paciente tratado com ALA, ao contrário daquele tratado com Photofrin<sup>®</sup>, não apresenta fotossensibilidade cutânea. O intervalo de acúmulo seletivo de protoporfirina IX é inferior ao intervalo de 24 a 48 horas entre a aplicação do sensibilizador e a irradiação do tumor usual para o Photofrin<sup>®</sup> e seus análogos porque todo o processo de tratamento se resume a apenas um dia (Sibata, 2000). O Levulan<sup>®</sup> Kerastick foi aprovado pelo FDA em 1999 para o tratamento de ceratoses actínicas na face e couro cabeludo (FDA, 2006). O ALA também está sendo testado (Marmur, 2004) e em conjunto com radioterapia (Umegaki, 2004) no tratamento do câncer de pele com resultados animadores.

A priori, a TFD foi desenvolvida para o tratamento de câncer, mas tem se tornado evidente que possui potencial para ser utilizada para outros fins. Outras aplicações para a TFD seriam o tratamento de psoríase (Levy, 1995), a remoção de verrugas na laringe (Abramson, 1992), o tratamento da degeneração macular da retina (Levy, 1995) e a terapêutica aplicadas às infecções superficiais por fungos na pele (Calzavara-Pinton, 2005).

Conclui-se que essa modalidade de terapia contra o câncer tem apresentado resultados satisfatórios e promissores podendo ser utilizada

isoladamente ou em conjunto com as terapias convencionais, como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Há de se ressaltar que a TFD não substituirá as terapias convencionais citadas anteriormente, entretanto, esta técnica tem mostrado uma alta eficiência em certos tipos de tumores, principalmente em cânceres de pele. Um dos principais atrativos deste tratamento consiste na indiscutível melhoria na qualidade de vida dos pacientes devido aos efeitos colaterais mais suaves em comparação àqueles apresentados pelas terapias convencionais.

Realmente, o principal efeito colateral da TFD é a elevada fotossensibilidade cutânea em um intervalo de 7 semanas (Razum, 1987) após o tratamento, ocasionada principalmente pela utilização dos fotossensibilizadores de primeira geração, como, por exemplo, o Photofrin<sup>®</sup>. Neste contexto, há de se adicionar que os sensibilizadores de segunda geração, em seus testes preliminares, têm apresentado uma fotossensibilidade cutânea menos acentuada do que os agentes fotossensibilizadores de primeira geração (Sibata, 2000). Entretanto, os agentes fotossensibilizadores de segunda geração ainda permanecem em fase de testes, não tendo ainda sido analisados suficientemente para uma utilização em larga escala pela população. Desta forma, apesar de perspectivas mais promissoras para o futuro com relação a estes novos medicamentos, o estudo mais detalhado dos fotossensibilizadores de primeira geração constitui relevante contribuição para o tratamento do câncer tendo-se em vista a sua ampla aplicação atual.

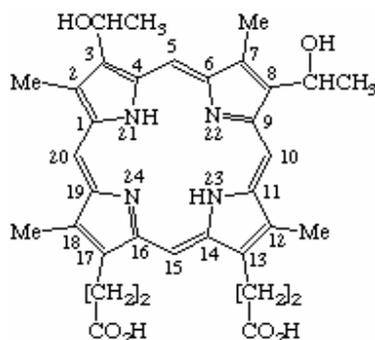
Ademais, há de se considerar que o avanço na compreensão da atuação farmacológica dos fotossensibilizadores de primeira geração não deixa de ser uma excelente referência para estudos futuros enfocando os fármacos de segunda geração, em função do campo enorme inexplorado nesta área de pesquisa. De fato, tanto o menor número de reações adversas como a maior seletividade obtidas com o uso dos fotossensibilizadores de segunda geração devem estar relacionados a uma relação estrutura-atividade mais interessante para o combate ao câncer, de forma que, a compreensão de suas diferenças

estruturais com os fotossensibilizadores de primeira geração é uma excelente maneira de se fornecer subsídios para uma evolução mais significativa na área em questão. Logo, este estudo comparativo requer, inicialmente, um conhecimento mais aprofundado da constituição dos fotossensibilizadores de primeira geração, que são misturas complexas pouco caracterizadas.

## **1.2 DERIVADO DE HEMATOPORFIRINA: UMA MISTURA COMPLEXA**

### **1.2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS**

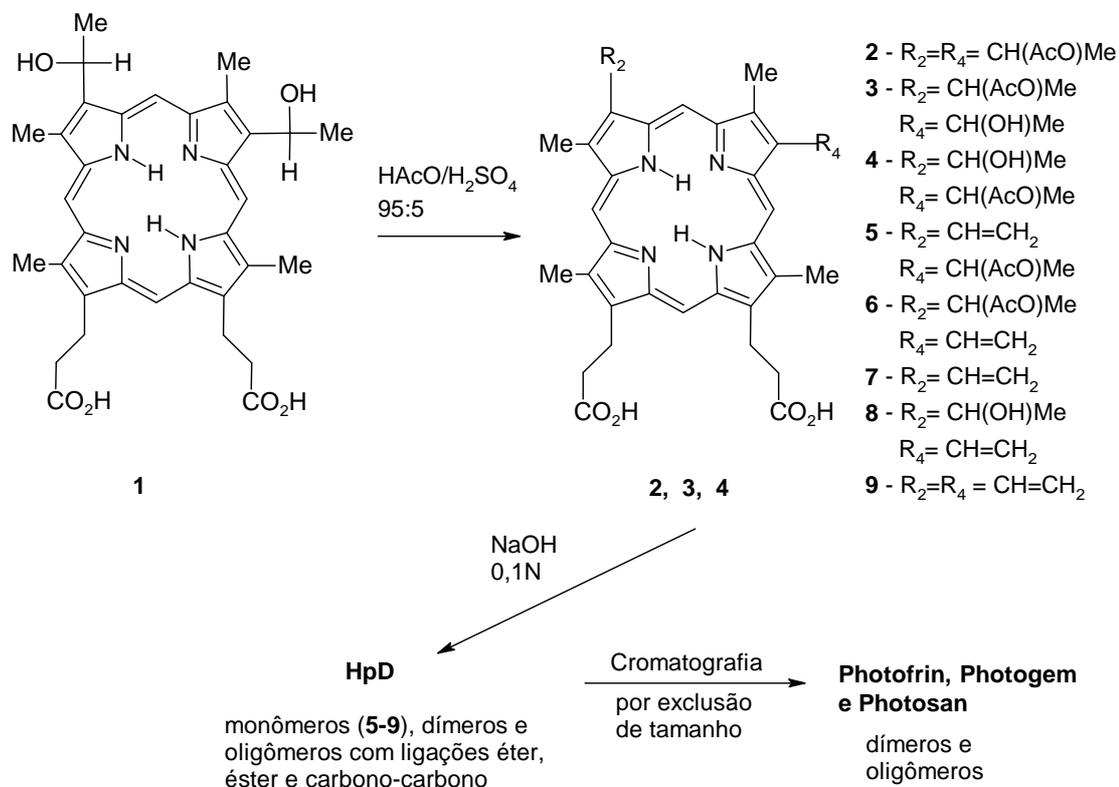
Um dos primeiros experimentos utilizando hematoporfirina como fotossensibilizador foi realizado por Meyer-Betz em 1913 (Medeikonos, 2006). Este pesquisador injetou em si mesmo duzentos miligramas de hematoporfirina e não observou nenhum efeito nocivo, até se expor à luz solar. Como consequência, teve queimaduras por toda a pele e a fotossensibilidade perdurou por meses. Investigações realizadas por Schwartz no início dos anos 50 do século passado descreveram que a hematoporfirina (Hp) não era responsável pela atividade fototóxica observada por Meyer-Betz. A atividade fototóxica observada por Meyer-Betz foi atribuída a uma fração oligomérica do material, cujo surgimento dependia do método de extração utilizado para se isolar a hematoporfirina do sangue. A Figura 3 ilustra a estrutura da hematoporfirina.



**Figura 3** – Estrutura da hematoporfirina.

Inicialmente, Lipson (Lipson, 1961) utilizou a hematoporfirina na localização de tecidos tumorais, sendo que a detecção foi efetuada através da espectroscopia de emissão de fluorescência. Havia dificuldade ao se trabalhar com a hematoporfirina crua pelo fato deste composto ser difícil de se obter puro. Todavia, inesperadamente, observou-se que os neoplasmas exibiam uma seletividade superior em relação às denominadas “impurezas” do que a própria hematoporfirina pura.

Lipson, tendo em vista o acontecimento da maior seletividade mostrada pelas denominadas impurezas, que eram porfirinas de maior massa molecular, teve a idéia de aumentar a seletividade da hematoporfirina realizando sua pré-polimerização. O objetivo de Lipson foi obter um material de maior pureza e enriquecido em porfirinas de maior massa molecular, na tentativa deste exibir uma seletividade superior a da hematoporfirina. Neste procedimento, a hematoporfirina é submetida a uma reação com solução de ácido acético e sulfúrico e em seguida é tratada com solução alcalina com o intuito de ocorrer a precipitação desta mistura denominada derivado de hematoporfirina (HpD). Este procedimento é conhecido até hoje como “Processo Lipson” e corresponde ao protocolo geral empregado na obtenção dos sensibilizadores comercializados para TFD Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup> e Photosan<sup>®</sup>, conforme ilustra a Figura 4.



**Figura 4** - Procedimento de Lipson para a obtenção do HpD e as versões patenteadas Photofrin<sup>®</sup> e Photogem<sup>®</sup>.

### 1.2.2 USO TERAPÊUTICO DO HPD

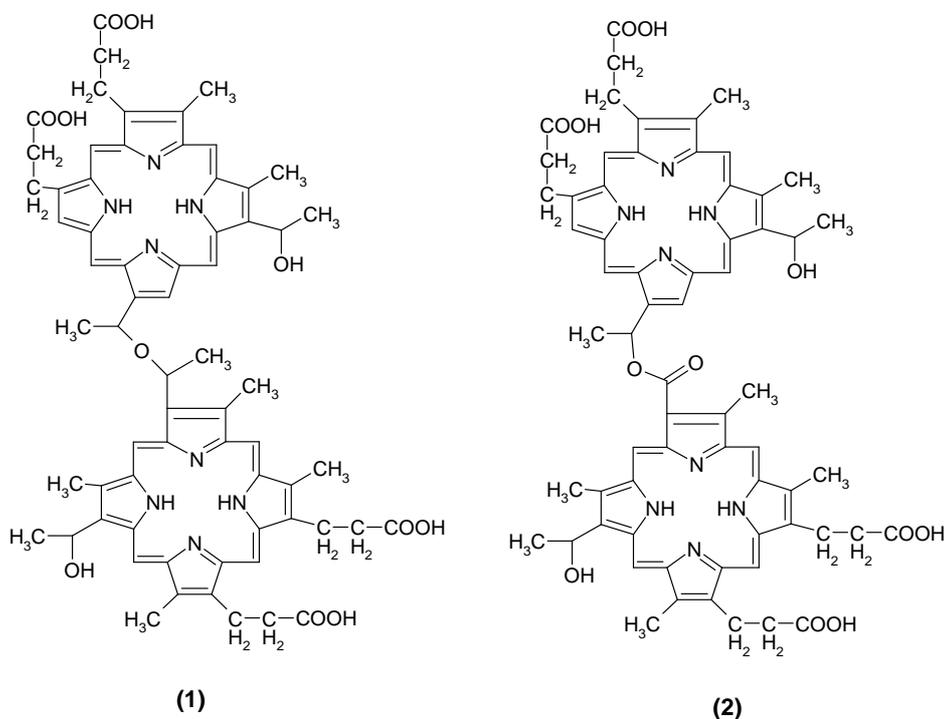
Dougherty e colaboradores (Dougherty, 1975; Dougherty, 1976) realizaram investigações a respeito do uso da hematoporfirina como fotossensibilizador em TFD. Um inconveniente descrito nestes trabalhos foi a alta dose de composto necessária para se obter os resultados desejáveis, devido à baixa seletividade exibida pela hematoporfirina, sendo este fato discutido no trabalho de Lipson. Em trabalhos posteriores, o grupo de Dougherty (Dougherty, 1978; Dougherty, 1979; Dougherty, 1983), realizou estudos com o intuito de comparar a seletividade e atividade fotodinâmica do derivado de hematoporfirina (HpD) com a hematoporfirina como sensibilizador. Nestes trabalhos foi comparada a atividade fotodinâmica destes dois em células tumorais e cobaias humanas. Verificou-se que a hematoporfirina apresenta

atividade como sensibilizador, mas possui uma seletividade menor do que o derivado de hematoporfirina. Este fato mostra que é necessário uma dose maior de hematoporfirina do que de HpD para se obter o mesmo efeito terapêutico, provando a superioridade do HpD sobre a hematoporfirina como potencial sensibilizador em TFD.

O grupo de Dougherty comprovou o potencial terapêutico da fração oligomérica presente no HpD e iniciou o empreendimento de elaborar um fármaco para ser utilizado em TFD. Desta forma surgiu o Photofrin<sup>®</sup>, o primeiro fármaco utilizado em TFD. O processo de fabricação do Photofrin<sup>®</sup> envolve o enriquecimento da fração oligomérica do HpD com o objetivo de se aprimorar sua ação como fármaco (Dougherty, 1984)

### 1.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO HPD

O trabalho de elucidação das estruturas presentes no HpD foi empreendido por vários pesquisadores. (Evensen, 1984; Kessel, 1985a; Kessel, 1985b; Kessel, 1986; Sommer, 1987). Kessel (Kessel, 1985a; Kessel, 1985b) empregou cromatografia por exclusão e obteve duas frações, uma mais rápida, constituída de material oligomérico e outra mais lenta, constituída de monômeros. Todos empregaram cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na tentativa de isolar os componentes do HpD. Os resultados não foram animadores. Apenas os monômeros hematoporfirina IX (Hp IX), protoporfirina IX (Pp IX) e os dois isômeros de 2(4)-(1-hidroxietil)-vinildeuteroporfirina IX (HVD) foram separados de maneira satisfatória. Porém, na região do cromatograma que continham os compostos oligoméricos de interesse, havia bandas largas e mal resolvidas, sendo evidência de uma separação ineficiente. Os oligômeros presentes apresentavam tempos de retenção muito próximos, o que dificultou a separação e, como conseqüência, inviabilizando a caracterização através de métodos espectroscópicos. Concluiu-se que a fração oligomérica do HpD era constituída por dímeros com ligação entre si tipo éter **(1)** e éster **(2)**, conforme representado a seguir.



**Figura 5** – Propostas para as estruturas dos dímeros ligados por grupo éter e éster.

Apesar das dificuldades encontradas para isolar e caracterizar os compostos responsáveis pela atividade fotodinâmica do HpD, os testes clínicos com o HpD prosseguiram, devido às suas qualidades como fotossensibilizador, tais como baixa toxicidade no escuro, boa seletividade aos neoplasmas, rota sintética simples e absorção na região em torno de 600 nm, o HpD continuou a ser estudado em diferentes tipos de câncer e mostrou resultados animadores, principalmente em câncer de pele, bexiga e pulmão (Dougherty, 1987a). No ano de 1984, Dougherty patenteou o procedimento de enriquecimento do HpD de sua fração oligomérica e deu o nome de Photofrin<sup>®</sup> (Dougherty, 1984). Um sério obstáculo enfrentado pelo grupo de Dougherty na aprovação do uso do Photofrin<sup>®</sup> pelo FDA no tratamento de câncer foi a falta da caracterização estrutural de seus componentes. Este fato atrasou a sua aprovação, esta

somente ocorrendo pelos resultados animadores nos tratamentos de vários tipos de câncer, como citado anteriormente (FDA, 2006).

Na tentativa de contornar o problema do isolamento dos compostos desta mistura, alguns pesquisadores (Byrne, 1987; Kessel, 1987; Dougherty, 1987b;) propuseram um método indireto para se examinar o material. Como o debate ocorria ao redor do tipo de ligação que era formada entre os monômeros, éster ou éter, para a formação dos oligômeros, a mistura foi submetida à hidrólise ácida e a reação com hidreto de alumínio e lítio, um reagente específico para carbonilas tipo éster.

Kessel e Dougherty trabalharam com o HpD e com o Photofrin<sup>®</sup> e concluíram que o material é constituído de oligômeros unidos entre si por ligação éter e éster e também por uma fração resistente aos dois tratamentos. Foi proposto que esse material resistente era formado por ligações vinílicas. Byrne concluiu que o material formado dependia da estrutura dos intermediários. Na fase de acetilação, caso fossem formados apenas o diacetato de porfirina (composto 2, Figura 2), o produto final formado seria um poliéster, mas se nesta etapa estivesse presente também monoacetato de porfirina (compostos 3 e 4, Figura 2), o produto formado seria um poliéter. O dado mais surpreendente de seu trabalho foi que o produto tipo poliéster é instável em solução aquosa sob condições fisiológicas, sendo que o resultado de sua degradação é o produto poliéter após a permanência da solução em repouso por alguns dias em temperatura ambiente.

Um processo alternativo foi proposto por Morris e colaboradores (Morris, 1988). Seu trabalho foi, ao invés de separar os compostos presentes no HpD, propor a síntese por uma rota alternativa dos diversos dímeros de porfirina os quais se acreditava fazer parte da mistura. Um fato surpreendente foi a constatação que uma estrutura proposta por Dougherty (Dougherty, 1984) como sendo o principal componente da mistura, o dímero formado através de ligação tipo éter, não apresentou resultados satisfatórios em testes biológicos. Este resultado, por sua vez, foi demonstrado por Pandey e colaboradores (Pandey, 1990a; Pandey, 1990b) que sintetizaram dímeros e trímeros tipo éter e

observaram igualmente que o dímero era inativo enquanto os trímeros possuíam atividade semelhante ao Photofrin<sup>®</sup>. Além disso, foram sintetizados também dímeros ligados entre si por grupos vinílicos e estes apresentaram atividade fotodinâmica.

Uma nova tentativa elucidativa das estruturas dos componentes do Photofrin<sup>®</sup> foi realizada por Byrne e colaboradores (Byrne, 1990). Neste trabalho, o Photofrin<sup>®</sup> foi analisado concluindo-se que sua constituição aproximada seria de 15% de monômeros, 10 a 20% de material ligado através de éster, 20 a 30% ligados por éter e que a maioria do material, 35 a 50%, seria ligado por meio de ligações vinílicas. Pequenas mudanças estruturais por meio de derivatizações foram realizadas no intuito de se comparar os resultados finais e estas sugeriram que o material ativo do Photofrin<sup>®</sup> seria formado por dímeros e trímeros, ligados por meio de ligações vinílicas e tipo éter.

Owens e colaboradores (Owens, 1996) estudaram outros dímeros e trímeros de porfirinas por HPLC no intuito de comparar seus tempos de retenção com os compostos do Photofrin<sup>®</sup>. Estes autores sugeriram que, talvez, alguns talvez, possam estar entre os constituintes do Photofrin<sup>®</sup>.

Alguns autores empregaram a eletroforese capilar na análise do HpD (Chan, 1993) e do Photofrin<sup>®</sup> (Bowser, 1996) respectivamente. Os estudos realizados por Chan (Chan, 1993) encontraram dados muito semelhantes aos resultados dos seus predecessores que utilizaram HPLC. De fato, foi constatado que a região onde se encontrava a fração oligomérica apresentava sinais largos e com baixa resolução. Bowser (Bowser, 1996) em seu trabalho sugeriu a existência de até 60 compostos presentes no Photofrin<sup>®</sup>, sendo a maioria constituída de isômeros.

As análises do HpD e do Photofrin<sup>®</sup>, como citado anteriormente, têm se apresentado como um grande desafio para os pesquisadores envolvidos com terapia fotodinâmica. Apesar de ser o único fotossensibilizador autorizado pelo FDA específico para ser empregado em TFD, as estruturas dos componentes do Photofrin<sup>®</sup> até hoje não estão completamente elucidadas. Os problemas encontrados nos trabalhos citados podem ser explicados pela dificuldade de se

encontrar o reagente hematoporfirina puro (Owens, 1995), sem a presença de isômeros. A presença destes isômeros torna complicada a análise dos produtos nas etapas subseqüentes da síntese, já que estes isômeros também fazem parte da reação, ocorrendo o aumento em progressão geométrica da quantidade de compostos do HpD, origem do Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup> e Photosan<sup>®</sup>. Outra dificuldade pode estar relacionada aos intermediários de síntese mono e diacetato de porfirina, porque esta classe de compostos apresenta o inconveniente de não ser estável, ocorrendo a perda do grupo acetato com o decorrer do tempo e de haver polimerização heterogênea, que torna mais complicada a análise.

Um fato importante que deve ser mencionado é a disposição de três fotossensibilizadores para serem empregados em TFD. Estas drogas são, o Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup> e o Photosan<sup>®</sup>. A única diferença entre os fotossensibilizadores esta no processo de enriquecimento da fração oligomérica.

### **1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA NO BRASIL**

#### **1.3.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

No Brasil, a TFD aplicada ao tratamento do câncer foi implantada em 1999 sob a coordenação do Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato do IFSC-USP (CEPID em Óptica e Fotônica). Em 2001, iniciaram-se as colaborações com o Dr. Guilherme Cestari Filho, médico do Hospital Amaral Carvalho em Jaú e com a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Entretanto, esta modalidade de tratamento contra o câncer enfrenta uma certa resistência da classe médica devido, principalmente, à falta de informações referentes à sua eficácia e ao conhecimento restrito com relação aos seus efeitos colaterais. Assim sendo, esforços têm sido empreendidos no sentido de se divulgar de uma forma mais didática e convincente as características da metodologia em questão. Portanto, o esclarecimento quanto

à potencialidade da TFD a um número cada vez maior de profissionais da área de saúde e o acesso destes profissionais a uma infra-estrutura adequada para a implementação dessa terapêutica têm constituído uma prioridade por parte dos pesquisadores que constituem o grupo pioneiro em TFD no Brasil.

Portanto, além de buscar uma maior difusão da TFD no território nacional, uma das prioridades destes referidos grupos brasileiros consiste no desenvolvimento de esforços visando à implantação de uma metodologia clínica adequada à aplicação desta técnica no Brasil. Desta maneira, realizou-se uma série de colaborações com grupos de pesquisa de diferentes países como o grupo de T. Mang e R. Allison, dos EUA e, posteriormente, com o grupo de D. Stranadko e V. Sokolov, da Rússia. Essas interações internacionais proporcionaram um maior conhecimento dos procedimentos utilizados no desenvolvimento da pesquisa em TFD assim como no emprego prático de procedimentos clínicos para o tratamento do câncer propriamente considerado. Neste contexto, tem sido possível um desenvolvimento bastante acentuado de metodologias condizentes com a realidade brasileira, respeitando-se as dificuldades inerentes ao nosso país, tanto no que se refere à pesquisa quanto no que diz respeito ao próprio tratamento clínico (Bagnato, 2005, Kurachi, 2002).

Neste contexto, há de se acrescentar que os hospitais especializados no tratamento do câncer estão concentrados nos grandes centros urbanos do nosso país, dificultando o acesso da população do interior a técnicas de tratamento que no momento são menos difundidas como é o caso da TFD. Realmente, mesmo técnicas mais consagradas como a radioterapia e a quimioterapia não se encontram tão facilmente disponíveis à população pertencente a vários bolsões afastados das capitais e das grandes cidades.

De fato, os impedimentos sócio-econômicos em nosso país constituem um fator limitante à integração entre os institutos de pesquisa e os hospitais especializados no tratamento do câncer, e têm dificultado, porém não impedido totalmente, o avanço da TFD no Brasil.

Assim sendo, o Photogem<sup>®</sup> foi escolhido para ser utilizado como fotossensibilizador no Brasil em função do seu custo ser mais baixo que o de seus concorrentes que são o Photofrin<sup>®</sup> e o Photosan<sup>®</sup>.

### **1.3.2 O EMPREGO DO PHOTOGEM<sup>®</sup> NO BRASIL**

Tendo-se em vista o grande potencial no emprego do Photogem<sup>®</sup> no Brasil pelos motivos discutidos no tópico anterior, procedeu-se o tratamento de mais de 400 pacientes portadores de diferentes tipos de cânceres, sendo que foram obtidos resultados satisfatórios e promissores. As neoplasias tratadas foram, predominantemente, de pele e cavidade oral, além de alguns casos de câncer do esôfago, do pulmão, das vias aéreas e da mama (Bagnato, 2005; Kurachi, 2002).

Desta forma, a resistência inicial oferecida pelos médicos está sendo superada pelo sucesso verificado nos tratamentos supracitados haja vista os resultados satisfatórios obtidos, que abrangem excelente cicatrização e aumento da qualidade de vida do paciente. Este segundo fator é extremamente relevante porque o tratamento contra o câncer é traumático devido aos efeitos colaterais intensos e desagradáveis mostrados pelas terapias convencionais, tais como a radioterapia e quimioterapia (INCA, 2006). Tais reações adversas muitas vezes impedem uma vida normal aos pacientes, limitando, freqüentemente de forma dramática, suas capacidades de trabalho e de vida social.

No que se refere à conhecida fotossensibilidade cutânea, é importante registrar que na maioria dos casos essa dificuldade tem sido administrada com relativa facilidade pelos pacientes, principalmente após as primeiras semanas do tratamento por TFD.

É importante afirmar que resultados positivos neste trabalho foram obtidos em vários campos de atuação, especialmente no que se refere à elaboração de uma metodologia clínica para TFD no Brasil. De fato, também tem sido logrado um significativo sucesso na fabricação de uma fonte de luz,

que é fundamental nesta terapia fotodinâmica. A fabricação dessa fonte de luz nacional e com preço competitivo em relação aos similares importados pode ser considerada uma das grandes conquistas em TFD no Brasil. Contudo, ainda há aspectos a se estudar na metodologia clínica, como, por exemplo, a dose do agente sensibilizador a se utilizar e a dose de luz empregada no tratamento. Todavia, apesar das dificuldades iniciais, estes resultados realmente são promissores, e devem ser enfatizados tendo-se em vista o número de pacientes que podem ser beneficiados por esta técnica (Bagnato, 2005; Kurachi, 2002).

Além do uso em tratamento do câncer, estão sendo estudadas outras aplicações para TFD no Brasil. Um exemplo que ilustra essa grande variedade de aplicações que a TFD apresenta, consiste no emprego desta técnica terapêutica no tratamento da degeneração macular da retina e em investigações de outras moléstias na mácula, como, por exemplo, a miopia patogênica, que é tratada através da utilização de um outro sensibilizador, a benzoporfirina, que possui o nome comercial Visudyne<sup>®</sup> (Simplicio, 2002).

Dentro deste contexto, o presente trabalho tem como enfoque principal a investigação dos componentes majoritários constituintes do Photogem<sup>®</sup>. Realmente, há um grande interesse em se conhecer as estruturas das frações monomérica e oligomérica porque, apesar deste sensibilizador ser utilizado há algum tempo em tratamento clínico, as estruturas dos compostos ativos são pouco conhecidas e esta mistura é utilizada como referência no desenvolvimento de novos fotossensibilizadores.

Serão utilizadas técnicas cromatográficas visando à preparação da amostra e separação dos seus constituintes. É interessante mencionar que essa contribuição na elucidação das estruturas dos compostos será efetuada através de espectrometria de massa e espectroscopia de absorção eletrônica na região do ultravioleta-visível.

## II. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo os seguintes tópicos:

- Desenvolver uma metodologia acessível de separação dos componentes majoritários do Photogem<sup>®</sup>;
- Empreender testes biológicos preliminares visando a uma maior compreensão da ação terapêutica de cada fração específica;
- Contribuir na caracterização dos componentes do Photogem<sup>®</sup> através de diferentes técnicas instrumentais;

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

##### 3.1.1 MATERIAIS UTILIZADOS

3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) –, Sigma-Aldrich, EUA;

Cartucho para Extração em Fase Sólida C<sub>18</sub>(octadecilsilano), 1g (6 cm<sup>3</sup>), Accubond II, Agilent Technologies, EUA;

Cartucho para Extração em Fase Sólida C<sub>18</sub>(octadecilsilano), 2g (12 cm<sup>3</sup>) e 10g (35cm<sup>3</sup>), Sep-Pack, Waters, EUA;

Cloreto de potássio PA, 1 Kg, Merck, Brasil;

Cloreto de sódio cristalino PA, 1Kg, Merck, Brasil;

Coluna Analítica para HPLC, L = 150 cm, DI = 4,6 mm, 5μ de diâmetro de partícula, Rexchrom, Bodman Industries, EUA;

Diclorometano PA, 1L, Synth, Brasil;

Fosfato de potássio monobásico PA, 500g, Quimis, Brasil;

Fosfato de sódio dibásico anidro PA, 500g, Quimis, Brasil;

Linhagem de células normais de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*);

Linhagem de células tumorais de laringe humana (Hep-2);

Meio EAGLE de cultura celular, Sigma-Aldrich, Reino Unido;

Meio DMEM de cultura celular, Sigma-Aldrich, Reino Unido;

Metanol grau HPLC, 4L, JT Baker, EUA;

Penicilina e estreptomicina, 5mL, (Penicilina 10.000 UI mL<sup>-1</sup> e estreptomicina 10mg mL<sup>-1</sup>), Cultilab, Brasil;

Photogem<sup>®</sup>, 200 mg, High Technology Chemistry Institute of Moscow, Rússia;

Soro fetal bovino, Cultilab, Brasil.

### 3.1.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Contador de células Lion number-matic, Taiwan;  
Concentrador de amostras Savant modelo Speed Vac, EUA;  
Cromatógrafo líquido Shimadzu equipado com detector de fotodiodo, bombas LC-10AD e módulo central de comunicações CBM-10A, Japão;  
Espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1601PC, Japão;  
Espectrômetro de massa Micromass modelo Quatro II, EUA;  
LED de 630 nm;  
Microscópio Olympus modelo CHS, Japan;  
Sistema de Filtração de água da Millipore modelo Milli-Q Academic A10, EUA.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 INVESTIGAÇÃO INICIAL DO FOTOSSENSIBILIZADOR

Amostra de 1mL com concentração de  $50\mu\text{g mL}^{-1}$  de Photogem<sup>®</sup> solubilizada em tampão fosfato salino (PBS)  $0,14\text{mol L}^{-1}$  a pH 7,2 foi submetida a uma extração em fase sólida com eluição seletiva. Utilizou-se um cartucho contendo 2g de sorbente octadecilsilano ( $\text{C}_{18}$ ) ocupando um volume de  $12\text{cm}^3$ . Para a eluição seletiva utilizou-se a seguinte seqüência de eluentes: 20mL de água, 10mL de soluções aquosas com concentrações crescentes de metanol a partir de 10%, até ser alcançado metanol puro, seguido de 10mL de solução diclorometano/metanol 1:1 e 20mL de diclorometano. Foram coletadas 132 alíquotas de 1mL cada e monitorou-se a separação através de absorção na região do visível, em 400nm.

### 3.2.2 LIMPEZA (CLEAN-UP) DO PHOTOGEM<sup>®</sup>

Amostra de 0,8mL ( $1\text{mg mL}^{-1}$ ) de Photogem<sup>®</sup> solubilizada em tampão PBS  $0,14\text{mol L}^{-1}$  a pH 7,4 foi submetida a uma extração em fase sólida

utilizando cartucho contendo 2g de sorbente octadecilsilano ( $C_{18}$ ) ocupando um volume de  $12\text{cm}^3$ . Em seguida, eluiu-se com 10mL de água, onde se aplicou pressão com a ajuda de um êmbolo de uma seringa a uma vazão aproximada de  $2\text{mL min}^{-1}$  e coletou-se a solução em um béquer. O processo foi repetido com 10mL de metanol, 10mL de uma solução metanol/diclorometano 1:1 e 20mL de diclorometano para a lavagem final do cartucho. Obteve-se quatro frações neste procedimento.

### 3.2.3 PRÉ-FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO METANÓLICA

Amostra de três mililitros ( $1,5\text{mg mL}^{-1}$ ) da fração metanólica do Photogem<sup>®</sup> obtida na etapa de “clean-up” solubilizada em tampão PBS  $0,14\text{mol L}^{-1}$  a pH 7,4 foi submetida a uma extração em fase sólida com eluição seletiva. Neste procedimento foi empregado cartucho de extração em fase sólida contendo 10g de sorbente octadecilsilano ( $C_{18}$ ) ocupando um volume de  $35\text{cm}^3$ . Em seguida, para eluição usou-se um gradiente de concentração crescente de metanol em tampão PBS diluído a  $75\text{mmol L}^{-1}$ , iniciando-se com 40mL do tampão seguido de 40mL de soluções de metanol, variando-se de 10 em 10% (v/v), até metanol puro. Até metanol 50%, realizou-se a coleta de apenas uma única fração correspondente a cada solvente. Em seguida, coletaram-se frações de 4mL em tubos de ensaio individuais. Por fim, lavou-se o cartucho com 40mL de diclorometano. Com o objetivo de se obter uma vazão de  $4\text{mL min}^{-1}$ , aproximadamente, foi aplicada pressão com a ajuda de um êmbolo de uma seringa. O material eluído foi monitorado por medida de absorbância em 400nm. Obtiveram-se três frações mais abundantes nesta etapa, denominadas fração 1, fração 2 e fração 3.

### 3.2.4 ENSAIOS CITOTÓXICOS

Foram utilizados dois tipos de linhagens celulares: células tumorais de laringe humana - HEP-2 e células normais de rim de macaco verde africano

(*Cercopithecus aethiops*) - VERO. As células foram cultivadas em frascos de polipropileno em meio DMEM para células VERO e meio EAGLE para células HEp-2, com 10% de soro fetal bovino e os antibióticos penicilina e estreptomicina. Todas as manipulações com as células foram realizadas em câmara com fluxo laminar horizontal do ar. A câmara foi sempre previamente tratada com lâmpada germicida.

Nos experimentos citotóxicos utilizou-se placa de 96 poços, contendo em cada poço uma suspensão de  $1 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  em meio de cultura apropriado. As células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  sob atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24 h, o meio foi removido por aspiração e lavou-se a monocamada de células com tampão PBS. Preparou-se soluções do Photogem<sup>®</sup> e de suas respectivas frações com solução de SFB 3% na faixa de concentração de  $0$ - $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  que foram adicionadas aos poços contendo as células em triplicata. Estas soluções foram preparadas a partir de soluções estoque de Photogem e frações na concentração  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As células foram incubadas em estufa de cultura ( $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ ) por 18 h para a incorporação dos sensibilizadores pelas células. Após esse tempo de incubação, o excesso de sensibilizador foi eliminado lavando-se as células com PBS e adicionou-se meio de cultura específico para cada linhagem celular suplementado com 10% de SFB. Amostras contendo Photogem<sup>®</sup> e suas respectivas frações obtidas por meio de SPE foram irradiadas com um LED (diodo emissor de luz) em  $630 \pm 10\text{nm}$ . A intensidade do LED foi de  $25\text{mW cm}^{-2}$  – calibrada por meio de um medidor de potencia e aplicada durante 20min totalizando uma dose de  $20,7\text{J cm}^{-2}$ . Após a irradiação as células foram mantidas novamente na estufa de cultura por 48h. Após esse período de recuperação procedeu-se à determinação das células viáveis introduzindo-se 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio, MTT. Este método baseia-se na redução enzimática do MTT (Denizot, 1986), composto amarelo, a um produto chamado formazan, de coloração violeta, que absorve em 570nm. A redução é catalizada pela succinato-tetrazolio redutase mitocondrial e redutases extra mitocondriais (Bernas, 2002). Após 3h de

reação, o meio de cultura com o MTT remanescente é retirado e 50µl de etanol puro são adicionados. Após a dissolução completa do formazan formado, adicionou-se 150µl de PBS com isopropanol na proporção 1:1. A absorbância de cada poço da placa é lida em leitor Elisa com filtro em 550nm. Os resultados são apresentados por meio de gráficos da sobrevivência celular (%) em função da concentração do fotossensibilizador. Para obter o valor de IC<sub>50</sub> (índice de concentração inibitória), que mede a concentração da droga capaz de inviabilizar 50% da população de células, utilizou-se o programa CalcuSyn (Chou, 1996).

Os ensaios citotóxicos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Janice R. Perussi e a doutoranda Priscila F. C. Menezes do Grupo de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo.

### **3.2.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA (HPLC) DOS ANALITOS**

As três frações obtidas no procedimento anterior foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um cromatógrafo líquido. Utilizou-se uma coluna analítica de octadecilsilano (C<sub>18</sub>), de 15,0 cm de comprimento, diâmetro interno de 4,6mm e partículas de 5µm de diâmetro modelo Rexchrom S5-100-ODS. O eluente utilizado foi uma mistura de metanol com tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup> a pH 7,4, fluxo de 0,8mL min<sup>-1</sup> e um volume de amostra de 20µL. As condições de separação para as frações foram as seguintes:

Photogem<sup>®</sup> e sua respectiva fração metanólica: Gradiente de eluição com início em 50% até 98% metanol durante 55 minutos;

Fração 1 – Gradiente de eluição com início em 60 a 90% metanol por 30 minutos;

Fração 2 – Gradiente de eluição com início em 60 a 90% metanol durante 30 minutos;

Fração 3 – Gradiente de eluição com início em 60 a 90% metanol durante 40 minutos.

Os compostos majoritários obtidos após o procedimento cromatográfico de cada fração foram coletados em frascos separados e protegidos contra luz. Foi coletado um volume de 50mL de cada composto. Obtiveram-se cinco compostos majoritários no processo de separação, sendo os dois primeiros coletados na fração 1, os dois intermediários na fração 2 e o último na fração 3. Foi coletado um volume de 50mL de cada composto após a separação.

### **3.2.6 CONCENTRAÇÃO E EXTRAÇÃO DOS COMPONENTES ISOLADOS DA SOLUÇÃO SALINA APÓS CROMATOGRAFIA LÍQUIDA (HPLC)**

Os sais presentes na solução dos compostos isolados foram retirados por meio de extração em fase sólida. As soluções contendo os compostos isolados foram colocadas em tubos de centrifuga e secos em um concentrador centrífugo de amostras, à pressão reduzida e à baixa temperatura. Os compostos secos foram solubilizados em tampão PBS a  $75\text{mmol L}^{-1}$  e introduzidos em um cartucho de 1g ( $6\text{cm}^3$ ), contendo octadecilsilano ( $\text{C}_{18}$ ) como sorbente. Os analitos retidos no cartucho foram lavados com 50mL de água Milli-Q. Após a lavagem, usou-se 8mL de metanol grau HPLC para extrair os analitos do cartucho de SPE. As soluções contendo os respectivos analitos isolados e isentos de sais foram secos em um concentrador de amostras. Mediram-se as massas obtidas após a evaporação do solvente de cada composto purificado.

### **3.2.7 ANÁLISES DOS COMPOSTOS ISOLADOS POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV-VIS**

Os espectros eletrônicos na região do UV-VIS dos compostos isolados foram obtidos em um espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV-1601PC. Uma cubeta de quartzo de caminho óptico 1cm foi utilizada neste

experimento. Utilizou-se metanol grau HPLC como solvente e a faixa de varredura espectral utilizada foi na região de 200 a 700nm.

As massas conhecidas dos compostos foram diluídas em 0,5mL de metanol grau HPLC. Obtiveram-se espectros eletrônicos dos compostos isolados em diversas concentrações e foram utilizados os espectros de absorção dos compostos onde a absorbância foi entre 0,2 e 1 com o objetivo de se calcular o coeficiente de absorvidade molar dos compostos isolados.

### **3.2.8 ANÁLISES DOS COMPOSTOS ISOLADOS ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA**

As análises dos compostos isolados foram realizadas em um espectrômetro de massa Quatro II da Micromass. O modo de ionização utilizado neste experimento foi electrospray. Na aquisição do espectro de massa, utilizou-se um volume de 10 $\mu$ L de eluente, uma mistura acetonitrila/ácido fórmico 0,2%, injetados diretamente no espectrômetro. As amostras purificadas foram solubilizadas em metanol grau HPLC e injetou-se 1 $\mu$ L. As temperaturas de ionização e dessolvatação foram de 100 $^{\circ}$ C. Nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização numa pressão de 3,8x10 $^{-5}$  mbar. . No capilar do espectrômetro foi aplicada uma voltagem de 10 a 200V enquanto no cone de amostra foi aplicada uma voltagem de 10 a 70V. A faixa de varredura de m/z foi de 500 a 4000 Da e 100 a 2000 Da. As análises de espectrometria de massa foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Paolo Di Mascio e a Doutoranda Fernanda M. Prado do Laboratório de Estudo de Lesões em Biomoléculas do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

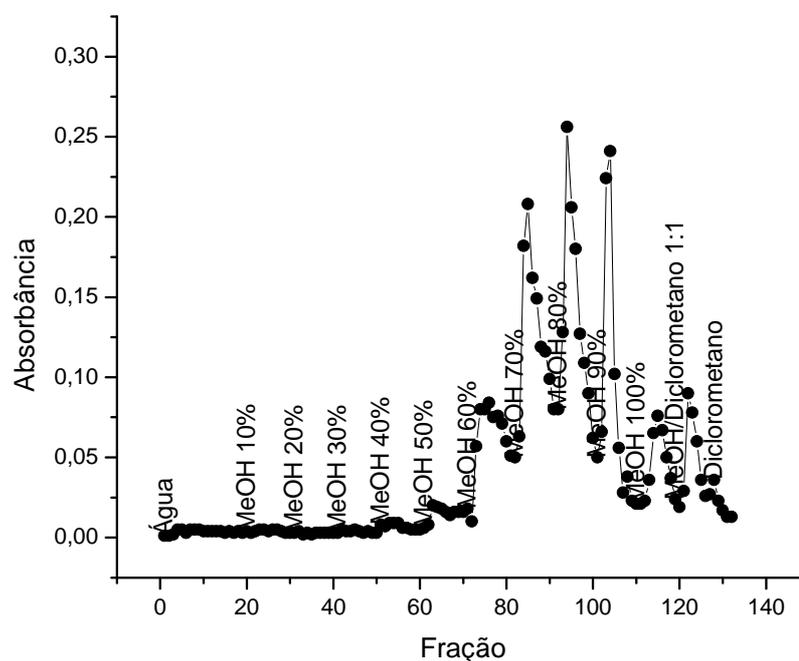
## **IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 INVESTIGAÇÃO INICIAL DO PHOTOGEM<sup>®</sup>**

#### **4.1.1 FRACIONAMENTO DO PHOTOGEM<sup>®</sup>**

As primeiras amostras de Photogem<sup>®</sup> estudadas estavam solubilizadas em PBS 0,14mol L<sup>-1</sup> em concentração de 25µg mL<sup>-1</sup>. No intuito de se investigar o perfil da amostra no que se refere à composição da mistura, esta foi submetida a uma extração em fase sólida com eluição seletiva em um cartucho de C<sub>18</sub>.

Este processo utilizou os seguintes eluentes: água, soluções de metanol e água, solução de diclorometano/metanol 1:1 e diclorometano puro. Vale lembrar que, com relação à solução aquosa de metanol, a percentagem desse álcool aumentava de 10 em 10 até ser alcançado metanol puro. Desta forma, foi possível a determinação de diferentes frações constituintes do Photogem<sup>®</sup>, em função das diferentes polaridades de cada fração. Mediu-se a absorbância de cada fração em 400 nm. O cromatograma ilustrado na Figura 6 mostra os resultados desta investigação inicial.



**Figura 6** – Fracionamento do Photogem utilizando-se cartucho de extração em fase sólida  $C_{18}$  e diferentes solventes em uma escala decrescente de polaridade.

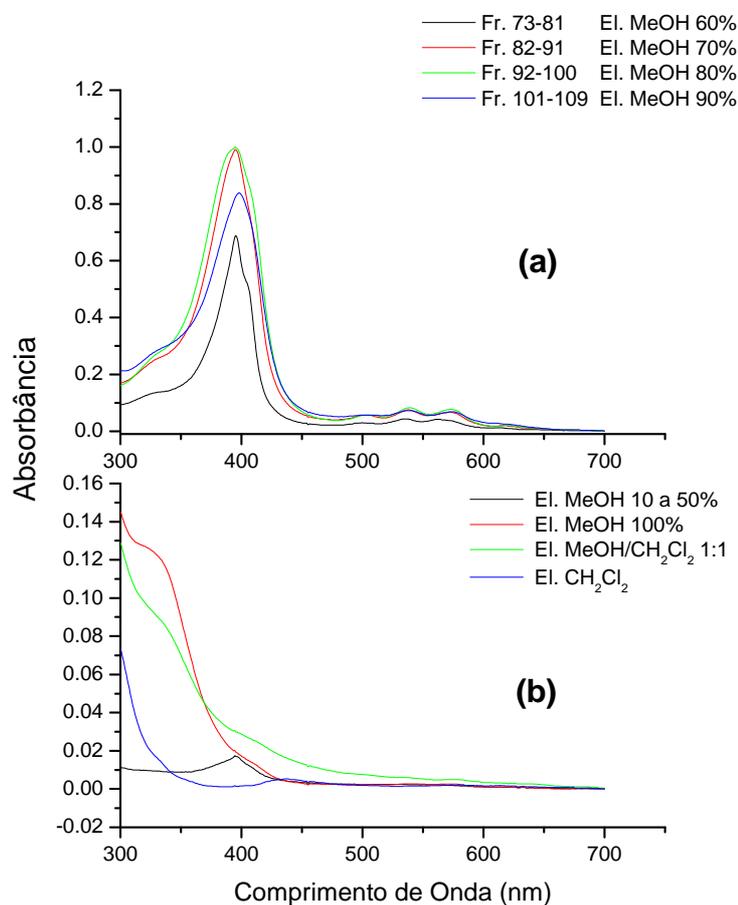
Neste experimento foi observada a presença de nove frações, o que já ilustra a complexidade da mistura que constitui o agente fotosensibilizador em questão.

#### 4.1.2 ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV-VIS DAS FRAÇÕES OBTIDAS NA INVESTIGAÇÃO INICIAL DO PHOTOGEM®

Ao se medir a absorção na região do UV-Vis, verificou-se, na prática, oito frações diferentes. A denominada fração inicial apresentou o tempo de retenção menor (fr. 20-72). Esta fração apresentou um espectro muito ruidoso, com uma banda larga na região em 550nm e outra banda mais intensa em 395nm. Há

outras quatro frações, chamadas frações intermediárias, que apresentam espectros de absorção na região do ultravioleta-visível muito semelhantes ao espectro do Photogem<sup>®</sup>. Subseqüentemente, foram detectadas outras três frações, que constituíram as frações finais do cromatograma, ou seja, as frações mais hidrofóbicas do Photogem<sup>®</sup>. Estas frações foram denominadas fração 110-119, fração 120-129 e fração 130-132. O espectro de absorção eletrônica da fração 110-119 apresentou um ombro em 329nm, enquanto a fração 120-129 mostrou um ombro localizado em 333nm e a fração 130-132 apresentou uma banda em 438nm, conforme a Figura 7.

Esses quatro espectros referentes às frações finais do cromatograma são diferentes do perfil espectral predominante no espectro de absorção do Photogem<sup>®</sup>, como está ilustrado na Figura 7, o que poderia sugerir que estas frações finais não constituem tetraazamacrociclos porfirínicos propriamente ditos.



**Figura 7** – Oito frações isoladas do Photogem<sup>®</sup> na investigação inicial. Estas frações estão divididas em dois grupos: (a) quatro frações apresentando espectros de absorção semelhantes aos espectros característicos de porfirinas; (b) quatro frações apresentando espectros de absorção significativamente diferenciados em relação aos espectros característicos de porfirinas.

### **4.1.3 ANÁLISE DO PROCEDIMENTO UTILIZADO NA INVESTIGAÇÃO INICIAL**

Esta análise teve dois objetivos iniciais, sendo o primeiro o fracionamento do fotossensibilizador e o segundo, a eliminação dos sais do tampão presente na amostra. Do ponto de vista analítico, estes sais consistem em interferentes nas análises instrumentais posteriores. Segundo a literatura (Byrne, 1987; Moan, 1986) os derivados de hematoporfirina devem ser estocados em solução tamponada em pH 7,4 ou devem estar liofilizados, caso contrário, (Kessel, 1985b) haverá mudanças estruturais em seus compostos. Estes compostos são sensíveis a mudanças de pH, podendo sofrer tanto hidrólise ácida ou básica (Kessel, 1987) e, por conseqüência, resultando em degradação de seus constituintes.

Uma dificuldade encontrada neste procedimento de obtenção das frações do Photogem<sup>®</sup> foi a saturação do cartucho com o aumento da quantidade de amostra introduzida. O sistema funcionava de maneira razoável com até 1mL da amostra de concentração 25µg mL<sup>-1</sup>, o que impossibilitaria qualquer tipo de análise espectroscópica posterior devido a pouca quantidade de amostra disponível. Esse problema foi contornado através de um procedimento de limpeza no sistema, com a finalidade de se eliminar apenas as impurezas, tanto as iniciais quanto as finais da amostra de Photogem<sup>®</sup>, possibilitando a obtenção de uma quantidade de material maior para as futuras análises.

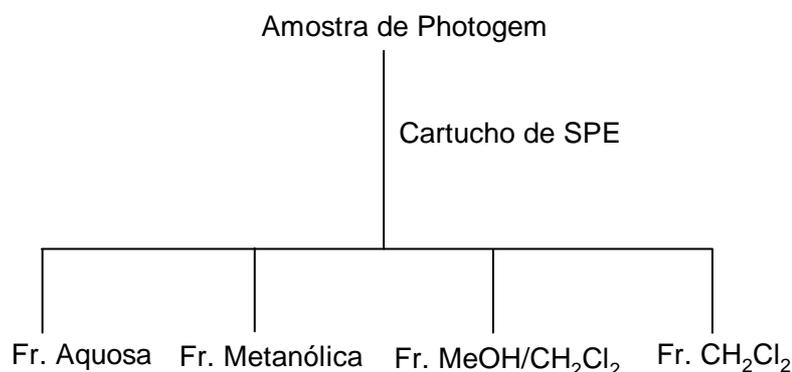
## **4.2 PROCEDIMENTO DE LIMPEZA (“CLEAN-UP”) DO PHOTOGEM<sup>®</sup>**

### **4.2.1 LIMPEZA DO PHOTOGEM<sup>®</sup> ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**

Neste experimento, uma amostra de concentração 1mg mL<sup>-1</sup> foi aplicada no cartucho para extração em fase sólida. Em seguida, utilizaram-se quatro

eluentes diferentes, água Milli-Q, metanol, solução metanol/diclorometano 1:1 e diclorometano. A partir das investigações iniciais, ficou bem estabelecido que, coletando-se cada solução em um béquer separado, os analitos de interesse seriam eluídos pela fase móvel metanólica. Neste contexto, a parte restante, consistindo das impurezas mais apolares e, por conseqüência, mais solúveis em solventes mais hidrofóbicos, eluiriam na solução metanol/diclorometano 1:1 e diclorometano puro. Vale lembrar que, neste caso, os sais provenientes do tampão seriam eliminados da amostra pela eluição da água.

Este procedimento supracitado foi elaborado utilizando-se como referencial o cromatograma da Figura 6. Realmente, este procedimento é bastante acessível e simples, além de ser relativamente rápido e proporcionar a introdução de uma maior quantidade de analitos de interesse visando a posteriores análises instrumentais e aplicações em testes biológicos. A seguir está ilustrado um esquema do procedimento de limpeza da amostra.



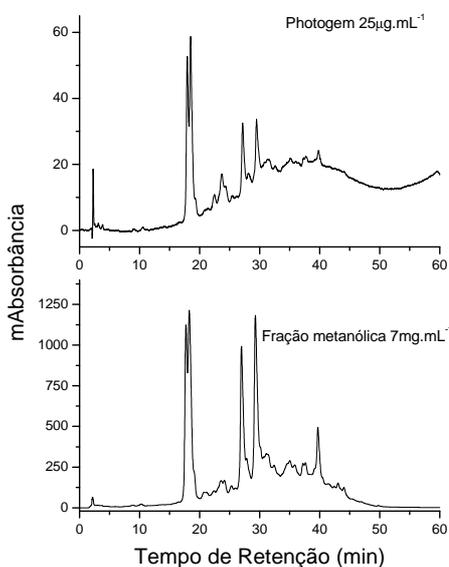
### Esquema 1 – Clean-up (limpeza) da amostra de Photogem<sup>®</sup>

Como descrito anteriormente, a fração metanólica apresenta o espectro de absorção semelhante ao espectro da mistura sem nenhum tratamento prévio. É relevante mencionar que o rendimento da fração metanólica em relação ao sensibilizador original é de aproximadamente 80%, ou seja, 20% do

Photogem<sup>®</sup> é formado por substâncias que não exibem um espectro de absorção eletrônico semelhante ao de porfirinas.

#### **4.2.2 ESTUDO COMPARATIVO DO PHOTOGEM<sup>®</sup> E SUA RESPECTIVA FRAÇÃO METANÓLICA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA**

De acordo com o que foi descrito anteriormente, o derivado de hematorporfirina possui certas particularidades a respeito de como deve ser estocado e quanto aos cuidados que devem ser tomados com o intuito de se evitar que os compostos se degradem ou sofram algum tipo de modificação estrutural. Conforme descrito anteriormente, os compostos constituintes do Photogem<sup>®</sup> são compostos instáveis, e que as condições de estocagem podem ser cruciais, mesmo durante sua síntese, para a formação final dos compostos. Uma importante etapa deste trabalho foi a de se checar, através de HPLC, se esta etapa de limpeza da amostra, e principalmente, sua lavagem com água, se a integridade dos compostos do Photogem<sup>®</sup> estava sendo mantida. O resultado deste experimento está na Figura 8.



**Figura 8**– Estudo comparativo da amostra de Photogem<sup>®</sup> e de sua fração metanólica. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 50 a 98% de metanol durante 55min; volume de amostra na injeção: 20µL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorbância monitorada em 400nm.

Uma grande preocupação deste trabalho foi com relação a integridade estrutural dos compostos analisados. Conforme descrito anteriormente, a instabilidade destes compostos foi motivo de um cuidado adicional com o método utilizado para limpeza da amostra. Não havia na literatura uma tentativa de limpeza ou “clean-up” da mistura chamada derivado de hematoporfirina antes de se prosseguir com as devidas análises instrumentais.

Todos os artigos consultados descreviam medidas diretas deste derivado, ou seja, a amostra era analisada por diferentes técnicas cromatográficas ou espectroscópicas sempre sem um preparo de amostra prévio.

O experimento realizado neste trabalho prova que o perfil cromatográfico da amostra permanece o mesmo depois da limpeza e o mais relevante, ocorre

uma sensível diminuição do alargamento de banda localizado após a eluição dos monômeros (Byrne, 1990; Dougherty, 1987b; Kessel, 1987) entre a região de 20 e 50 minutos, mesmo a fração metanólica possuir, aproximadamente, concentração 280 vezes superior ao fotossensibilizador sem nenhum preparo de amostra.

Como descrito anteriormente, o fotossensibilizador em questão é formado por aproximadamente, 20 a 15% de um material mais apolar e que apresenta espectro eletrônico diferente de porfirinas. Observou-se, após a retirada deste material, uma sensível melhora na separação dos compostos verificados por meio do cromatograma, então se pode sugerir que a presença deste material apolar prejudica a separação dos compostos do fotossensibilizador, mesmo sua quantidade não sendo preponderante sobre todo o fotossensibilizador, poderiam ter um papel significativo nos fracassos anteriores de separação dos compostos desta mistura.

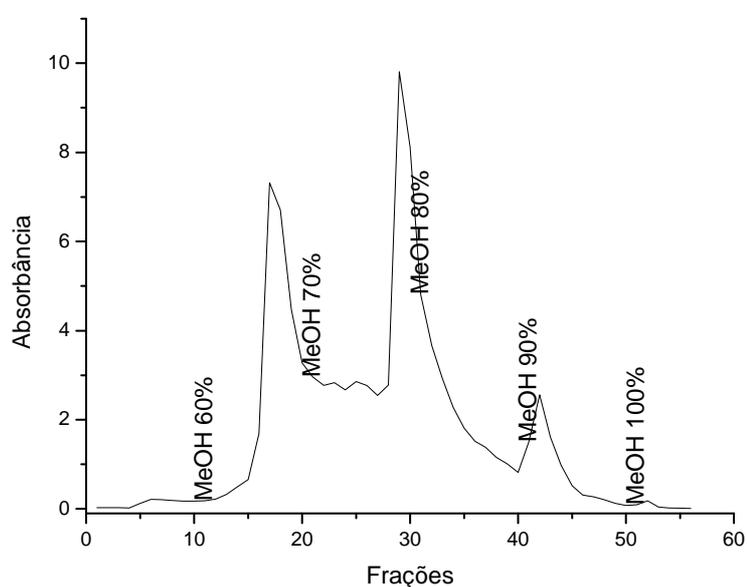
### **4.3 FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO METANÓLICA DO PHOTOGEM®**

#### **4.3.1 PRÉ-SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES QUE FORMAM A FRAÇÃO METANÓLICA DO PHOTOGEM® POR MEIO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)**

Examinou-se o cromatograma da Figura 6 e este utilizado como referência. Foi observada neste cromatograma a presença de alguns contaminantes na região de eluição entre as soluções que apresentam de 10 até 50% de metanol/água. Devido a este fato, foi efetuada nova extração em fase sólida através de uma eluição mais seletiva, muito semelhante, portanto, ao primeiro experimento. Essa análise foi desenvolvida com o objetivo duplo de se eliminar estes últimos contaminantes presentes na fração metanólica e fracionar a mistura para viabilizar seu isolamento por cromatografia líquida de alta eficiência.

Para esse objetivo foi empregado um cartucho contendo 10 gramas de sorbente C<sub>18</sub> visando ao aumento da concentração inicial da amostra. Por conseqüência, obteve-se uma maior recuperação de compostos para análises posteriores. Optou-se pela utilização de uma solução de PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup> ao invés de água Milli-Q, na tentativa de se evitar quaisquer degradações ou mudanças estruturais nos compostos a serem analisados.

O cromatograma que ilustra os resultados obtidos está ilustrado na Figura 9. Observou-se que a ordem de eluição de cada fração seguiu a diminuição da polaridade de cada solvente utilizado na extração em fase sólida. Neste experimento foram obtidas três frações separadas segundo sua polaridade. A fração 1 é formada por compostos mais polares, enquanto a fração 2 é constituída por componentes que exibem uma polaridade intermediária. Por sua vez, a fração 3 é formada por compostos menos polares.



**Figura 9** – Cromatograma da separação preliminar da fração metanólica do Photogem<sup>®</sup> obtida por extração em fase sólida.

O rendimento de cada fração obtida no procedimento preliminar de separação da fração metanólica do Photogem<sup>®</sup> foi ilustrado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Rendimento da separação preliminar da fração metanólica utilizando-se SPE na amostra referente à fração metanólica.

Fração 1	Fração 2	Fração 3	Rendimento total
15,0%	60,7%	16,3%	90%

Neste experimento, foram determinadas as percentagens relativas aos componentes presentes na fração metanólica do Photogem<sup>®</sup>. Este foi um dado relevante para se conhecer a natureza dos constituintes do sensibilizador em questão. Observou-se que o agente sensibilizador é, em sua maioria, formado por componentes de polaridade intermediária em relação aos outros dois grupos de compostos que, somados, formam este fotossensibilizador.

É importante ressaltar que a técnica da extração em fase sólida não permite o isolamento dos compostos que compõem o sensibilizador. Observando-se a linha de base do cromatograma referente ao procedimento preliminar de separação, verificou-se que não houve isolamento total dos componentes que formam o sensibilizador.

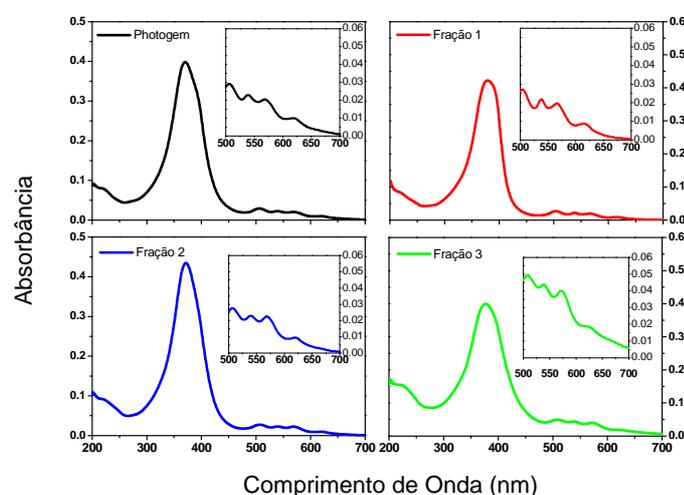
Uma limitação da extração em fase sólida (SPE) consiste no fato de que este procedimento não permite a separação de misturas complexas devido ao tamanho relativamente grande das partículas que formam sua fase estacionária. A SPE foi desenvolvida, a priori, para a limpeza e pré-fracionamento de misturas complexas (Lanças, 2004; Berrueta, 1995), mas, de qualquer maneira, o emprego desta técnica na limpeza e fracionamento do Photogem<sup>®</sup> se mostrou eficiente.

A vantagem em se fracionar os componentes que formam o agente fotossensibilizador estudado foi a possibilidade de se estudar a atividade

biológica de cada fração enriquecida de seus componentes principais. A atividade biológica foi analisada em células normais e tumorais com o intuito de se verificar qual fração apresentaria a maior atividade. Além disso, esse procedimento permitiu investigar se a atividade biológica observada no Photogem<sup>®</sup> é o resultado de um componente em especial ou é consequência da soma das atividades individuais de cada grupo de compostos. Este estudo será descrito na seção posterior.

#### 4.3.2 ANÁLISE DAS FRAÇÕES 1, 2 E 3 POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

As frações obtidas por meio da extração em fase sólida foram analisadas por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível. A Figura 10 ilustra os resultados obtidos neste experimento.



**Figura 10** – Espectro eletrônico do Photogem<sup>®</sup> e de suas respectivas frações 1, 2 e 3; Concentrações utilizadas: Photogem<sup>®</sup> 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; fração 1 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; fração 2 35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; fração 3 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; caminho óptico 0,2; solvente utilizado: tampão PBS.

Observando-se os respectivos espectros, é importante ressaltar que todas as frações analisadas apresentaram bandas similares àquelas referentes ao espectro característico do Photogem<sup>®</sup>. Portanto, este fato sugere que não houve mudanças estruturais ou degradação nos componentes presentes em cada fração resultante da separação preliminar do sensibilizador em estudo.

As frações separadas apresentaram uma absorvidade diferente da mistura que compõe o fotossensibilizador em questão. A fração 1 apresentou uma maior absorvidade, enquanto a fração 2 apresentou uma absorvidade intermediária. A fração 3 apresentou a menor absorvidade entre as três frações isoladas. Esta análise experimental indica que os constituintes que formam cada fração apresentam estruturas diferentes entre si. Esta discussão será retomada posteriormente, na seção 4.6.

#### **4.4 ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DO PHOTOGEM<sup>®</sup> APÓS FRACIONAMENTO**

##### **4.4.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

As três frações obtidas com o fracionamento da fração metanólica do Photogem<sup>®</sup> foram secadas sob vácuo e a baixa temperatura, pesadas e estocadas a  $-4^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da citotoxicidade em linhagem de células normais de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*) - VERO e linhagem de células tumorais de laringe humana - HEp-2.

Estes ensaios biológicos preliminares foram desenvolvidos utilizando Photogem<sup>®</sup> e suas respectivas para avaliar as suas toxicidades intrínsecas (na ausência de irradiação) e suas toxicidades fotossensibilizadas (sob irradiação em 630nm). Estes experimentos foram empreendidos utilizando-se tanto células normais como células cancerosas.

Em TFD é fundamental que o agente fotossensibilizador apresente uma atividade fotodinâmica mais intensa em células neoplásticas do que em células normais e esse tipo de avaliação da seletividade do fotossensibilizador às

células cancerosas é tão importante quanto a determinação da citotoxicidade propriamente considerada. De fato, a inevitável destruição de tecidos saudáveis é um dos grandes problemas inerentes às terapêuticas que combatem o câncer e a minimização dessa dificuldade, que indica pouca seletividade do sensibilizador em relação ao tecido canceroso, consiste em um importantíssimo objetivo a ser alcançado pelos pesquisadores da área em questão.

Outro aspecto relevante a ser observado é a citotoxicidade do fotossensibilizador na ausência de incidência de luz. É de suma importância que a droga apresente uma baixa toxicidade tanto em células tumorais quanto em células normais na ausência de radiação para que o efeito terapêutico da droga seja restrito ao efeito fotodinâmico propriamente dito e não constitua em um efeito associativo da toxicidade da droga somado ao efeito fotodinâmico.

As amostras foram analisadas utilizando-se intensidade, dose e tempo de irradiação constantes. A intensidade de luz ( $I$ ) é definida como a quantidade de fótons por unidade de tempo que atinge uma unidade de área do alvo que equivale, portanto, à energia da radiação é dada pela equação **(1)**:

$$E = Nh\nu \quad (1)$$

onde:

$N$  = quantidade de fótons;

$h$  = constante de Planck;

$\nu$  = frequência.

Essa intensidade de luz é expressa em  $\text{mW cm}^{-2}$  ou  $\text{W m}^{-2}$ . A quantidade de luz transmitida durante todo o intervalo de tempo é definida como dose de luz ( $D$ ), que, por sua vez, é expressa em  $\text{J cm}^{-2}$  ou  $\text{kJ m}^{-2}$ . A relação entre intensidade de luz, dose de luz e tempo de irradiação é dada pela equação **(2)** abaixo:

$$I = D t^{-1} \quad (2)$$

onde:

$I$  = intensidade de luz em  $\text{mW cm}^{-2}$ ;

$D$  = dose de luz em  $\text{J cm}^{-2}$ ;

t = tempo de irradiação em segundos;

1J = 1W segundo.

#### 4.4.2 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM LINHAGEM DE CÉLULAS NORMAIS (VERO) COM O PHOTOGEM<sup>®</sup> E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES

Realizaram-se testes de citotoxicidade em linhagem de células VERO na ausência e presença de luz. Os resultados destes ensaios preliminares estão representados na Tabela 2, a seguir.

**Tabela 2:** Ensaios biológicos com Photogem<sup>®</sup> e com suas respectivas frações (Frações 1, 2 e 3) na ausência e na presença de radiação de comprimento de onda 630 nm em células normais (VERO), D = 20,7 J cm<sup>-2</sup>, t = 23min e I= 15mW cm<sup>-2</sup>.

VERO	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) ± DP			
	Photogem <sup>*</sup>	F1 <sup>*</sup>	F2 <sup>*</sup>	F3 <sup>*</sup>
Ausência de luz	5,7± 0,1	4,6±0,2	1,0±0,3	23,2± 1,4
Presença de luz	3,5± 0,2	2,1±0,7	0,6±0,1	15,1±2,4

\* 3 experimentos realizados.

A atividade biológica do fotossensibilizador pode ser expressa em termos de valores de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>). O IC<sub>50</sub> é a concentração de fotossensibilizador necessária para extinguir 50% da população celular presente na amostra analisada.

É interessante comparar os IC<sub>50</sub> do Photogem<sup>®</sup> propriamente dito com os IC<sub>50</sub> referentes às frações isoladas do Photogem<sup>®</sup>, F1, F2 e F3, respectivamente.

A fim de estabelecer as comparações entre os IC<sub>50</sub> médios das frações, todos os dados foram submetidos ao teste t de Student com até 99,95% de confiança dado pela equação (3) a seguir:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{V_1}{n_1} + \frac{V_2}{n_2}}} \quad (3)$$

onde:

onde  $\bar{x}_1$  e  $\bar{x}_2$  são as médias e  $V_1$  e  $V_2$  são as variâncias, isto é os quadrados dos respectivos desvios-padrão e finalmente  $n_1$  e  $n_2$  são os números de replicatas dos experimentos. Como os experimentos foram realizados em triplicata, o grau de liberdade total foi considerado como 4, isto é  $n-2$ . As médias foram consideradas iguais quando  $t < 2,2328$ .

Nesta série de experimentos observou-se a citotoxicidade isolada do efeito fotodinâmico exibido pelo fotossensibilizador. A fração F1 apresenta uma ação tóxica ( $1,24 \pm 0,07$ ) vezes maior que o Photogem<sup>®</sup>, enquanto que F2 apresentou uma toxicidade ( $6 \pm 1$ ) vezes maior que o Photogem<sup>®</sup>. A fração F3, por sua vez, exibiu uma citotoxicidade corresponde a ( $4,1 \pm 0,3$ ) inferior à citotoxicidade do fotossensibilizador.

#### **4.4.3 TESTE DE ATIVIDADE BIOLÓGICA EM LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS (HEp-2) COM O PHOTOGEM<sup>®</sup> E COM SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES**

Realizaram-se testes preliminares de citotoxicidade em linhagem de células HEp-2 tanto na ausência como na presença de luz. Na Tabela 3 estão representados os valores provenientes experimento realizado utilizando células tumorais HEp-2.

**Tabela 3:** Ensaios biológicos com Photogem e com suas frações (Frações 1, 2 e 3) na ausência e na presença de luz de comprimento de onda 630nm em células tumorais HEp-2,  $D = 20,7 \text{ J cm}^{-2}$ ,  $t = 23\text{min}$  e  $I = 15\text{mW cm}^{-2}$ .

HEp-2	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) $\pm$ DP			
	Photogem	F1	F2	F3
Ausência de luz	2.5 $\pm$ 0.1	2,5 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,2	24,6 $\pm$ 1,8
Presença de luz	1,3 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 1,7

\* 3 experimentos realizados.

Neste tipo de tecido a fração F1 exibiu citotoxicidade intrínseca, bem como a fotodinamizada similares àquela referente ao Photogem<sup>®</sup>. Entretanto a fotodinamização praticamente dobrou a toxicidade do Photogem<sup>®</sup>, isto é em (1,9 $\pm$ 0,4) vezes.

Por outro lado a toxicidade intrínseca de F2 é (3 $\pm$ 1) vezes maior que o Photogem<sup>®</sup> e de F3, por sua vez, apresentou uma toxicidade (10 $\pm$ 1) vezes inferior a do Photogem<sup>®</sup>.

Desta foram, da mesma forma que a fotodinamização dobrou a toxicidade do Photogem<sup>®</sup>, ocorreu o mesmo para F1, isto é, o aumento observado foi de (2 $\pm$ 2) vezes. Por outro lado, na F2 observou-se um aumento de (3 $\pm$ 2) vezes e a de F3 em (1,2 $\pm$ 0,2) vezes.

#### 4.4.4 ANÁLISE DOS TESTES DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PHOTOGEM<sup>®</sup> E DE SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES

Baseando-se nos resultados apresentados nos dois itens anteriores, pode-se sugerir que, nas células normais (VERO), a atividade fotodinâmica apresenta a seguinte ordem crescente: fração 1 e Photogem<sup>®</sup> < fração 3 < fração 2 enquanto que nas células de tumores (Hep-2) essa ordem foi: fração 3 < fração 1 e Photogem<sup>®</sup> < fração 2. Um fato a ser destacado é que a fração 2

apresentou o maior efeito fotodinâmico, tanto nas células de tumores (Hep-2) quanto nas células normais (VERO).

Um dos aspectos de suma importância que deve ser registrado é a seletividade apresentada pelas frações.

A fotodinamização permitiu monitorar a seletividade relativa dos compostos. Pôde-se verificar que a maior seletividade foi alcançada com o Photogem<sup>®</sup>, seguida, na seqüência, pelas frações F2, F1 e F3.

O fracionamento por meio da extração em fase sólida foi suficiente para evidenciar que o Photogem<sup>®</sup> contém três classes de compostos distintas. Essas três classes abrangem frações caracterizadas pela polaridade de seus constituintes: polares, uma segunda fração enriquecida com compostos de polaridade intermediária e uma terceira fração composta em sua maioria por compostos apolares.

Os ensaios preliminares supracitados confirmam que as frações obtidas a partir do Photogem<sup>®</sup> exibem atividades biológicas distintas entre si. A fração formada por compostos polares, denominada fração 1, apresenta uma atividade biológica semelhante ao fotossensibilizador disponível comercialmente, resultado obtido nos dois grupos de linhagens celulares, tanto na toxicidade intrínseca quanto estimulada pela luz. A fração enriquecida por compostos de polaridade intermediária, denominada F2, apresenta uma atividade biológica mais intensa em comparação com o Photogem<sup>®</sup> em todas as condições dos testes de citotoxicidade. De fato, esta fração 2 apresentou uma atividade biológica cerca de quatro a cinco vezes maior do que o fotossensibilizador em questão. A fração F3, composta em sua maioria por compostos apolares, apresenta uma atividade biológica cerca de quatro a quinze vezes menor que o fotossensibilizador original.

Um resultado a priori surpreendente obtido nestes testes foi a baixa atividade biológica apresentada pela fração 3. Segundo a literatura disponível (Moan, 1987; Oenbrink, 1988; Pandey, 1990b; Pandey, 1991; Pandey, 1996; Byrne, 2004) este seria um resultado inesperado porque os compostos mais apolares exibiriam uma atividade mais intensa e uma seletividade superior aos

seus análogos mais polares. Esta aparente incongruência, talvez possa ser explicada pela instabilidade deste tipo de preparado observada por alguns pesquisadores (Moan, 1986; Byrne, 1987; Kessel, 1985a; Kessel, 1987).

A baixa atividade biológica exibida pela fração 3 poderia ser explicada por possíveis mudanças estruturais em função de uma degradação de seus componentes ocorrida durante o manuseio da amostra. Uma segunda possibilidade para a baixa atividade da fração 3 estaria relacionada ao caráter altamente hidrofóbico desta fração, que geraria a formação de agregados desta fração em meio aquoso. De fato, houve considerável dificuldade em se solubilizar a fração 3 em meio aquoso para a realização dos testes de citotoxicidade, sendo, inclusive, identificada macroscopicamente uma significativa turbidez da solução em questão. Logo, a possível agregação da fração 3 seria uma hipótese plausível para explicar as baixas atividades obtidas.

Neste contexto, é interessante enfatizar que a agregação reduziria drasticamente a capacidade de um composto de produzir oxigênio singlete (Simplicio, 2002; Aveline, 1995; Tanielian, 1995), e, por conseqüência, diminuiria sua atividade fotodinâmica, o que justificaria a baixa atividade biológica apresentada.

Deste modo, seria pertinente propor que um sensibilizador ideal deveria possuir alta solubilidade em água para que permanecesse na sua forma monomérica. Isto porque o monômero seria a forma mais ativa do ponto de vista biológico, em função de um maior potencial para formação de oxigênio singlete e, por conseqüência, maior atividade fotodinâmica. Esta informação pode ser relevante com relação a trabalhos futuros com enfoque na modelagem de novos protótipos de fotossensibilizadores para o combate do câncer através da TFD.

É importante ressaltar que em TFD, um conjunto de fatores deve ser levado em consideração na escolha do agente fotossensibilizador adequado. Estes fatores a serem considerados são: estabilidade aromática, alto rendimento na formação de oxigênio singlete, baixa toxicidade na ausência de irradiação, absorção na região do vermelho e alta seletividade em relação ao

tecido tumoral. Tais testes preliminares sugerem que o Photogem<sup>®</sup>, em comparação com suas respectivas frações, apresenta maior seletividade às células cancerosas.

A seletividade superior apresentada pelo Photogem<sup>®</sup> pode ser explicada pela sua constituição, porque o agente fotossensibilizador em questão é formado por uma mistura de compostos polares, apolares e de compostos de polaridade intermediária. Realmente, poderia inferir-se que o Photogem<sup>®</sup> possui, sob certo aspecto, um caráter anfifílico, ou seja, apresentaria no conjunto dos componentes que formam a mistura que constitui este agente sensibilizador características hidrofóbicas e hidrofílicas concomitantemente.

Esse suposto caráter anfifílico da mistura em questão poderia ter sido fundamental nos resultados obtidos a partir dos testes biológicos. Realmente, o Photogem<sup>®</sup> e as frações 1 e 2 apresentaram uma solubilidade superior à solubilidade referente à fração 3 no mesmo meio aquoso. Além disso, as porfirinas podem ser absorvidas pelas células por difusão passiva através da membrana plasmática, o que depende da hidrofobicidade destas porfirinas (Brault, 1990).

De fato, o Photogem<sup>®</sup> é uma mistura de compostos de diferentes hidrofobicidades. Logo, este agente fotossensibilizador apresenta, de certa forma, um comprometimento entre um certo caráter hidrofílico, para que o composto possua uma boa solubilidade em água, que é o solvente do meio biológico, e um determinado caráter hidrofóbico, com o objetivo de se alcançar uma absorção adequada pelas células, através da permeabilidade seletiva das membranas celulares.

Além de uma característica intrínseca ao Photogem<sup>®</sup>, essa solubilidade “intermediária” poderia ser um pré-requisito inerente aos fotossensibilizadores em geral, para que a atividade biológica pudesse apresentar resultados satisfatórios. Uma vez mais, é importante adir que informações como essa podem ser muito interessantes na definição de propostas sintéticas para a elaboração de novos fármacos, com atividade mais próximas do ideal, em relação ao objetivo de utilização da TFD no tratamento do câncer.

É importante ressaltar que estes testes foram realizados *in vitro*, ou seja, estas frações poderiam apresentar comportamento diferenciado ao serem estudadas *in vivo*. Um exemplo a ser considerado consiste na clorina m-THPC, descrita anteriormente (Figura 2) que apresentou baixa atividade em testes celulares (Sternberg, 1998), enquanto mostrou resultados animadores em testes em cobaias, ou seja, testes *in vivo*. Desta maneira, se faz necessário estudos adicionais para conclusões mais abrangentes com relação à ação *in vivo* das frações que formam o fotossensibilizador em questão.

## **4.5 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES NO PHOTOGEM<sup>®</sup>**

### **4.5.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

As frações obtidas por meio da extração em fase sólida foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com o objetivo de se obter a purificação final dos componentes majoritários do Photogem<sup>®</sup>.

Conforme discutido anteriormente, este fotossensibilizador é constituído por compostos que apresentam características bem singulares. Em primeiro lugar, são compostos instáveis sob certas condições de armazenamento e manuseio. Estes compostos necessitam serem estocados ao abrigo da luz, sob refrigeração e, se forem estocados em solução, devem estar tamponados entre pH 7,2 e 7,4 (Moan, 1986). O Photogem<sup>®</sup>, sendo uma versão enriquecida da fração oligomérica do HpD, apresenta os mesmos inconvenientes de manipulação e estocagem de seu precursor.

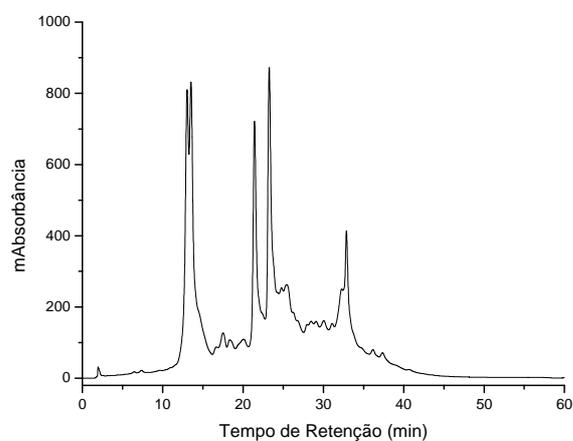
Tendo-se em vista estas particularidades, uma série de cuidados foi tomada com o intuito de não haver quaisquer mudanças estruturais nos compostos previamente separados por meio de extração em fase sólida. As denominadas frações um, dois e três foram mantidas liofilizadas, ao abrigo da luz e armazenadas sob temperatura  $-4^{\circ}\text{C}$ . As frações estiveram solubilizadas em solvente orgânico pelo menor tempo possível, com o objetivo de se evitar

qualquer degradação do material estudado. As frações foram liofilizadas em um concentrador centrífugo de amostras, onde o solvente é evaporado sob baixa temperatura e pressão reduzida. Este procedimento, portanto, trata-se de uma metodologia cuidadosa para se extrair o solvente da amostra, evitando-se quaisquer alterações drásticas nas propriedades da mistura.

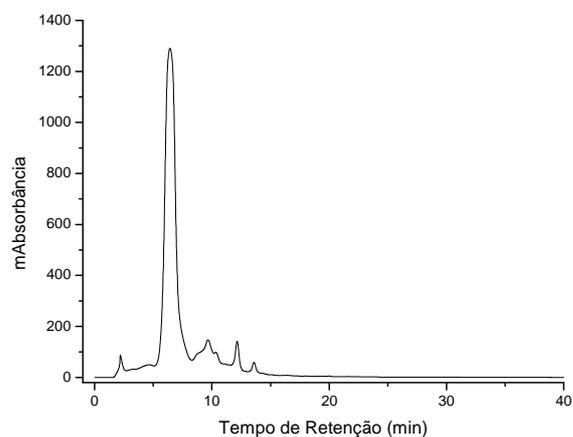
No procedimento de separação empregou-se como fase móvel uma mistura de metanol e tampão PBS diluído. Essa fase móvel foi utilizada como precaução para que não houvesse mudanças estruturais nos compostos analisados.

#### **4.5.2 ISOLAMENTO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS PRESENTES NO PHOTOGEM<sup>®</sup>**

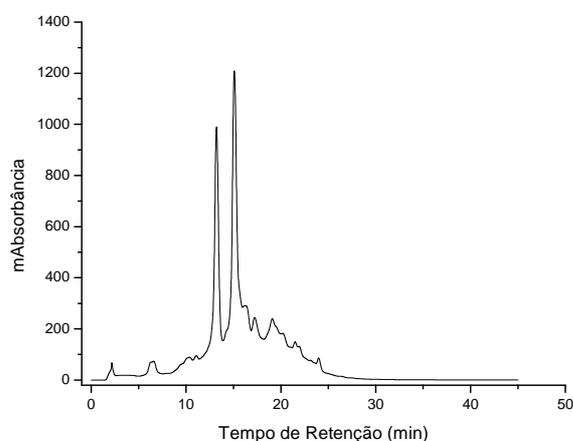
Utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência visando-se ao isolamento dos compostos majoritários presentes no agente fotossensibilizador em estudo. Os cromatogramas provenientes das análises realizadas com as frações 1, 2 e 3 do sensibilizador (fração metanólica) estão representados nas figuras subseqüentes.



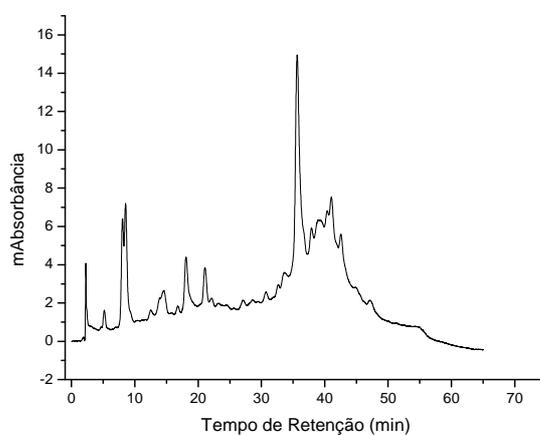
**Figura 11** – Cromatograma da fração metanólica do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 50 a 98% de metanol durante 55min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorvância monitorada em 400nm.



**Figura 12**– Cromatograma da fração 1 do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 60 a 90% de metanol durante 30min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorvância monitorada em 400nm.



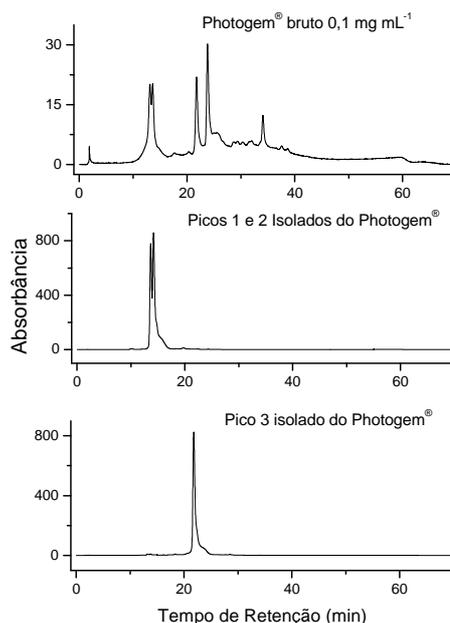
**Figura 13** – Cromatograma da fração 2 do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 60 a 90% de metanol durante 30min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorbância monitorada em 400nm.



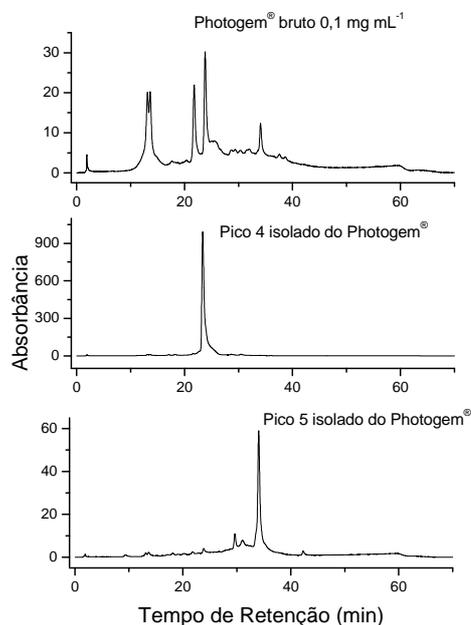
**Figura 14** – Cromatograma da fração 3 do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 60 a 90% de metanol durante 40min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorbância monitorada em 400nm.

Os compostos isolados foram coletados em frascos protegidos da luz. Após o término do procedimento de separação, foi efetuada a retirada do solvente em um concentrador de amostras. Os sais provenientes do tampão utilizado foram retirados por meio de extração em fase sólida.

Conforme discussão anterior, estes compostos são instáveis. Com o escopo de se observar se houve degradação, realizou-se um novo experimento de HPLC. O objetivo desta referida análise foi a verificação dos tempos de retenção dos compostos isolados para posterior comparação com os tempos de retenção anteriores ao isolamento. Caso houvesse alguma modificação nos tempos de retenção dos compostos isolados, em relação à mistura inicial, poderia ter ocorrido alguma mudança estrutural durante o processo de isolamento. Os cromatogramas deste segundo experimento estão representados a seguir.



**Figura 15** – Cromatograma da comparação dos tempos de retenção dos compostos isolados com o Photogem®. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 50 a 98% de metanol durante 55min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorbância monitorada em 400nm.



**Figura 16** – Cromatograma da comparação dos tempos de retenção dos compostos isolados do Photogem<sup>®</sup>. Cromatografia em fase reversa (C<sub>18</sub>); fase móvel: metanol/tampão PBS diluído a 75mmol L<sup>-1</sup>; gradiente de eluição de 50 a 98% de metanol durante 55min; volume de amostra na injeção: 20μL; fluxo: 0,8mL min<sup>-1</sup>; absorbância monitorada em 400nm.

Os cromatogramas das Figuras 15 e 16 mostram que os tempos de retenção dos compostos analisados não apresentaram mudanças significativas em relação à mistura inicial. Este fato sugere que não houve mudança estrutural significativa nos compostos isolados. Outra informação fornecida por estes cromatogramas está relacionada à separação dos compostos que se deu de forma satisfatória. De fato, o formato de cada pico indica que a separação foi bem sucedida. Uma exceção foi o pico 5, onde se verificou a presença de algumas impurezas que formaram alguns picos secundários, mostrando que a separação não foi ideal.

É importante ressaltar que a separação de porfirinas não é uma tarefa trivial devido aos vários estereoisômeros que estes compostos apresentam. A ocorrência destes isômeros conformacionais provoca o alargamento dos picos referentes aos compostos presentes na mistura (Vollhardt, 2004; Allinger, 1978). A fase estacionária utilizada ( $C_{18}$ ) não foi capaz de separar estes isômeros porque somente fases estacionárias quirais são eficientes para tal separação.

O resultado da cromatografia líquida foi o isolamento de cinco compostos majoritários presentes no agente sensibilizador Photogem<sup>®</sup>. Os dois primeiros compostos foram coletados juntos porque a coluna utilizada não apresentou resolução suficiente para isolá-los. Os demais compostos foram separados.

Os compostos isolados foram secos e pesados após estas últimas análises de HPLC e os experimentos seguintes consistiram de medidas de espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível e de espectrometria de massa. Essas análises serão discutidas nas seções seguintes.

## **4.6 ANÁLISE DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO PHOTOGEM<sup>®</sup> POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV-VIS**

### **4.6.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

Os espectros das porfirinas apresentam bandas de absorção distribuídas em três regiões: banda B ou banda de Soret (região ultravioleta próximo) e um último conjunto que são observados na região do UV inferiores a 350nm.

Usualmente as bases livres (sem metal coordenado) apresentam dois conjuntos de duas bandas do tipo Q e quando possuem íon de metais ou quando os dois nitrogênios pirróicos também se encontram protonados, apenas um conjunto de duas bandas. Isto se deve à elevação da simetria  $D_{2h}$  para  $D_{4h}$ . As bandas Q manifestam-se aos pares, pois é a composição de uma transição puramente entre níveis eletrônicos envolvendo níveis vibracionais

fundamentais, enquanto que o componente de maior energia (comprimento de onda menor) envolve transições com variação do nível vibracional.

Os espectros de porfirinas têm sido interpretados com sucesso baseado no “modelo dos quatro orbitais” de Gouterman (Gouterman, 1959). Neste modelo dos quatro orbitais, em escala de energia, dois são os últimos orbitais moleculares ocupados  $\pi$  e os outros dois são os primeiros orbitais desocupados de caráter  $\pi^*$ .

Os dois orbitais moleculares ocupados de maior energia são denominados HOMO (highest occupied molecular orbital) e os dois orbitais moleculares desocupados de menor energia LUMO (lowest unoccupied molecular orbital).

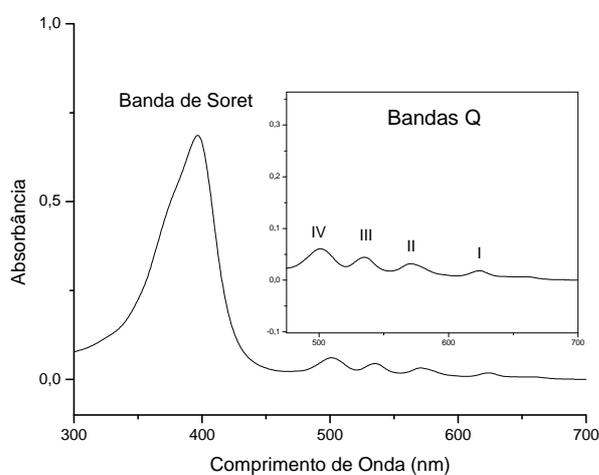
Um dos orbitais HOMO pertence à representação irredutível  $a_{2u}$  e o outro  $a_{1u}$ . Os orbitais LUMO pertencem à representação irredutível  $e_g$ . Devido às energias próximas entre os estados excitados  $a^1_{1u}e^1_g$  e  $a^1_{2u}e^1_g$  possibilitam interações de configurações intensas que resultam em um estado bastante provável e outro pouco provável. Assim, como as bandas B e Q são consideradas como combinações lineares destas transições de um elétron, aquelas que representam as combinações favoráveis  $a^2_{1u} \rightarrow a^1_{1u}e^1_g$  e  $a^2_{2u} \rightarrow a^1_{2u}e^1_g$  a absorção detectada será intensa, portanto trata-se de uma transição permitida, ocorrendo em um comprimento de onda mais curto. Contudo, quando os dipolos se opõem, sendo a transição menos provável, a intensidade desta transição será menor e ocorrerá em comprimentos de onda maiores, correspondendo às bandas Q.

A banda de Soret apresenta uma banda intensa, com coeficiente de absorvidade molar da ordem de  $10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Kalyanasundaram, 1992) na região de 400nm, pois os dipolos das transições se somam.

As quatro bandas Q são menos intensas e estão localizadas na faixa espectral de 500 a 700nm. As bandas Q são enumeradas utilizando-se algarismos romanos de I a IV. Estas quatro bandas podem ser classificadas de acordo com suas intensidades relativas, sendo ‘etio’ quando as intensidades

seguem a seguinte seqüência IV>III>II>I, 'rhodo' quando III>IV>II>I, 'oxo-rhodo' quando III>II>IV>I e 'philo' (IV>II>III>I). As intensidades das bandas Q, além de serem menos intensas, são sensíveis às influências provocadas por perturbações nos níveis eletrônicos devido a substituintes nas cadeias laterais da porfirina.

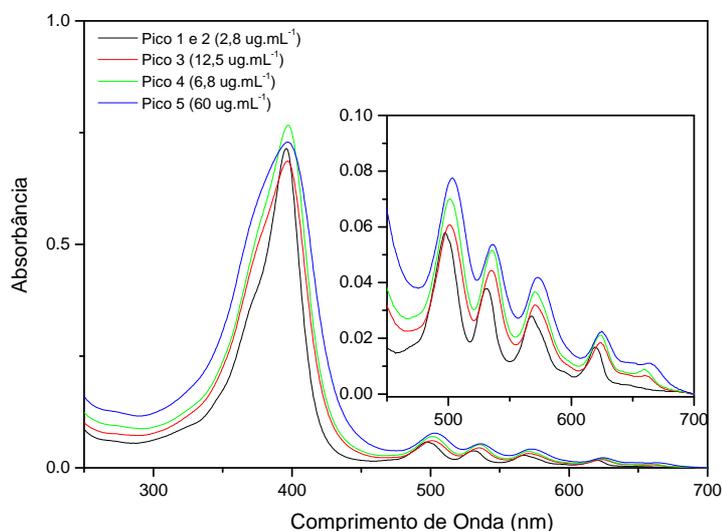
Um espectro eletrônico típico de uma porfirina está ilustrado na figura a seguir.



**Figura 17** – Espectro eletrônico típico de uma porfirina base livre.

#### **4.6.2 ANÁLISE DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DO PHOTOGEM® POR ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NO UV-VIS**

Realizaram-se medidas de espectroscopia eletrônica de absorção da região do ultravioleta-visível dos compostos isolados por meio de HPLC. A Figura 18 ilustra os resultados deste experimento.



**Figura 18** – Espectro eletrônico dos compostos majoritários isolados do Photogem<sup>®</sup>. Solvente utilizado: metanol; caminho óptico: 1cm.

Conforme Figura 18, os espectros de absorção no UV-Vis dos compostos isolados mostraram semelhanças entre si. As diferenças encontradas nos espectros foram o formato da banda de Soret, onde os compostos pico 1 e 2 exibiram uma banda de menor largura em 396nm enquanto os compostos denominados pico 3 e 4 mostraram a banda de Soret com o mesmo formato em 397nm. O composto chamado pico 5 também apresentou a banda de Soret em 397nm, sendo que essa banda se apresentou mais larga do que todos os outros compostos mencionados anteriormente.

Com relação às bandas Q, é possível notar que, semelhantemente ao que aconteceu na análise da banda de Soret, os compostos isolados também apresentaram semelhanças entre si. De fato, no que se refere à ordem de intensidades, todas as porfirinas em questão são classificadas como sendo do tipo 'etio'.

Nos compostos pico 1 e 2, os máximos de absorção das bandas Q foram identificados em 497, 531, 568 e 619nm. Os compostos denominados pico 3 e

pico 4 apresentaram as bandas Q localizadas em 501, 535, 570,5 e 624nm enquanto o composto chamado pico 5 evidenciou suas respectivas bandas Q em 503, 536, 573 e 625nm.

É importante mencionar que as poucas diferenças observadas nos espectros de absorção na região do ultravioleta-visível referentes aos componentes isolados evidenciam uma certa correlação com as respectivas polaridades destes compostos.

Realmente, o composto mais polar, denominado pico 1 e 2, apresentou a banda de Soret mais estreita e as bandas Q com um deslocamento de 4nm para o azul em relação à banda Q referente aos compostos pico 3 e pico 4. Os compostos de polaridade intermediária apresentaram espectros com o formato da banda de Soret semelhantes entre si, além de possuírem bandas Q com os mesmos comprimentos de onda. Por sua vez, o composto mais apolar isolado, denominado pico 5, apresentou um leve alargamento da banda de Soret em relação aos demais e um leve deslocamento das bandas Q para o vermelho.

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível mostra que há diferenças estruturais nos componentes estudados, mas, infelizmente, os dados fornecidos por esta técnica instrumental não permitem a identificação do que seriam exatamente estas diferenças estruturais.

As bandas que podem ser observadas nos espectros de absorção das porfirinas são proporcionadas por transições eletrônicas do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  que ocorrem devido à alta conjugação do tetraazamacrociclo porfirínico (Kalyanasundaram, 1992). De fato, os substituintes do macrociclo podem alterar as bandas espectrais em questão. Todavia, ainda não é possível propor uma correlação mais precisa entre estas mudanças espectrais com as diferenças estruturais do anel porfirínico em função tanto da similaridade dos espectros como da quantidade reduzida de informação estrutural sobre os fotossensibilizadores na literatura especializada. Estudos adicionais por meio de outras técnicas instrumentais se fazem necessários para um avanço dessa

caracterização estrutural. Tal avanço poderia, inclusive, determinar os grupos substituintes de cada componente.

A determinação dos respectivos coeficientes de absorvidade foi realizada por meio dos espectros de absorção dos componentes isolados. Realmente, essa informação pode ser extremamente útil para trabalhos futuros visando à uma caracterização estrutural definitiva das espécies constituintes do Photogem<sup>®</sup>.

Observando-se os espectros eletrônicos dos compostos isolados a partir sensibilizador em questão, notou-se que a absorbância dos mesmos era aproximadamente igual. Realmente, a absorbância destes compostos gira em torno de 0,7. Considerando que as concentrações dos mencionados compostos são diferentes, pode-se inferir, em concordância com a Lei de Beer, que as absorvidades dos mesmos também são diferenciadas.

De fato, estes compostos foram isolados pela primeira vez no presente trabalho, o que implica que não há na literatura informações a seu respeito do valor de seus coeficientes de absorvidade.

Com o objetivo de se obter os valores de absorvidade dos compostos isolados do fotossensibilizador em questão, efetuaram-se medidas de absorbância em diversas concentrações de cada composto isolado com o intuito de se determinar suas respectivas absorbâncias em comparação às absorbâncias do fotossensibilizador original. Estas medidas permitiram comparar os coeficientes de absorvidade dos compostos entre si, assim como comparar estes últimos com a absorvidade da mistura original. A absorvidade de cada composto foi calculada em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A Tabela 4 ilustra os dados obtidos com este experimento.

**Tabela 4** – Absortividade dos compostos majoritários do Photogem®.

	<b>Photogem®</b>	<b>P1e2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>	<b>P5</b>
Absortividade* (cm <sup>-1</sup> µg <sup>-1</sup> mL)	0,15±0,01	0,22±0,01	0,05±0,003	0,09±0,003	0,01±0,001

\* Foram efetuadas medidas em 6 concentrações diferentes para a obtenção da absortividade de cada composto.

Comparando-se os valores da absortividade determinados, verificou-se que os compostos mais polares, denominados picos 1 e 2, apresentaram o maior coeficiente de absortividade entre todos os compostos isolados. Por outro lado, o composto mais apolar denominado pico 5 apresentou o menor coeficiente de absortividade. A ordem crescente de absortividade observada foi: P5 < P3 < P4 < P1e2. Vale ressaltar que os compostos pico 1e2 são responsáveis por grande parte da absortividade verificada na mistura total.

Realizaram-se medidas de espectrometria de massa nos compostos separados e a utilização da referida técnica proporcionou as massas molares destes compostos. Por conseguinte, seria interessante associar as informações oriundas das duas técnicas com o objetivo de se obter seus respectivos coeficientes de absortividade molar, ou seja, efetuar a transformação dos valores de absortividade obtidos em µg mL<sup>-1</sup> para mol L<sup>-1</sup>. A Tabela 5 registra os dados obtidos. Importante ressaltar que as massas moleculares utilizadas neste cálculo foram:

- Compostos Pico 1 e 2: MM = 598;
- Composto Pico 3: Monômero: MM = 580 – Dímero: MM = 1161;
- Composto Pico 4: Monômero: MM = 580 – Dímero: MM = 1161.

onde MM = massa molecular.

Os espectros de massa dos compostos serão discutidos na seção subsequente.

**Tabela 5** – Coeficientes de absorvidade molar dos compostos isolados do sensibilizador Photogem®.

	$\epsilon^*$ (cm <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> L) Monômero	$\epsilon^*$ (cm <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> L) Dímero
P1e2	(1,30±0,07)x10 <sup>5</sup>	-
P3	(0,31±0,02)x10 <sup>5</sup>	(0,62±0,03)x10 <sup>5</sup>
P4	(0,54±0,02)x10 <sup>5</sup>	(1,13±0,06)x10 <sup>5</sup>
P5	-	-

\* Foram efetuadas medidas em 6 concentrações diferentes para a obtenção do  $\epsilon$  de cada composto.

Os espectros de massa dos compostos isolados do Photogem® não fornecem informações suficientes para determinar se o composto analisado é monômero ou dímero. Por consequência, o cálculo dos coeficientes de absorvidade molar foi realizado levando-se em consideração as duas possibilidades. Não foi possível o cálculo da absorvidade molar correspondente ao pico 5 devido ao grande número de picos em seu respectivo espectro de massa. Na próxima seção serão discutidos os espectros de massa e serão propostas possíveis estruturas para os compostos analisados.

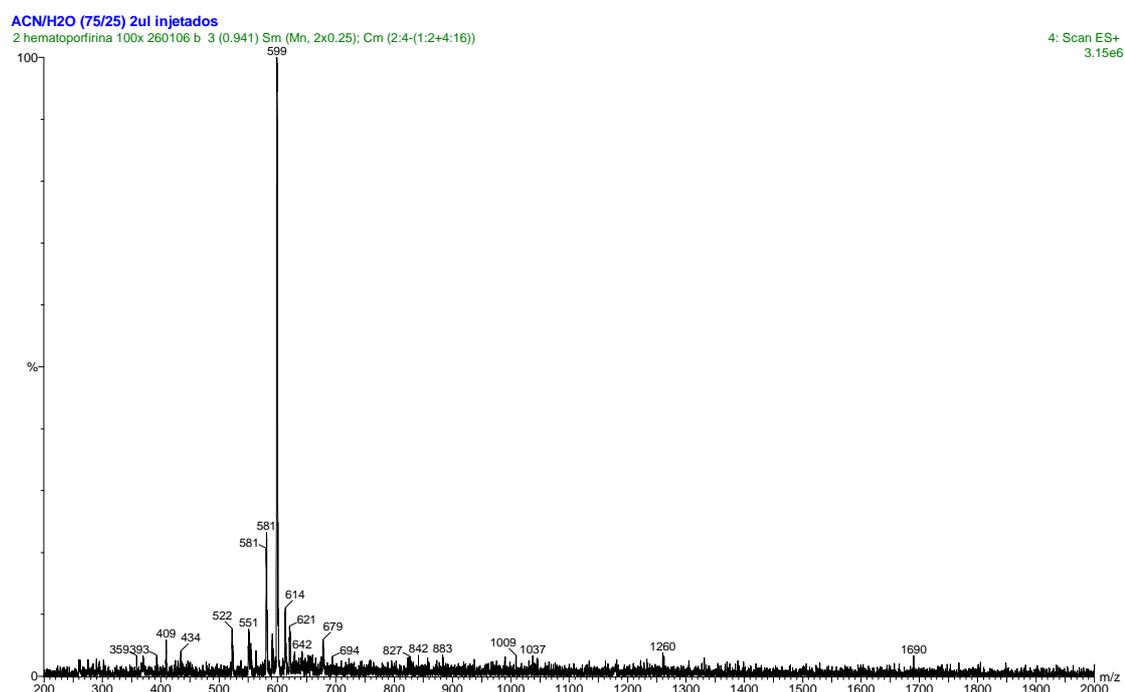
#### 4.7 – ANÁLISE DOS COMPOSTOS ISOLADOS DO PHOTOGEM® POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os compostos isolados por meio de HPLC foram analisados por espectrometria de massa com o escopo de se propor possíveis estruturas para os compostos majoritários presentes no Photogem®. Uma intenção secundária deste experimento foi a verificação de possíveis degradações ocorridas nos compostos durante o processo de purificação.

Utilizou-se electrospray no modo positivo como fonte de ionização nos experimentos de espectrometria de massa. Este modo de ionização é versátil porque permite a ionização de compostos polares e pouco voláteis (Gaskell, 1997). O padrão utilizado foi a hematoporfirina IX já que este composto é o reagente de partida da síntese do Photogem, além de ser um dos constituintes (Mironov, 1990; Dougherty, 1987b; Kessel, 1985b) presentes neste fotossensibilizador.

#### 4.7.1 ANÁLISE DO ESPECTRO DE MASSA DO PADRÃO UTILIZADO

Inicialmente, experimentos envolvendo o padrão escolhido, hematoporfirina IX, foram realizados para serem comparados com os compostos isolados do Photogem<sup>®</sup>. A Figura 19 apresenta o espectro de massa obtido para a hematoporfirina IX.



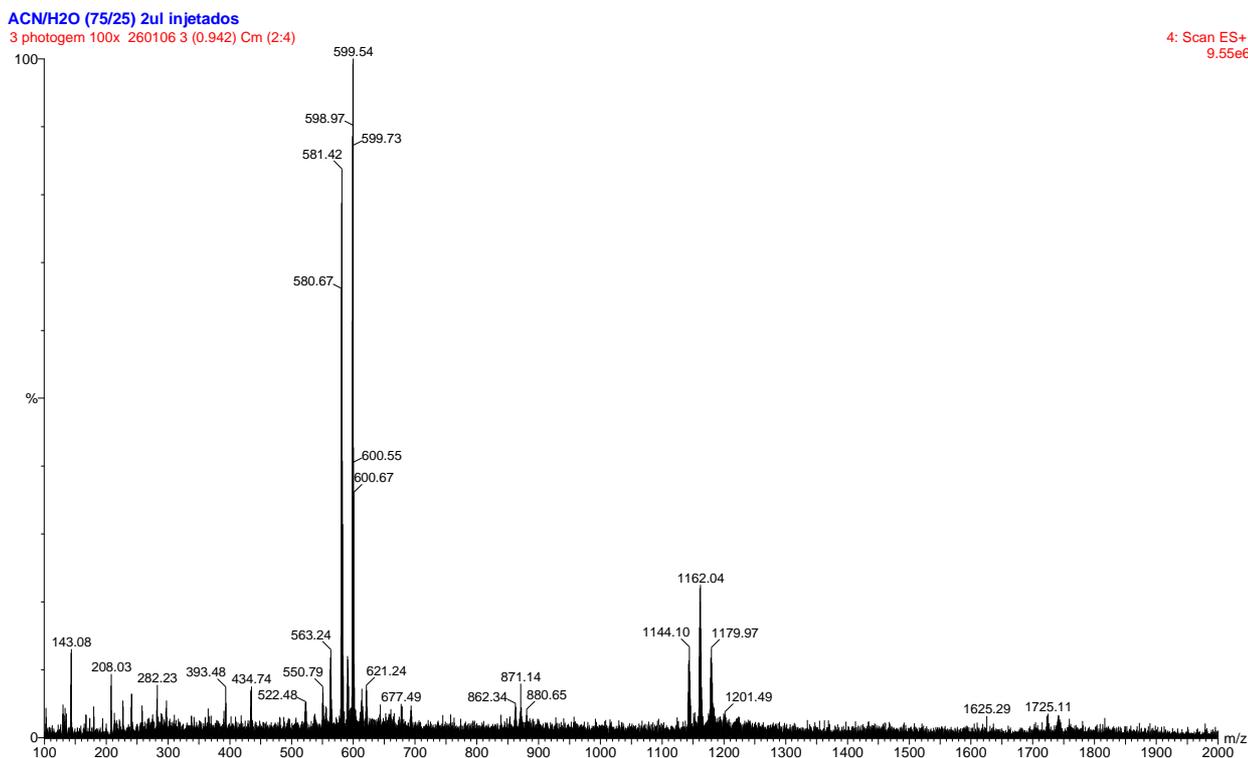
**Figura 19** – Espectro de massa da hematoporfirina (ESI<sup>+</sup> – MS), voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 75V.

Observou-se o pico do íon pseudomolecular  $[M+H]^+$  da hematoporfirina em 599 Da e o pico relacionado à perda de uma molécula de água de uma das cadeias laterais com  $m/z$  581 Da. O pico do íon pseudomolecular é definido como o íon do composto analisado formado pela adição de um ou mais prótons ( $H^+$ ). Constata-se também a presença de várias impurezas, tanto de pequenas quanto de elevadas massas moleculares. Esta medida comprova a literatura (Owens, 1995) que afirma que a hematoporfirina IX é um composto difícil de ser obtido com alta pureza.

#### **4.7.2 ANÁLISE PRELIMINAR DO ESPECTRO DE MASSA DO PHOTOGEM<sup>®</sup> ÍNTEGRO.**

Uma amostra do fotossensibilizador em sua forma íntegra foi submetida à análise por espectrometria de massa com o objetivo de se obter um perfil inicial do espectro de massa dos compostos presentes na mistura completa que consiste no Photogem<sup>®</sup>.

O espectro deste experimento está apresentado na Figura 20.



**Figura 20** – Espectro de massa do Photogem<sup>®</sup> (ESI<sup>+</sup>-MS), voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V.

Como pode ser observado na Figura 20, o espectro de massa do Photogem<sup>®</sup> apresenta picos intensos com  $m/z$  em 563, 581, 599, 1144, 1162, 1179 e 1725Da.

Identifica-se no espectro de massa o pico do íon pseudomolecular com  $m/z$  599Da  $[M+H]^+$  que pode estar relacionado a uma molécula de hematoporfirina IX, um dos constituintes do fotossensibilizador em questão.

O sinal obtido com  $m/z$  em 581 Da  $[(M+H)-H_2O]^+$  corresponde ao sinal da hematoporfirina IX com uma molécula de água a menos. A perda de uma molécula de água é normal na técnica de ionização por electrospray positivo (ESI<sup>+</sup>) quando o composto analisado possui grupos álcoois em sua estrutura. Este sinal pode ser atribuído a um dos isômeros do HVD (2(4)-(1-hidroxietil)-vinildeuteroporfirina IX). O sinal observado com  $m/z$  em 563 é referente à perda

de duas moléculas de água da hematoporfirina IX,  $[(M+H)-2H_2O]^+$  e pode ser atribuído à protoporfirina IX.

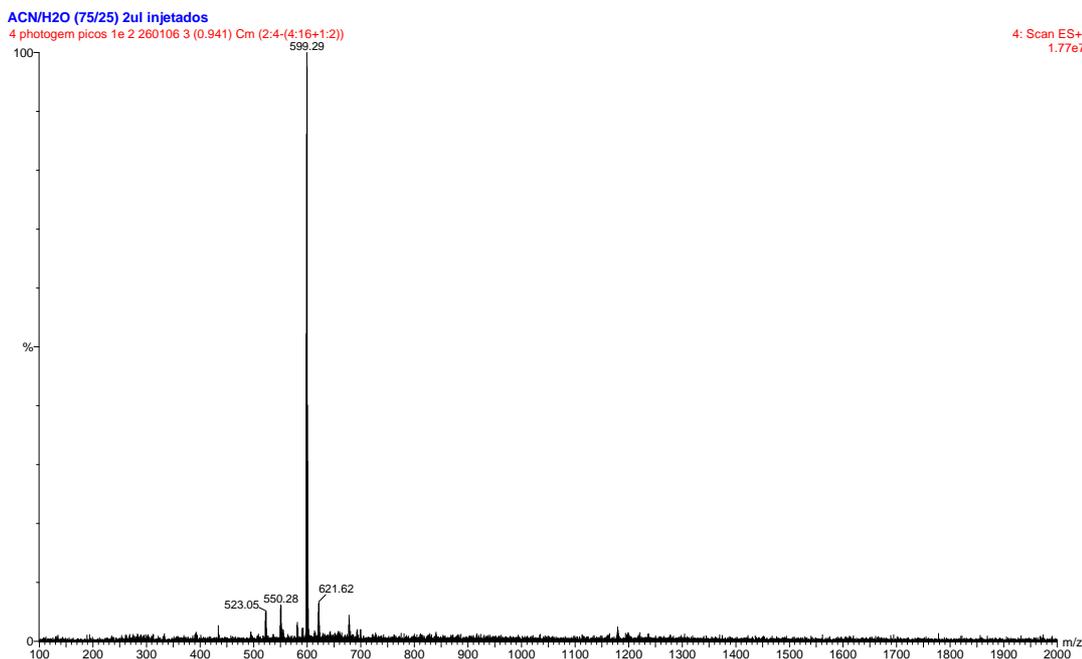
Uma análise preliminar deste espectro foi realizada. O sinal com  $m/z$  em 1179Da é referente ao dímero da molécula de hematoporfirina IX com uma molécula de água a menos, ou seja,  $[(2M+H)-H_2O]^+$ . O sinal obtido com  $m/z$  em 1162Da corresponde ao dímero da molécula de hematoporfirina menos duas moléculas de água,  $[(2M+H)-2H_2O]^+$ , enquanto o sinal observado com  $m/z$  em 1144Da é o dímero da hematoporfirina com três moléculas de água a menos,  $[(2M+H)-3H_2O]^+$ . Estes três picos podem ser atribuídos aos dímeros encontrados no derivado de hematoporfirina (Siegel, 1999).

O sinal com  $m/z$  em 1725Da é pouco intenso e poderia estar relacionado ao trímero (Siegel, 1999) encontrado no derivado de hematoporfirina.

#### **4.7.3 ANÁLISE DO ESPECTRO DE MASSA DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS ISOLADOS DO PHOTOGEM<sup>®</sup>**

Realizaram-se medidas de espectrometria de massa dos compostos isolados do Photogem<sup>®</sup> por HPLC. Conforme citado anteriormente, foram isolados por cromatografia líquida cinco compostos majoritários do fotossensibilizador em questão. Os primeiros compostos separados foram denominados picos 1 e 2, sendo que estes dois picos apresentaram tempos de retenção muito próximos, impossibilitando sua separação. O terceiro composto majoritário foi denominado de pico 3, enquanto que o quarto composto majoritário foi chamado de pico 4. O último composto majoritário separado foi denominado pico 5.

A Figura 21 apresenta o espectro de massa dos compostos denominados picos 1 e 2 obtidos por meio da purificação do fotossensibilizador em questão.



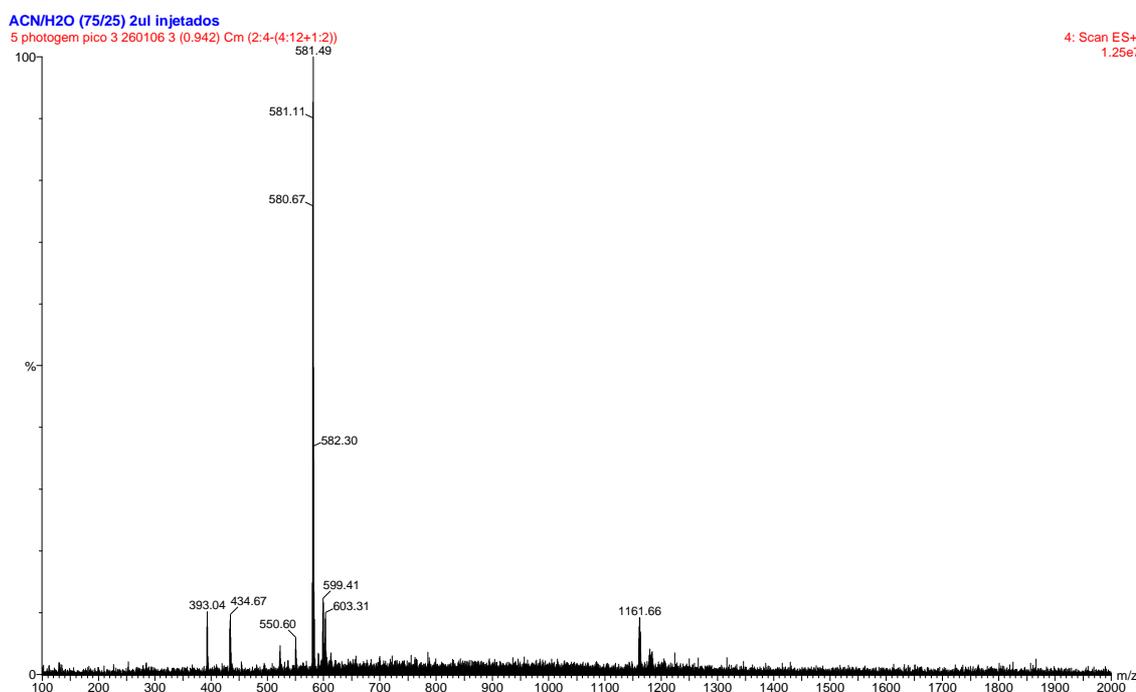
**Figura 21** – Espectro de massa dos compostos denominados pico 1 e 2 do Photogem<sup>®</sup>, voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V.

O cromatograma do experimento de HPLC (Figura 15) mostrou dois picos (1 e 2), o que sugeriria, em princípio, a presença de dois compostos. Todavia, medidas de espectrometria de massa evidenciaram a presença de um pico intenso com  $m/z$  599Da. Através da análise conjunta dos espectros de massa, dos espectros de absorção no UV-Vis e do cálculo do coeficiente de absorvidade molar [ $\epsilon = (1,30 \pm 0,07) \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ ] (Bonnett, 1983) é possível propor que se trata, de fato, de um único composto que consiste na hematoporfirina IX.

Neste contexto, os dois picos presentes no cromatograma poderiam ser dois diastereoisômeros da hematoporfirina IX que não foram separados pela fase estacionária utilizada. Apesar do  $\epsilon$  encontrado por Bonnett e colaboradores (Bonnett, 1983) ter sido calculado em meio aquoso e em acetona, que são diferentes do solvente utilizado neste trabalho, que é o metanol, é possível propor que o composto identificado no presente trabalho corresponde à

hematoporfirina IX, semelhantemente ao que aconteceu no trabalho de Bonnett e colaboradores (Bonnet, 1983). De fato, Bonnett e colaboradores (Bonnett, 1983) enfatizam que não há variação da intensidade de  $\epsilon$  em diferentes solventes. Uma vez que o  $\epsilon$  encontrado em nosso trabalho corresponde ao  $\epsilon$  encontrado por Bonnett e colaboradores (Bonnett, 1983), a caracterização do componente em questão como hematoporfirina IX poderia ser extrapolada para a medida efetuada neste trabalho.

O terceiro composto majoritário presente no Photogem<sup>®</sup>, pico 3, foi estudado por espectrometria de massa e seu espectro está ilustrado na Figura 22 a seguir.



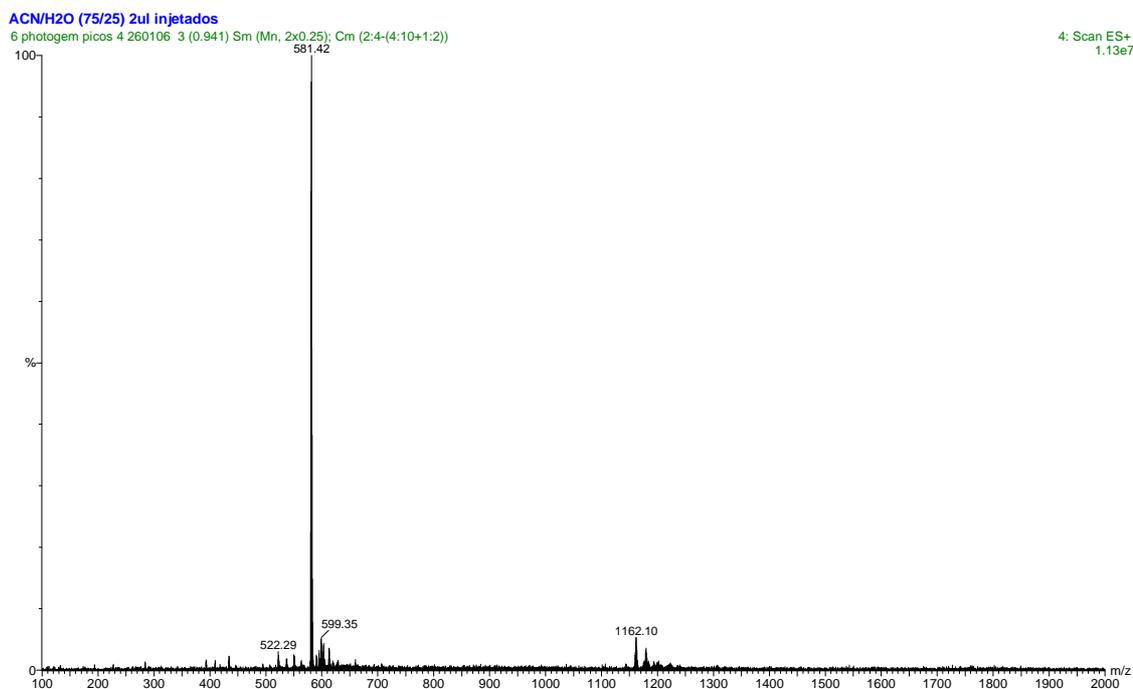
**Figura 22** – Espectro de massa do pico 3, que é um dos componentes majoritários do Photogem<sup>®</sup>, voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V.

No espectro supracitado verificou-se a presença de um sinal mais intenso com  $m/z$  em 581Da e outro menos intenso em 1161Da. O sinal em

1161Da pode ser atribuído ao dímero, que evidencia uma desidratação em uma das cadeias laterais onde havia um grupo OH.

Nesta análise há duas possibilidades: a primeira seria que o composto estudado é um monômero, ( $m/z$  581Da). Assim sendo, o sinal referente ao dímero em 1162 poderia ser oriundo de dois monômeros reagindo entre si e formando um dímero por ligação covalente no interior do equipamento. A segunda possibilidade seria do composto ser um dímero, e, desta maneira, o sinal observado em  $m/z$  581Da seria um dímero ionizado com dois prótons.

Em seguida, está ilustrado o espectro do quarto composto majoritário do Photogem<sup>®</sup>, denominado de pico 4.



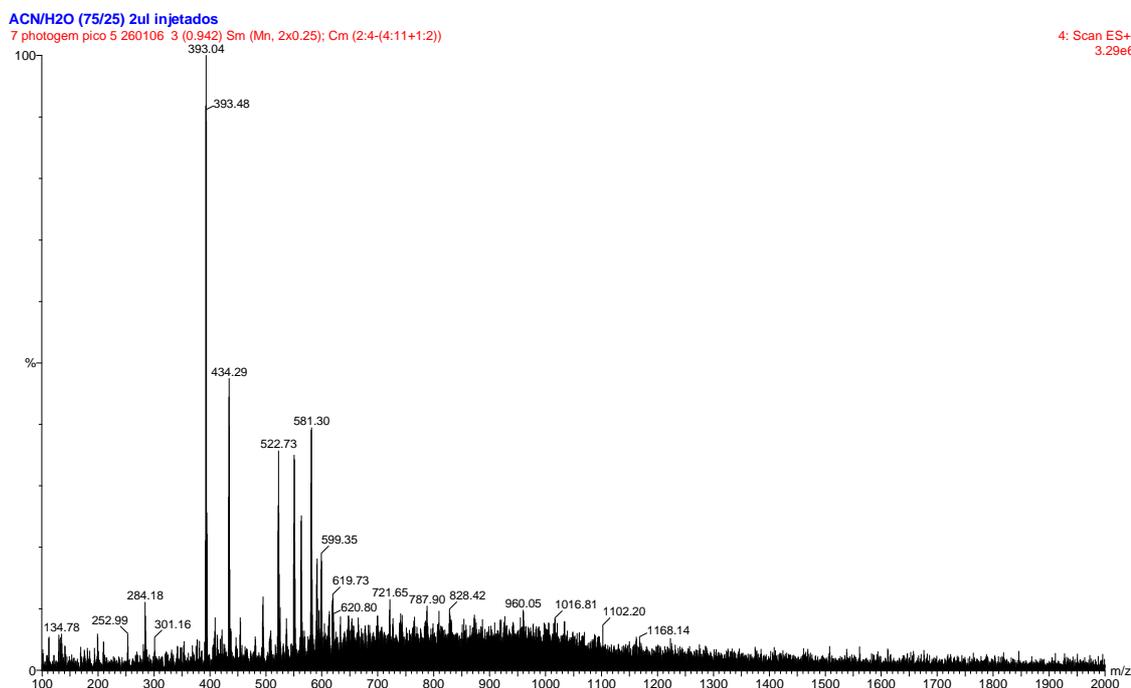
**Figura 23** - Espectro de massa do composto majoritário pico 4 do Photogem<sup>®</sup> voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V.

O espectro de massa do composto majoritário pico 4 (Figura 23) possui algumas semelhanças com o espectro do composto anteriormente discutido denominado pico 3 (Figura 22). Em ambos os casos, os espectros de massa apresentam dois picos mais intensos, com  $m/z$  em 581 e 1162Da. Contudo,

observou-se que há fragmentos mais intensos no espectro do pico 3 (Figura 22) quando comparado ao espectro referente ao pico 4 (Figura 23). Esta constatação, juntamente com o fato dos respectivos tempos de retenção serem diferentes, pode ser uma evidência de que os compostos denominados pico 3 e pico 4 são isômeros.

Novamente deparou-se com problema similar ao descrito na análise do pico 3. A priori, há duas possibilidades para a explicação dos sinais com  $m/z$  581 e 1162Da nestes dois espectros de massa. A primeira possibilidade é do composto com  $m/z$  581 ser um dos dois isômeros da 2(4)-(1-hidroxietil)-vinildeuteroporfirina IX, que possui peso molecular de 580Da. Neste caso, o sinal identificado em 1162 corresponderia a dois monômeros ligados por ligação covalente, sendo esta ligação formada no interior do equipamento. A outra hipótese a ser considerada consiste na possibilidade dos compostos observados serem dímeros, o que implicaria que o sinal com  $m/z$  em 1162 seria o pico do íon pseudomolecular da molécula  $[2M+H]^+$ , enquanto o sinal observado com  $m/z$  em 581 estaria relacionado à presença de dímero com duas cargas positivas,  $[2M+2H]^{2+}$ .

O quinto composto majoritário do Photogem<sup>®</sup>, denominado pico 5, foi analisado por meio de espectrometria de massa e seu espectro está ilustrado na Figura 24.



**Figura 24** – Espectro de massa do composto denominado pico 5 do Photogem<sup>®</sup>, voltagem do capilar 3,5kV; voltagem do cone de amostragem 70V.

O espectro de massa deste composto apresentou mais picos em relação àquele correspondente aos outros quatro componentes do fotossensibilizador estudado. Há um pico com  $m/z$  intenso em 393Da e diversos outros em uma faixa de  $m/z$  de 134 a 1168Da. Uma possível explicação para este fato é que o cromatograma da mistura na região onde se realizou a coleta deste composto apresentou um alargamento de banda considerável, portanto, demonstrando uma separação não ideal. Outra explicação plausível consiste na possível degradação do composto analisado, evidenciado pelo espectro de massa ruidoso. Realmente, este espectro mostra um número elevado de picos, como se o equipamento apresentasse diversas impurezas na análise realizada.

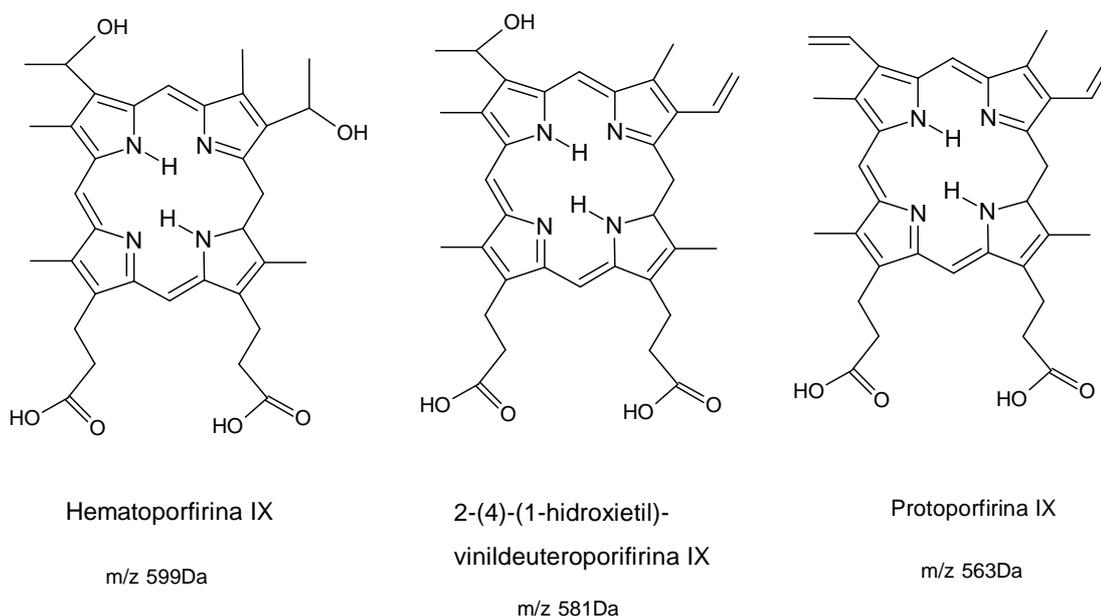
#### 4.7.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS CONCERNENTES ÀS ANÁLISES DOS COMPONENTES MAJORITÁRIOS DO PHOTOGEM<sup>®</sup>

A análise dos componentes que fazem parte da mistura denominada derivado de hematoporfirina (HpD) se mostrou intrigante e desafiadora. Esta mistura é estudada desde os anos 70 do século XX e, ainda hoje, as estruturas de seus componentes permanecem obscuras.

Neste trabalho, avanços na caracterização estrutural do Photogem<sup>®</sup> foram obtidos. Realmente, logrou-se o isolamento dos compostos majoritários presentes no Photogem<sup>®</sup> e estes componentes separados foram analisados por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível e espectrometria de massa.

A análise dos espectros de massa dos componentes isolados do sensibilizador estudado proporcionaram dados que mostram a existência de dois tipos de monômeros na mistura, a hematoporfirina IX e os dois isômeros da 2(4)-(1-hidroxietil)-vinildeuteroporfirina IX (HVD). O sinal da protoporfirina IX ( $m/z$  563Da) não foi observado nos componentes isolados. Uma possível explicação para este fato é simplesmente não haver protoporfirina IX na mistura e o sinal com  $m/z$  563Da observado na Figura 20 seria o resultado da desidratação da hematoporfirina IX ou do HVD no interior do equipamento.

As estruturas dos possíveis monômeros encontrados no Photogem<sup>®</sup> estão representadas na Figura 25.



**Figura 25**– Estrutura dos possíveis monômeros encontrados no Photogem<sup>®</sup>.

Os espectros de massa dos compostos pico 3 e pico 4 apresentaram sinais pouco intensos em m/z 1162, que podem estar associados aos dímeros citados na literatura (Siegel, 1999; Ho, 1991; Byrne, 1990). No momento, ainda não é possível elaborar uma proposta mais ampla de estrutura para o dímero em questão. De fato, essa proposição estrutural não é uma tarefa trivial baseando-se apenas nos dados “full scan” provenientes de um espectro de massas.

Vários trabalhos disponíveis na literatura empregam metodologias de ionização diferenciadas em relação ao presente estudo. De fato, modos de ionização como FAB (Ho, 1991; Byrne, 1990), do inglês Fast Atom Bombardment e MALDI (Zhan, 1994), do inglês, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization têm sido utilizados. Realmente, de nosso conhecimento, apenas um trabalho envolveu o uso de electrospray como modo de ionização (Siegel, 1999). Neste contexto, vale citar o artigo de Siegel e colaboradores (Siegel, 1999), que aborda a utilização de diversos modos de ionização, através

de uma análise comparativa dos espectros de massa dos respectivos derivados.

Neste trabalho de Siegel (Siegel, 1999), o modo de ionização electrospray apresentou menor intensidade para os sinais atribuídos aos oligômeros comparado aos outros modos de ionização empregados. Sugerem-se duas hipóteses para justificar este fato: A primeira delas estaria associada ao modo electrospray, que poderia não ser o mais apropriado para esta análise devido à baixa estabilidade dos íons formados neste modo de ionização. A segunda explicação consiste na conjectura da existência apenas de monômeros na mistura (Zhan, 1994). Desta forma, segundo Zhan e colaboradores (Zhan, 1994), os sinais referentes aos dímeros e oligômeros seriam devido à formação de dímeros na própria fonte de ionização (Gaskell, 1997).

Torna-se necessário ressaltar que medidas adicionais de espectrometria de massa são necessárias na elucidação das estruturas moleculares dos componentes desta mistura.

Estes experimentos adicionais envolvem o controle rigoroso das variáveis envolvidas (voltagem do cone de amostragem, voltagem do cone extrator e outras) com o intuito de se medir a intensidade dos picos referentes tanto ao monômero ( $m/z$  581Da) quanto ao dímero ( $m/z$  em 1162Da). Tal medida teria por objetivo confirmar se este pico é realmente proveniente do composto em questão ou é formado na fonte de ionização do equipamento. Caso a intensidade do sinal em 1162Da fosse acentuada e o pico em 581Da diminuísse, estaria comprovado que o composto se trata de um dímero. Entretanto, se não fosse verificado o aumento da intensidade do sinal referente ao dímero em nenhuma condição experimental, o composto seria um monômero.

## V CONCLUSÕES

Uma metodologia simples e acessível à grande maioria de laboratórios brasileiros foi desenvolvida para o isolamento dos componentes majoritários presentes no Photogem<sup>®</sup>, que é a versão comercial do derivado de hematoporfirina empregado em TFD no Brasil.

Este procedimento utilizou a extração em fase sólida para eliminar da mistura estudada os compostos que não são porfirinas. Uma extração subsequente promoveu a separação da mistura em três frações enriquecidas de acordo com suas respectivas polaridades. São elas: fração 1, enriquecida pelos componentes polares; fração 2, enriquecida pelos componentes de polaridade intermediária, e; fração 3, enriquecida pelos componentes apolares.

O fracionamento dos componentes da mistura tornou viável o desenvolvimento de testes de atividade biológica iniciais, utilizando-se das frações do sensibilizador. Os resultados destes testes preliminares mostraram que a fração enriquecida pelos componentes de polaridade intermediária apresentou a maior toxicidade, tanto para as células tumorais quanto para as células normais. A fração 1 apresentou uma atividade biológica semelhante à mistura disponível comercialmente, ou seja, a mistura completa.

Um resultado surpreendente foi a baixa atividade verificada para a fração formada pelos componentes mais apolares. De fato, segundo a literatura, derivados mais apolares de sensibilizadores deveriam apresentar maior atividade biológica. Uma possível explicação seria a baixa solubilidade em meio aquoso verificada nesta fração. A baixa solubilidade da fração 3 geraria agregados que diminuem sensivelmente a formação de oxigênio singlete. Portanto, a agregação explicaria a menor atividade biológica da fração 3.

Os compostos isolados por HPLC foram analisados por espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta-visível e por espectrometria de massa. As medidas de absorção no ultravioleta-visível proporcionaram o cálculo da absorvidade para cada composto em função de sua concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

A análise em conjunto dos espectros de massa com os espectros de absorção tornaram viável o cálculo do coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) dos componentes denominados picos 1 e 2, pico 3 e pico 4. O cálculo do  $\epsilon$  do pico 5 não foi possível devido ao grande número de sinais verificados em seu respectivo espectro de massa.

As análises de espectroscopia eletrônica de absorção na região do ultravioleta-visível mostraram que o composto pico 1 e 2 apresenta o maior coeficiente de absorvidade molar entre todos os compostos isolados. O pico 4 possui o segundo maior  $\epsilon$  e o pico 3 evidencia o menor dos três  $\epsilon$ . Por conseguinte, é possível inferir que, provavelmente, o composto denominado pico 1 e 2 seja responsável por grande parte da absorbância da mistura total, ou seja, a absorbância do composto pico 1 e 2 representa significativa percentagem da intensidade total de absorção obtida pelo Photogem<sup>®</sup>, em consequência da maior probabilidade da transição eletrônica ocorrer com este composto em relação aos demais componentes do fotossensibilizador em questão.

O pico 1 e 2 pode ser atribuído à hematoporfirina IX tendo-se em vista seu espectro de massa, sua absorvidade molar e seu espectro eletrônico de absorção na região do ultravioleta-visível.

Por outro lado, a caracterização dos compostos pico 3 e pico 4 não se mostrou uma tarefa trivial. De fato, duas hipóteses são, a priori, plausíveis, haja vista os respectivos espectros de massa. Estes compostos são isômeros, mas, com os dados disponíveis no momento, não se pode ainda determinar com maior precisão se os mesmos são monômeros ou dímeros. Realmente, as duas possibilidades encontram respaldo na literatura especializada, que, diga-se de passagem, não fornece muitas informações a esse respeito. Desta forma, se faz necessário avanços futuros nesta linha de pesquisa para que uma caracterização estrutural mais detalhada se torne, em um curto espaço de tempo, uma tarefa exequível. Assim sendo, no tópico subsequente, são

propostos desenvolvimentos adicionais que possam permitir um aprofundamento indispensável a esta linha de pesquisa.

## VI SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, visando ao avanço da pesquisa em torno dos fotossensibilizadores em geral e, em especial, do Photogem<sup>®</sup> propriamente considerado, é possível propor alguns desenvolvimentos futuros para essa linha de pesquisa:

Estudos adicionais de espectrometria de massa Tandem (MS/MS) onde seria possível a avaliação da fragmentação de cada pico obtido no modo “full scan”. Conseqüentemente, com os dados dessa fragmentação do pico em questão, seria factível a proposição de uma estrutura molecular mais detalhada.

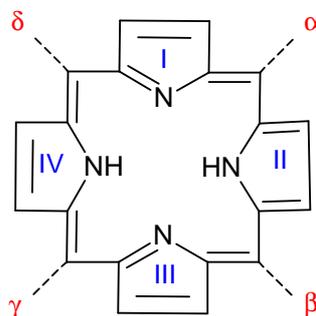
Estudos de ressonância magnética nuclear envolvendo, principalmente, técnicas bidimensionais para uma melhor diferenciação estrutural dos diferentes componentes que constituem o Photogem<sup>®</sup>.

Ampliação de testes biológicos, utilizando-se de um universo estatístico mais amplo, para uma maior compreensão dos mecanismos de ação do Photogem<sup>®</sup> e de suas frações isoladas tanto através de procedimentos experimentais *in vitro* como de estudos *in vivo*.

## Anexo A – Porfirinas

As porfirinas e seus derivados compreendem uma classe importante de moléculas presentes em sistemas biológicos. Esta classe de moléculas está presente nos processos bioquímicos mais importantes e vitais para a vida na Terra, como por exemplo, uma porfirina está relacionada com o transporte de oxigênio pelas células do sistema circulatório (White, 1968). Neste processo uma porfirina tendo o ferro como seu centro de coordenação constitui o sítio ativo das hemoglobinas e mioglobinas, responsáveis pelo transporte e armazenamento do oxigênio nos seres vivos. Encontra-se presente também na clorofila (Abraham, 1974), uma porfirina reduzida que apresenta Magnésio como seu centro de coordenação. Esta molécula é responsável pelo processo de fotossíntese, sem a qual a vida vegetal tal como a conhecemos, não seria possível. Estas duas porfirinas são responsáveis pela manutenção, em nível fisiológico, da vida na Terra. As porfirinas podem ser encontradas no petróleo, carvão e óleos vegetais (Baker, 1978)

As porfirinas são derivadas da porfina que contém quatro anéis pirrólicos ligados entre si por átomos de carbono, portanto, possuem um sistema eletrônico altamente conjugado. Este sistema é altamente conjugado, portanto suas transições eletrônicas localizam-se na faixa espectral do visível e ultravioleta próximo. A Figura a seguir ilustra a estrutura básica da porfirina com seus respectivos anéis e sua numeração mais comumente utilizada. Os quatro anéis pirrólicos são enumerados utilizando-se algarismos romanos de I a IV e os quatro carbonos das metinas, denominados também como posições meso, são identificadas pelas letras gregas  $\alpha, \beta, \gamma$  e  $\delta$ , respectivamente.



**Figura 26**– Estrutura básica das porfirinas.

As porfirinas e seus compostos derivados tem atraído interesse devido a sua importância em processos biológicos descritos anteriormente e seu potencial em medicina.

Porfirinas têm aplicação na área medica, como, por exemplo, sua utilização como agentes de contraste em tomografia de fluorescência (Sternberg, 1998), na detecção de câncer (Lipson, 1961), como agente fotossensibilizador em TFD (Dougherty, 1978) entre outras aplicações.

## **Anexo B – Extração em Fase Sólida**

A análise química de misturas complexas é um processo formado por várias etapas que vão da coleta da amostra até a análise dos resultados. Os estágios intermediários deste processo envolvem estocagem, preparo da amostra, isolamento dos analitos de interesse, sua respectiva identificação e por fim, sua quantificação (Berrueta, 1995).

Nos últimos anos, houve uma evolução notável na instrumentação utilizada na separação, detecção e identificação de compostos químicos (Jaroszewski, 2005), entretanto, houve um avanço modesto no campo do preparo de amostra. Esta etapa da análise é sem dúvida, a mais tediosa, laboriosa e decisiva de toda análise, porque nesta podem ocorrer erros críticos que comprometem a precisão e exatidão de toda a análise.

O preparo de amostra para análises cromatográficas consiste na remoção da maior quantidade possível dos compostos interferentes presentes na matriz e às vezes, da própria e solubilizar os analitos de interesse em um solvente adequado. Este procedimento é denominado “clean-up”. Há amostras onde a concentração dos analitos de interesse é baixa, então a pré-concentração destes se torna necessária e o preparo de amostra pode ser essencial para garantir sua integridade durante todo o processo de análise. A derivatização do analito é uma etapa que também pode ser exigido com o intuito de se evitar sua degradação.

Um procedimento de preparo de amostra muito utilizado é a extração líquido-líquido (ELL). Esta técnica se baseia na solubilidade relativa dos analitos de interesse em dois solventes, idealmente imiscíveis. Geralmente, as amostras estão solubilizadas em água, onde há a presença do analito e de interferentes. Essa solução é colocada dentro de um funil de separação ao qual se adiciona um solvente orgânico pouco miscível com a água, então se submete o sistema a intensa agitação e ocorre a migração do analito para a fase orgânica e a permanência dos interferentes na fase aquosa. Este método apresenta inconvenientes, tais como o uso de grande quantidade de solvente orgânico e

como consequência a geração de uma quantidade indesejada de resíduos, dificuldade de automação do método e principalmente, baixa reprodutibilidade. Outros procedimentos utilizados são a destilação, a filtração, a centrifugação, a cromatografia líquida preparativa entre outros (Lanças, 2004).

Em meados dos anos 70 do século XX foi desenvolvida uma nova técnica para superar as dificuldades citadas acima denominada Extração em Fase Sólida, ou Solid Phase Extraction (SPE). O princípio da SPE é similar ao da ELL, envolvendo a partição de compostos entre duas fases. Na SPE os analitos são particionados (ou adsorvidos, dependendo da natureza da fase sólida escolhida) entre uma fase sólida e uma fase líquida, enquanto a partição na ELL ocorre entre duas fases líquidas imiscíveis. É necessário que os analitos apresentem maior afinidade pela fase sólida do que pela fase líquida, a matriz da amostra. O mecanismo descrito acima é idêntico ao que ocorre na cromatografia líquida clássica (Lanças, 2004; Berrueta, 1995).

Nos primórdios da SPE (Rosenfeld, 1991), o procedimento de extração dos compostos de interesse era adicionar na amostra uma determinada quantidade de material sorbente adequado e agitar durante um tempo adequado. Após o tempo de equilíbrio da distribuição dos analitos nas duas fases ter sido alcançado, as duas fases eram separadas por filtração ou decantação. O analito era extraído da fase sólida lavando-a com um solvente adequado.

Atualmente, o modo de SPE mais comum é o sorbente estar empacotado entre dois discos de polietileno no interior de um cartucho de polipropileno. As fases líquidas contendo a amostra são inseridas no cartucho e a extração se dá por meio da introdução de pressão positiva ou sucção no cartucho e então a matriz contendo os interferentes é retirada enquanto os analitos permanecem no cartucho. O procedimento experimental de uma SPE pode ser descrito pelas etapas a seguir: a) ativação do sorbente passando pelo cartucho um solvente adequado; b) remoção do solvente de ativação passando pelo cartucho um líquido similar em composição ou o próprio da matriz da amostra; c) aplicação da amostra sendo que os analitos são retidos pela fase estacionária; d)

remoção dos compostos interferentes retidos na etapa anterior utilizando o mesmo solvente da matriz livre de interferentes; e) eluição ou desorção dos analitos por meio de um solvente adequado e coleta para análises posteriores (Lanças, 2004; Berrueta, 1995).

A SPE é empregada na remoção de compostos interferentes usando um solvente adequado na lavagem posterior do cartucho, na pré-concentração da amostra, onde se tem como objetivo a análise de analitos em baixas concentrações, muito utilizada na análise de poluentes em amostras de água. Outra utilização para SPE é o fracionamento de amostras complexas em frações de menor quantidade de compostos, assim como é realizado em cromatografia líquida clássica. Serve também na estocagem de analitos instáveis em solução ou analitos muito voláteis (Lanças, 2004).

O processo da SPE pode ser “off-line” ou “on-line”. A descrição anterior utilizando cartuchos onde os analitos são extraídos e posteriormente injetados em um cromatógrafo é o modo “off-line”. No modo “on-line”, o cartucho de SPE é acoplado no cromatógrafo. Procedimentos “on-line” de SPE são também chamados de técnicas de concentração por pré-coluna e pode envolver técnicas de troca ou acoplamento de colunas (Berrueta, 1995).

Os mecanismos de separação que ocorrem na SPE são similares àqueles da cromatografia líquida clássica. Por consequência, os materiais utilizados na SPE são os mesmos utilizados em cromatografia, tais como sílica gel ( $(\text{SiO}_2)_n - \text{OH}$ ), alumina  $(\text{Al}_2\text{O}_3)_n$ , florisil  $(\text{Mg}.\text{Al}(\text{SiO}_4)_n$ , carvão ativado, polímeros e fases baseadas em sílica quimicamente ligadas são amplamente empregados em SPE. A fase estacionária pode ser classificada como polar, apolar e trocadora de íons dependendo da natureza do grupo ligado a sílica. Algumas fases contendo grupos como cianopropil ou aminopropil quimicamente ligados à sílica podem ser utilizados tanto em fase normal quanto em fase reversa. As fases poliméricas apresentam a vantagem de poderem ser utilizadas na faixa completa de pH mas apresentam o inconveniente de requerer maior tempo de condicionamento do cartucho (Lanças, 2004; Berrueta, 1995).

Os principais mecanismos de separação em SPE são: adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão por tamanho. Alguns materiais utilizados em separação através de adsorção são sílica-gel, florisil® e alumina. Materiais que envolvem sílica quimicamente modificada como C<sub>18</sub> (octadecilsilano) apresenta mecanismo por partição. Sílica quimicamente ligada com grupos trocadores de cátions e ânions apresenta o mecanismo de troca iônica. No mecanismo realizado por exclusão de tamanho, a fase sólida é um polímero cujo tamanho dos poros é bem controlado, de forma a permitir a entrada de moléculas pequenas e excluir as maiores desta forma separando compostos por massa molecular. Esses mecanismos estão associados a processos físicos e químicos que atuam durante a separação. As principais forças químicas atuantes entre as moléculas do analito e a fase sólida são as forças iônicas, ligações de hidrogênio, interações do tipo dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido e dipolo induzido-dipolo induzido, também denominada de forças de dispersão (Lanças, 2004). A fase estacionária pode ser quimicamente modificada com a adição de um grupo reativo ou pode ser inserida uma solução contendo um composto reativo com o intuito de se derivatizar o analito de interesse afim de preservá-lo de degradação. Diferentes sorbentes também podem ser adicionados no mesmo cartucho com o objetivo de se obter fases estacionárias mistas (Berrueta, 1995).

## **ANEXO C – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)**

Os métodos utilizados nas análises químicas geralmente são seletivos e pouco específicos. Conseqüentemente, a separação do analito de interesse de interferentes é, na maioria dos casos, uma etapa crucial nos procedimentos analíticos. Até a metade do século XX, as separações analíticas eram realizadas de acordo com os métodos clássicos, como a precipitação, a destilação e a extração. Todavia, a partir da segunda metade do século XX, essas separações são feitas por cromatografia e eletroforese, principalmente caso os analitos estejam em matrizes complexas.

A cromatografia é um poderoso método de isolamento que pode ser aplicada em diversos ramos da ciência. O botânico russo Mikhail Tswett foi o responsável pela sua criação no início do século XX. Ele empregou a citada técnica na separação de diversos pigmentos de plantas como, por exemplo, a clorofila e a xantofila. O procedimento utilizado por Tswett foi a utilização de uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio finamente dividido e eluiu soluções contendo os pigmentos supracitados. As espécies isoladas apareciam como bandas coloridas na coluna, o que sugeriu para seu autor a escolha do nome da técnica recém-criada: cromatografia onde chroma significa cor e graphein significa escrever.

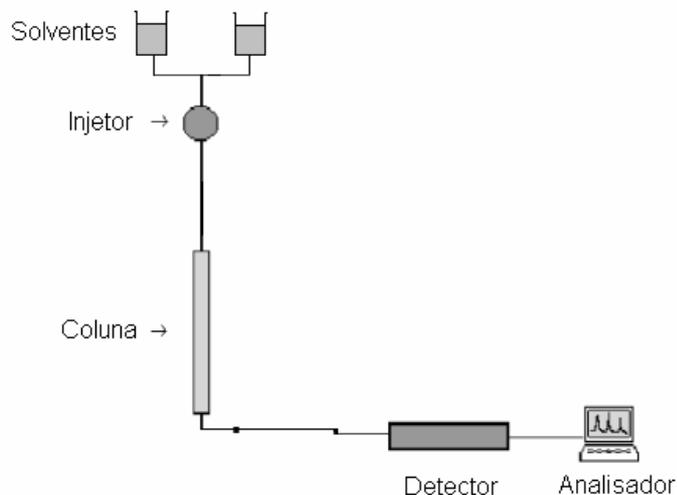
A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permite ao interessado separar componentes com estruturas semelhantes em misturas complexas. Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é 'forçada' através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada em uma coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em diversos graus. Os componentes que apresentem interações mais intensas com a fase estacionária movem-se com uma velocidade inferior que os componentes que mostrem interações mais intensas com a fase móvel.

Portanto, os componentes apresentam velocidades de eluição diferentes entre si, logo ocorrendo suas respectivas separações.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica analítica de separação mais utilizada em todos os segmentos, onde as vendas de equipamentos de HPLC superam o cifra de 1 bilhão de dólares. As razões para a popularidade deste método são a sua sensibilidade, fácil adaptação para determinações quantitativas e acima de tudo, sua ampla aplicabilidade a compostos de grande interesse em indústrias, pesquisa científica e outros. Alguns destes compostos onde a cromatografia pode ser utilizada incluem: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, carboidratos, drogas, terpenóides, pesticidas, esteróides, antibióticos, espécies organometálicas e outros.

O tipo de fase estacionária utilizada depende da natureza da amostra a ser analisada. Assim, para analitos com massas moleculares superiores a 10.000, a cromatografia de exclusão é utilizada com freqüência, embora a cromatografia de partição em fase reversa seja utilizada nestes casos. Para espécies iônicas, a cromatografia de troca iônica é amplamente utilizada. Em espécies pequenas, polares e não iônicas, os métodos de partição são os mais indicados. Em series homólogas, a cromatografia por partição é também amplamente utilizada. A cromatografia por adsorção é empregada na separação de espécies não polares e de isômeros estruturais.

Um cromatógrafo líquido é formado por diversas partes, sendo elas: reservatórios de fase móvel, sistemas de bombeamento, sistema de injeção de amostra, colunas preenchidas com a fase estacionária, detector e analisador. Nos parágrafos a seguir será descrita cada uma das partes que formam um cromatógrafo líquido. Na Figura 27 está representado um esquema de um cromatógrafo líquido.



**Figura 27** – Esquema de um cromatógrafo líquido.

Um equipamento moderno de HPLC está equipado com um ou mais reservatórios de vidro ou aço inoxidável contendo o solvente escolhido como fase móvel. Estes reservatórios estão equipados com sistemas de remoção de gases dissolvidos e filtros com o objetivo de se retirar quaisquer partículas em suspensão no solvente.

Os requisitos para um sistema de bombeamento de HPLC incluem: a geração de pressões de até 6.000 psi (libras polegadas<sup>-2</sup>); saída do fluxo com ausência de pulsos; velocidade de fluxo na região entre 0,1 a 10mL min<sup>-1</sup>, controle de fluxo e reprodutibilidade relativa de fluxo de 0,5%, no mínimo; componentes resistentes à corrosão. Deve-se mencionar que as altas pressões produzidas por bombas de HPLC não constituem risco de explosão porque os líquidos não são muito compressíveis. Portanto, a ruptura de um componente do sistema resulta somente em vazamento do solvente. Todavia, esse vazamento de solvente pode se constituir em perigo de incêndio.

O método mais utilizado para a introdução de amostra em HPLC está baseado em alças (do inglês, loop) de amostragem. Esses dispositivos

costumam ser parte integrante de equipamentos de cromatografia líquida e possuem alças que podem ser intercambiadas, permitindo a escolha de tamanhos de amostra que podem variar de 5 a 500uL. Alças de amostragem desse tipo permitem a introdução de amostras a pressões de até 7.000psi com precisão relativa de poucos décimos por cento. Válvulas para injeção de microamostras, com alças de amostragem com volumes entre 0,5 e 5uL também estão disponíveis.

As colunas para cromatografia líquida geralmente são construídas em aço inoxidável. A maioria destas colunas apresenta comprimento que varia no intervalo de 10 a 30cm. O diâmetro interno de colunas para HPLC varia no intervalo entre 1 a 4,6mm e são empacotadas com partículas de diâmetro interno entre 3 a 5um. Há dois tipos básicos de fases estacionárias para HPLC, sendo a primeira a pelicular e a segunda é formada por partículas porosas. A fase estacionária pelicular consiste em uma camada fina e porosa de sílica, alumina ou outra fase estacionária que é depositada sobre a superfície de esferas de polímero ou vidro não poroso. A fase estacionária de partículas porosas típica para HPLC consiste de partículas com diâmetros variando de 3 a 10um. Estas partículas são compostas de sílica, alumina, resina sintética de poliestireno-divinil-benzeno ou de resina de troca iônica.

Os detectores empregados em HPLC são divididos em dois grupos. O primeiro grupo é denominado de detectores de propriedades universais ou globais e respondem a propriedade da fase móvel como um todo, como por exemplo, o detector de índice de refração. O segundo grupo de detectores é denominado detectores de propriedades do soluto que respondem a alguma propriedade do soluto, como por exemplo, absorvância no UV, fluorescência, entre outras propriedades. Os detectores mais comuns são o de absorvância no UV, de absorvância no infravermelho, de fluorescência, de índice de refração, os eletroquímicos e de espectrometria de massa.

Os analisadores são utilizados para a análise dos dados conseguidos pelo cromatógrafo. Com a popularização dos computadores, um computador pessoal é utilizado como analisador. Os fabricantes de cromatógrafos oferecem

programas de computadores muito eficazes, onde é possível o cálculo de variáveis dentro do cromatograma com um simples toque do mouse (Skoog, 2002).

## **ANEXO D – ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (ESI-MS)**

A espectrometria de massa, dentre todas as ferramentas analíticas disponíveis no mercado, é talvez a de mais ampla aplicabilidade, no sentido que é capaz de fornecer dados sobre a composição elementar dos analitos; analisar estruturas de moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas; estudar a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas e as razões isotópicas de átomos nas amostras de interesse.

A primeira aplicação da espectrometria de massa em análise química de rotina ocorreu no início dos anos 40 do século XX, quando a técnica começou a ser utilizada na indústria petrolífera na análise de hidrocarbonetos produzidos em craqueamentos catalíticos. As análises destes hidrocarbonetos eram realizadas por meio de destilação fracionada e os componentes separados eram submetidos a análises de índice de refração. Descobriu-se que essas mesmas análises poderiam ser feitas através de espectrometria de massa em uma fração do tempo gasto na destilação e posterior medida de índice de refração. Esse aumento da eficiência levou ao rápido aperfeiçoamento de espectrômetros de massa comerciais.

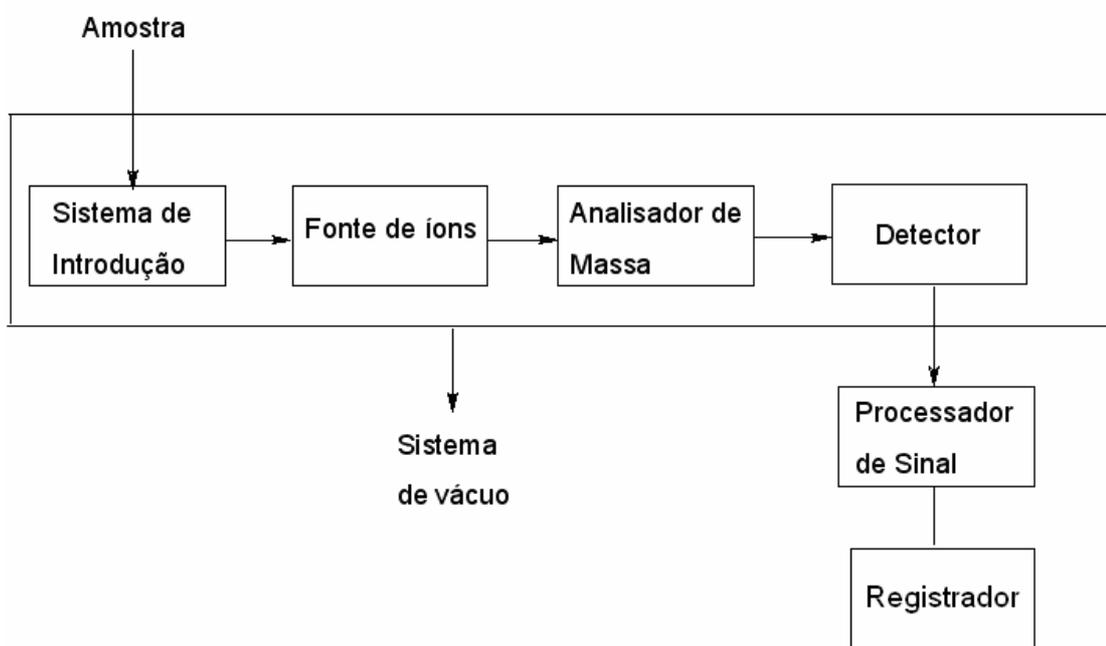
As aplicações da espectrometria de massa tiveram mudanças significativas na década de 1980, causadas pelo desenvolvimento de métodos para se produzir íons de moléculas não voláteis e termolábeis, como freqüentemente são as moléculas de interesse biológico. Atualmente, a espectrometria de massa está sendo aplicada na resolução de estruturas de proteínas, polipeptídeos e outros biopolímeros de alta massa molecular (Skoog, 2002).

Uma dos métodos de ionização em expansão hoje é o electrospray. Este modo de ionização apresenta vantagens interessantes, tais como: capacidade de produzir íons com múltiplas cargas, reduzindo assim a razão  $m/z$ , de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa, em qualquer tipo de analisador. Uma segunda vantagem é

que as amostras devem ser introduzidas em solução, que torna possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. A terceira vantagem é o fato do electrospray ser uma técnica de ionização suave.

A produção de íons em electrospray está dividida em duas etapas distintas, sendo a primeira etapa a dispersão de gotas altamente carregadas, e a segunda etapa é a evaporação de cada gota. As soluções são primeiramente pulverizadas com formação de gotículas carregadas. A nebulização da solução é facilitada pela ajuda de um gás nebulizador, geralmente nitrogênio. Posteriormente as moléculas do analito são separadas do solvente na forma de íons.

Um espectrômetro de massa está dividido em sistema de introdução de amostra, fonte de íons, analisador de massa, detector, um sistema de vácuo, um processador de sinal, e um registrador. O diagrama de blocos da figura a seguir representa os componentes de um espectrômetro de massa.



**Figura 28** – Esquema de espectrômetro de massa.

O propósito do sistema de introdução de amostra é permitir a introdução de uma amostra na fonte de íons com perda mínima de vácuo. A maioria dos espectrômetros de massa modernos é equipada com vários tipos de entradas para servir a vários tipos de amostras. Estes sistemas de entrada incluem entradas de bateladas, sonda direta, entradas cromatográficas e entradas para eletroforese capilar.

As fontes de íons de espectrômetros de massa convertem os componentes de uma amostra em íons. Geralmente, o sistema de introdução de amostra e a fonte de íons são combinados em um único componente. Em ambos os casos, o resultado é um feixe de íons positivos ou negativos que são acelerados para dentro do analisador de massa.

A função do analisador de massa é separar os íons segundo a razão carga/massa ( $m/z$ ).

O sistema de vácuo do espectrômetro de massa tem a função de criar baixas pressões ( $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  torr) em todos os componentes do equipamento, exceto no processador de sinal e no dispositivo de saída. A necessidade de alto vácuo surge porque as partículas carregadas são destruídas na presença de gases.

O detector, o processador de sinal e o registrador são responsáveis pela detecção, e processamento, e registro do sinal analítico, respectivamente (Skoog, 2002).

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, R.J.; Hawkes, G.E and Smith, K.M.; N-H tautomerism in porphyrins – NMR – study. **Tetrahedron letters**, v.16, p.1483-1486, 1974.

Abramson, A.L.; Shikowitz, M.L.; Mullody, V.M.; Steinberg, B.M.; Amella, C.A.; Rothstein, H.R. Clinical effects of Photodynamic Therapy on recurrent laryngeal papillomas. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.** v.118, p.25, 1992.

Allinger, N.L.; Cava, M.P.; De Jongh, D.C.; Johnson, C.R.; Lebel, N.A. and Stevens, C.L. Química Orgânica 2a edição, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1978.

Aveline, B.M.; Hasan, T. and Redmond, R.W.; The effects of aggregation, protein binding and cellular incorporation on the photophysical properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPDMA) **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.30, n.2-3, p.161-169, 1995.

Bagnato, V.S.; Kurachi, C.; Ferreira, J.; Marcassa, L.G.; Sibata, C.H. and Allison, R.R. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.2 p. 107-118, 2005.

Baker, E.W. and Palmer, S.E.; The porphyrins. New York, Academic Press, 1978.

Bernas, T.; Dobrucki, J.; Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and non mitochondrial fluorescent probes, **Cytometry**, v.47, p.236-242, 2002.

Berrueta, L.A.; Gallo, B.; Vicente, F.; A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. **Chromatographia** v.40 n. 7/8 p. 474-483, 1995.

Bonnett, R.; Martinez, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v.57; p. 9513-9547, 2001.

Bonnett, R.; Lambert, C.; Land, E.J.; Scourides, P.A.; Sinclair, R.S. and Truscott, T.G.; The triplet and radical species of haematoporphyrin and some of its derivatives. **Photochem. Photobiol.**, v.38, n.1, p.1-8, 1983.

Bowser, M.T.; Sternberg, E.D. and Chen, D.D.Y.; Development and application of a nonaqueous capillary electrophoresis system for the analysis of porphyrins and their oligomers (PHOTOFRIN). **Anal. Biochem.**, v.241, n.2, p.143-150, 1996.

Boyle, R.W. and Dolphin, D.; Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochem. Photobiol.**, v.64, n.3, p.469-485, 1996.

Brault, D.; Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: The importance of pH. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.6, n.1-2, p.79-86, 1990.

Byrne, C.J.; Cooper, M.A.; Cowled, P.A.; Johnstone, R.A.W.; Mackenzie, L.; Marshallsay, L.V.; Morris, I.K.; Muldon, C.A.; Raftery, M.J.; Yin, S.S. and Ward, D.; The photodynamic therapy (PDT) anticancer activity of a range of porphyrin dimers and related compounds derived from hematoporphyrin. **Aust. J. Chem.**, v.54, p.1091-1102, 2004.

Byrne, C.J.; Marshallsay, L.V.; Ward, A.D. The composition of Photofrin® II. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.6, p.13-27, 1990.

Byrne, C.J.; Marshallsay, L.V.; Ward, A.D. The structure of the active material in hematoporphyrin derivative. **Photochem. Photobiol.**, v.46, n.5. p.575-580, 1987.

Calzavara-Pinton, P.G.; Venturini, M.; Sala, R.; A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.78, p.1-6, 2005.

Chan, E.N.L.; Goodall, D.M.; Capillary electrophoresis analysis of polyhaematoporphyrin, a photosensitizer used in photodynamic therapy. **Journal of Chromatography**, v.636, p.171-178, 1993.

- Chwilkolswa, A.; Saczko, J.; Modrzycka, T.; Marcinkowska, A.; Malarska, A.; Bielewicz, J.; Patalas, D.; Banas, T.; Uptake of Photofrin II, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells in vitro. **Acta Biochim. Polon.**; v.50, n.2, p.509-513, 2003.
- Chaudhuri, K.; Keck, R.W. and Selman, S.H.; Morphological changes of tumor microvasculature following hematoporphyrin derivative sensitized photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.46, n.5, p.823-827, 1987.
- Chou, T.H.M., *CalcuSyn: Windows software for dose effect analysis.*, in Biosoft, Cambridge. 1996.
- Cotton, F.A.; Wilkinson; G.; Gaus, P.L. **Basic Inorganic Chemistry**, 2.ed. Singapore, John Willey & Sons, Cap.3,18 p.48;53-57;106;370, 1987.
- Denizot, F.; Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v.89, p.271-277, 1986.
- Dougherty, T.J.; Photosensitizers: therapy and detection of malignants tumors. **Photochem. Photobiol.**; v.45, n.6, p.879-889, 1987a.
- Dougherty, T.J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin® II. **Photochem. Photobiol.**, v.46, n.5, p. 569-573, 1987b.
- Dougherty, T.J.; Potter, w.R.; Weishaupt, K.R. Drugs comprising Porphyrins./ Patente Industrial n. 4,649,151 (EUA) ; 14/05/1984.
- Dougherty, T.J.; Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors. **Photochem. Photobiol.**, v. 38, n.3, p. 377-379, 1983.
- Dougherty, T.J.; Lawrence, G.;Kaufman, J.E.; Boyle, D.; Weishaupt, K.R. and Goldfarb, A.; Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.62, p.231-237, 1979.

Dougherty, T.J.; Kaufman, J.E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K.R. Boyle, D. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res.**, v.38, p.2628-2635, 1978.

Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Weishaupt, K.R.; Energetics and Efficiency of Photoinactivation of Murine Tumor Cells Containing Hematoporphyrin. **Cancer Res.** ,v.26, p.2330-2333, 1976.

Dougherty, T.J.; Grindey, G.B.; Fiel, R.; Weishaupt, K.R.; Boyle, D.G.; Photoradiation Therapy: Cure of Animal Tumors with Hematoporphyrin and Light. **J. Natl. Cancer Inst.**; v.55, p.115-121, 1975.

Evensen, J.F.; Sommer, S.; Moan, J.; Christensen, T.; Tumor-localizing and photosensitizing properties of the main components of hematoporphyrin derivative. **Cancer Res.**, v.44, p. 482-486, 1984.

FDA- Food and Drugs Administration – disponível em , <<http://www.fda.gov>> Acesso em 31/05/2006.

Gaskell, S.J.; Electrospray: Principles and Practice. **Journal of Mass Spectrometry**, v.32, p.677-688, 1997.

Gèze, M.; Morlière, P.; Mazière, J.C.; Smith, K.M.;Santus, R.; Lysosomes, a key target of hydrophobic photosensitizers proposed for photochemotherapeutic applications. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.20, p.23-35, 1993.

Gouterman, M. Study of the effects of substitution on the absorption spectra of porphyrin. *J.Chem. Phys*, v. 30, n.5 p.1139-1161, 1959.

Gullino, P.M.; Grantham, F.H.; Smith, S.H. and Haggerty, A.C.; Modifications of the acid-base status of the internal milieu of tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.34, n.6, p.857-869, 1965.

Ho, Y.-K.; Missert, J.R. and Dougherty, T.J.; Activity and physicochemical properties of Photofrin®. **Photochem. Photobiol.**, v. 54, n.1, p.83-87, 1991.

Hombrecher, H.K. and Ohm, S. An efficient synthesis of tetraaryl porphyrins substituted with ester groups bearing long alkyl chains. **Tetrahedron**, v.49, n.12, p. 2447-2456, 1993.

INCA – Instituto Nacional do Câncer– disponível em: < <http://www.inca.gov.br>> Acesso em 31/05/2006).

Jaroszewski, J.W.; Hyphenated NMR methods in natural products research, part2: HPLC-SPE-NMR and other new trends in NMR hyphenation. **Planta Med.**; v.71, p.795-802, 2005

Kalyanasundaram, K. Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes. San Diego, Academic Press INC., 1992.

Kessel, D.; Cheng, M-L.; Biological and biophysical properties of the tumor-localizing component of hematoporphyrin derivative. **Cancer Res.**,v.45, p.3053-3057, 1985a.

Kessel, D.; Cheng, M.L.; On the preparation and properties of dihematoporphyrin ether, the tumor-localizing component of HPD. **Photochem. Photobiol.**, v.41, n.3, p.277-282, 1985b.

Kessel, D.; Proposed structure of the tumor-localizing fraction of HPD (hematoporphyrin derivative). **Photochem. Photobiol.**, V.44, n.2, p.193-196, 1986.

Kessel, D.; Thompson, P.; Musselman, B.; Chang, C.K. Chemistry of hematoporphyrin-derived photosensitizers. **Photochem. Photobiol.**, v.46, n.5, p.563-568, 1987.

Kurachi, C.; Melo, C.S.; Marcassa, L.G.; Zílio, S.C.; Bagnato, V.S.; Cestari Filho, G.A.; Javaroni, A.; Berto, J.C.; Passeri, C.; Bonilha, V.S.; Silva, M.; Ferreira, J.; Veríssimo, F.M.; Souza, C.S.; Implantação clínica da terapia fotodinâmica no Brasil: breve histórico e resultados alcançados. **Rev. da Soc. Brás. de Cancerologia**, v.20, p.33-41, 2002.

Lanças, F.M.; **Métodos Cromatográficos de Análise – Extração em Fase Sólida**, v.4, São Carlos, Editora Rima, 2004.

Levy, J.G.; Photodynamic Therapy, **Trends in Biotechnol.** v.13, p.14-18, 1995.

Lipson, R. L; Baldes, E. J. ; Olsen, A. M. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.26, p.1-8, 1961.

Marmur, E.S.; Schmults, C.D.; Goldberg, D.J.; A Review of Laser and Photodynamic Therapy for the Treatment of Nonmelanona Skin Cancer. **Dermatol. Surg.** v.30, p,264-271, 2004.

Matile, S.; Berova, N.; Nakanishi, K.; Fleischaurer, J. and Woody, R.W.; Structural studies by exciton coupled circular dichroism over a large distance: porphyrin derivatives steroids, dimeric steroids, and brevetoxin B. **J. Am. Chem. Soc.**, v.118, n.22 p. 5198-5206, 1996.

Medeikonos – Developing PDT <[http://www.medeikonos.com/eng/1\\_1.htm](http://www.medeikonos.com/eng/1_1.htm)> acesso em 26 jun 2006.

Milanesi, C.; Biolo, R.; Reddi, E. and Jori, G.; Ultrastructural studies on the mechanism of the photodynamic therapy of tumors. **Photochem. Photobiol.**, v.46, n.5, p.675-681, 1987.

Mironov, A.F.; Nizhnik, A.N. and Nockel, A.Y. Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. **Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.4, p.297-306, 1990.

Moan, J.; Rimington, C.; Malik, ZVI. Photoinduced degradation and photomodification of Photofrin<sup>®</sup> II in cells in vitro. **Photochem. Photobiol.**, v.47, p.363-367, 1988.

Moan, J.; Peng, Q.; Evensen, J.F.; Berg, K.; Western, A. and Rimington, C.; Photosensitizing efficiencies, tumor and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. **Photochem. Photobiol.**, v.46, n.5, p.713-721, 1987.

- Moan, J.; Porphyrin photosensitization and phototherapy. **Photochem. Photobiol.**; v.43, n.6, p. 681-690, 1986.
- Morris, I.K.; Ward, A.D. The synthesis of dihematoporphyrin ether and related porphyrin dimers. **Tetrahedron Lett.**, v.29, n.20, p. 2501-2504, 1988.
- Nelson, J.S.; Liaw, L.-H. and Berns, M.W.; Tumor destruction in photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.46, n.5, p.829-835, 1987.
- Ochsner, M. Photophysical and photobiological process in the photodynamic therapy of tumors. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.39, p.1-18, 1997.
- Oenbrink, G.; Jurgenlimke, P.; Gabel, D.; Accumulation of porphyrins in cells: influence of hydrophobicity aggregation and protein binding. **Photochem. Photobiol.**, v.48, n.4, p.451-456, 1988.
- Okunaka, T.; Kato, H.; Tsutsui, H.; Ishizumi, T.; Ichinose, S.; Kuroiwa, Y. Photodynamic therapy for peripheral lung cancer. **Lung Cancer**, v.43, p.77-82, 2004.
- Owens, J.W.; Yang, L.; Adeola, G.; Robins, M.; Smith, R.; Robinson, R.; Elayan, N.; McMahon, L.; Isolation and photodynamic effects of hematoporphyrin derivative components: a chromatographic analysis of the starting materials. **J. Chromatogr. B**, v.669, p.295-309, 1995.
- Owens, J.W.; Robins, M.; Robinson, R.; Smith, R. Chromatographic analysis of photodynamically significant porphyrin dimers and trimers. **J. Chromatogr. B**, v.682, p.327-336, 1996.
- Pandey, R.K.; Zeng, G.; Lee, D.A.; Dougherty, T.J. and Smith, K.M.; Comparative *in vivo* sensitizing efficacy of porphyrin and chlorine dimers joined with ester, ether, carbon-carbon or amide bonds. **Journal of Molecular Recognition**, v.9, p.118-122, 1996.
- Pandey, R.K.; Shiau, F.Y.; Dougherty, T.J.; Smith, K.M. Regioselective synthesis of ether-linked porphyrin dimers and trimers related to Photofrin<sup>®</sup> II. **Tetrahedron**, v.47, n.46, p.9571-9584, 1991.

- Pandey, R.K.; Shiau, F.Y.; Medforth, C.J.; Dougherty, T.J.; Smith, K.M. Synthesis, stability and tumoricidal activity of porphyrin dimers and trimers with ethers linkages. **Tetrahedron Lett.**, v. 31, n.51, p.7399-7402, 1990a.
- Pandey, R.K.; Shiau, F.Y.; Medforth, C.J.; Dougherty, T.J.; Smith, K.M. Efficient synthesis of porphyrin dimers with carbon-carbon linkages. **Tetrahedron Lett.**, V.31, n.6, p.789-792, 1990b.
- Raab, O.; Ueber die Wirkung fluoreszierenden Stoffe auf Infusorien. **Z. Biol.**, v.39, p.524-556, 1900.
- Razum, N.; Balchum, O.J.; Profio, A.E. and Carstens, F.; Skin photosensitivity: duration and intensity following intravenous hemaporphyrin derivatives, HpD and DHE. **Photochem. Photobiol.**, v.46, n.5, p.925-928, 1987.
- Rosenfeld, J.M.; Mohair, Y.; Hill, R.; Direct solid-phase isolation and oximation of prostaglandin-E2 from plasma and quantitation by gas-chromatography with mass-spectrometric detection in the negative-ions chemical ionization mode. **Anal. Chem.** V.63, n.15, p.1536-1541, 1991.
- Schuitmaker, J.J.; Baas, P.; van Leegoed, H.L.L.M.; van der Meulen, F.W.; Star, W.M.; van Zanewijk, N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. **Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 34, p. 312, 1996.
- Sharman, W.M.; Allen, C.M.; van Lier, J.E. Photodynamic therapeutics: basics principles and clinical applications. **Therapeutic focus, Reviews, DDT**, v.4, p. 507-517, 1999.
- Sibata, C.H.; Colussi, V.C.; Oleinick, N.L.; Kinsella, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.869-880, 2000.
- Siegel, M.M.; Tabei, K.; Tsao, R.; Pastel, M.J.; Pandey, R.K.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F. and de Vries, M.S.; Comparative mass spectrometry analysis of Photofrin oligomers by fast atom bombardment mass spectrometry, UV and IR matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, electrospray ionization mass spectrometry and laser desorption/jet-cooling

- photoionization mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v.34, p.661-669, 1999.
- Simplicio, F.I.; Maionchi, F. and Hioka, N.; Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, v.25, n.5, p.801-807, 2002.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J. and Nieman, T.A.; Princípios de Análise Instrumental, São Paulo, Bookman, Cia. Editora, 2002.
- Skovsen, E.; Snyder, J.W.; Lambert, J.D.C. and Ogilby, P.R.; Lifetime and diffusion of singlet oxygen in a cell. **J. Phys. Chem. B**, v.109, n.18, p.8570-8573, 2005.
- Snyder, J.W.; Skovsen, E.; Lambert, J.D.C. and Ogilby, P.R.; Subcellular, time-resolved studies of singlet oxygen in single cells. **J. Am. Chem. Soc.** v.127, n.42, p.14558-14559, 2005.
- Sommer, S.; Rimington, C.; Moan, J.; Porphyrin derivatives having physical and chemical characteristics similar to those of the active components of hematoporphyrin derivative and with very strong photosensitizing effects. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.1, p.241-246, 1987.
- Sternberg, E.D. and Dolphin, D.; Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v.54, p.4151-4202, 1998.
- Tanielian, C.; Schweitzer, C.; Mechin, R.; Wolf, C. Quantum yield of singlet oxygen production by monomeric and aggregated forms of hematoporphyrin derivative. **Free Radical Biol. Med.**, v.30, n.2 p. 208-212, 2001.
- Tanielian, C.; Heirich, G.; Effect of aggregation on the hematoporphyrin-sensitized production of singlet molecular oxygen. **Photochem. Photobiol.**, v.61, n.2, p.131-135, 1995.
- Tipler, P. Física para cientistas e engenheiros. Volume 4 Óptica e Física Moderna Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 1995.

- Umegaki, N.; Moritsugu, R.; Katoh, R.; Harada, K.; Nakano, H.; Tamai, K.; Hanada, K.; Tanaka, M. Photodynamic therapy may be useful in debulking cutaneous lymphoma prior to radiotherapy. **Clinical Dermatology**, v.29, p.42-45, 2004.
- Vollhardt, K.P.C. and Schore, N.E.; Química Orgânica 4o edição, Porto Alegre, Bookman, 2004.
- Weishaupt, K.R.; Gomer, C.J.; Dougherty, T.J. **Cancer Res.**, v.36, p. 2326-2329, 1976.
- White, A.; Handler, P and Smith, E.L.; **Principles of biochemistry**. New York, Academic Press, 1968.
- Wilson, B.D.; Mang, T. Photodynamic therapy for cutaneous malignancies. **Clinics in Dermatology**, v. 13, p.91-96, 1995.
- Zhan, Q.; Vounard, P. and Zenobi, R.; Chemical analysis of cancer therapy photosensitizer by two-step laser mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v.66, n.19, p.3259-3266, 1994.