**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTODITHAZINE E
CITOTOXICIDADE DOS FOTOPRODUTOS FORMADOS
APÓS IRRADIAÇÃO COM LASER**

Juliana Camilo Corrêa

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências
(Química Analítica)

Orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos

2006

“O importante não é estar aqui ou ali, mas ser.
E ser é uma ciência delicada,
feita de pequenas-grandes observações do cotidiano,
dentro e fora da gente.
Se não executarmos essas observações,
não chegamos a ser:
apenas estamos e desaparecemos.”

(Carlos Drummond de Andrade)

Dedico esta dissertação às pessoas que
compartilharam e compartilham comigo
todos os momentos da minha vida,
bons ou ruins.

Ao meu pai (in memoriam), à minha mãe,
as minhas irmãs e ao meu namorado.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente à Deus. Ele que me deu o dom da existência, saúde, coragem e força para superar tantos momentos difíceis e a seguir em frente e principalmente, por me dar uma família maravilhosa.
- À minha orientadora Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo conhecimento e aprendizado importantes para minha vida profissional e pela confiança, amizade, apoio e grande incentivo.
- À FAPESP pelo apoio financeiro.
- As pessoas mais importantes da minha vida, das quais me orgulho muito: minha família. À minha mãe, pelos ensinamentos de vida, pela dedicação, compreensão, amizade e amor, pela presença e papel de mãe e ultimamente também de pai. Às minhas irmãs, Valéria e Thaís, pelo carinho, incentivo e apoio em todos os momentos. Ao meu pai (in memoriam), para quem eu prometi sempre fazer orgulhar-se de mim, pelos ensinamentos de vida e pela presença eterna em minha vida. Amo vocês!!!
- Ao meu namorado, amigo e companheiro, Rodrigo, por estar sempre disposto a ouvir aos meus inúmeros relatórios semanais, por participar integralmente de minha vida, pelo incentivo, compreensão, amizade e amor. Amo você!!!
- À todos os meus familiares que nunca deixaram de se preocupar comigo, de me perguntar como iam meus estudos e por torcerem por mim.
- À Ciza por estar presente no meu dia a dia, participando das minhas alegrias e apreensões, pela amizade, paciência e incentivo.
- Aos meus amigos de Brotas, em especial à Reila, à Ana Sílvia e à Simone, que sempre estão informadas das minhas obrigações, pelo carinho, amizade e incentivo.
- Aos meus amigos que conheci e conquistei nestes anos de pós-graduação. Não gostaria de citar nomes, mas não posso deixar de citar a Vanessa e a Rafaela pelo carinho, amizade e apoio.
- Ao pessoal do laboratório, pela amizade conquistada por cada um. À Cláudia, à Priscila e ao Renato, por me fazerem sentir tão bem no ambiente de trabalho, por me tratarem com tanto carinho, cada qual no seu modo, pelos ensinamentos, idéias, auxílio e incentivo. Jamais vou esquecer de vocês, principalmente do “Juju”, a forma carinhosa pela qual me chamam.

- À Valéria (in memorium), em especial, pelos ensinamentos, sugestões, colaboração e incentivo. Embora tenhamos convivido por pouco tempo, conquistou minha amizade e é a quem devo minha paixão pelas “menininhas”, as células.
- As minhas novas amigas que conquistei no trabalho, em especial à Rosana e à Michelli, por me fazerem sentir tão bem neste ambiente, por estarem sempre dispostas a me ouvir, pelo carinho e apoio.
- A todos que participaram e me apoiaram em mais esta etapa da minha vida. Obrigada!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUÇÃO	01
1.1 Câncer	01
1.1.1 Câncer de laringe	02
1.2 Terapias convencionais para o câncer	02
1.3 Terapia Fotodinâmica ou PDT	04
1.4 Processos fotoquímicos envolvidos na terapia fotodinâmica	07
1.5 Fotossensibilizadores	10
1.6 Porfirinas	13
1.7 Clorinas	17
1.8 Sistemas ópticos para a fotossensibilização	20
1.9 Fotodegradação de fotossensibilizadores	21
II. OBJETIVOS	26
III. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Fotossensibilizador	27
3.2 Cultura de células	27
3.3 Teste de viabilidade	28
3.4 Estocagem das células	28
3.5 Investigação da agregação do Photodithazine	29
3.6 Indução da fotodegradação do Photodithazine com laser e obtenção dos fotoprodutos	30

3.7 Análise dos espectros através do algoritmo “Convex Constraint Analysis (CCA)”	30
3.8 Ensaio citotóxicos	32
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Espectros de absorção e de emissão de fluorescência do Photodithazine	33
4.2 Agregação do Photodithazine	35
4.3 Estudo da estabilidade do Photodithazine	36
4.3.1 Estabilidade em função do solvente	36
4.3.2 Estabilidade em função do tempo de armazenamento	37
4.4 Fotodegradação induzida do Photodithazine	38
4.4.1 Efeito do tempo de irradiação	40
4.4.1.1 Espectroscopia de absorção	40
4.4.1.2 Espectroscopia de fluorescência	46
4.4.2 Efeito da intensidade de irradiação	48
4.4.2.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência	48
4.4.3 Efeito da concentração	51
4.4.3.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência	51
4.4.4 Efeito do pH	56
4.4.4.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência	56
4.4.5 Efeito de surfactantes	60
4.4.5.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência	60
4.4.6 Efeito de supressores na fotodegradação do PDZ	63
4.4.6.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência	63
4.5 Ensaio citotóxicos	65
4.5.1 Ensaio citotóxicos na ausência de luz (escuro)	65
4.5.1.1 Efeito do tempo de incubação e da presença de soro na citotoxicidade no escuro do Photodithazine não irradiado	65
4.5.1.2 Citotoxicidade no escuro do Photodithazine não irradiado e previamente irradiado em 488, 514 e 630 nm	68
4.5.1.3 Efeito da intensidade de irradiação na citotoxicidade no escuro do Photodithazine previamente irradiado em 488, 514 e 630 nm em células normais e tumorais	71
4.5.2 Ensaio citotóxicos na presença de luz (no claro)	73

4.5.2.1 Efeito da luz em cultura de células	73
4.5.2.2 Efeito do tempo de incubação, do soro e da dose de luz na citotoxicidade no claro do Photodithazine não irradiado	77
4.5.2.3 Citotoxicidade no claro do Photodithazine não irradiado e previamente irradiado em 488, 514 e 630 nm	81
4.5.2.4 Efeito da intensidade de irradiação na citotoxicidade no claro do Photodithazine irradiado em 488, 514 e 630 nm	84
V. CONCLUSÕES	86
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema indicando a seqüência de aplicação da Terapia Fotodinâmica para o tratamento de um tumor	05
Figura 2:	Diagrama de Jablonski	08
Figura 3:	Representação esquemática do sistema de transporte e localização dos fotossensibilizadores e os principais alvos fotodinâmicos dos tumores <i>in vivo</i>	11
Figura 4:	Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração de luz de diferentes comprimentos de onda	13
Figura 5:	Estrutura básica das porfirinas	14
Figura 6:	Estrutura química do Photofrin [®] , evidenciando a formação de uma ligação tipo éter entre duas unidades de porfirina	15
Figura 7:	Estrutura química de alguns fotossensibilizadores	16
Figura 8:	Estrutura química do Photodithazine	18
Figura 9:	Espectro de absorção (A) do PDZ 10 µg.mL ⁻¹ e (B) do Photogem [®] 25µM/mL em tampão fosfato pH 7,4	19
Figura 10:	Esquema das possíveis fototransformações de fotossensibilizadores em solução aquosa	24
Figura 11:	Esquema de irradiação dos fotossensibilizadores: (A) 488nm, (B) 514nm e (C) 630nm	30

Figura 12:	Espectro de absorção ótica do PDZ em PBS na concentração $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em pH 7,4	33
Figura 13:	Espectros de emissão de fluorescência do PDZ em PBS na concentração $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em pH 7,4 com excitação em (A) 401, (B) 465 e (C) 505nm	34
Figura 14:	(A) Absorbância em 505nm e (B) fluorescência em 656nm do Photodithazine em PBS, pH 7,4 em função da concentração do fotossensibilizador	35
Figura 15:	Espectro de (A) absorção ótica e de (B) emissão de fluorescência do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em água, PBS e tampão fosfato	36
Figura 16:	(A) Espectro de absorção ótica do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS no período de 16 meses de armazenamento e (B) absorbância em 655nm em função do tempo de armazenamento	37
Figura 17:	Espectros de absorção ótica do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ fotodegradado com LED em 630nm de 0 à 60 min com intensidade de 25mW.cm^{-2} (A) em PBS (B) em tampão fosfato 1mM (C) em tampão fosfato 20mM, pH 7,4	38
Figura 18:	Valores de absorbância em (A) 401 nm e (B) 655 nm e de fluorescência em (C) 656 nm em função do tempo de irradiação quando PDZ $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS, tampão fosfato 1mM e tampão fosfato 20mM é irradiado com LED em 630 nm de 0 à 60 min com intensidade de 25mW.cm^{-2}	39
Figura 19:	Espectro de absorção ótica do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (A) 488nm, (B) 514nm e com LED em (C) 630nm por diferentes tempos de irradiação	40
Figura 20:	Gráficos obtidos pelo método CCA para PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (A) 488nm, (B) 514nm e com LED em (C) 630nm por diferentes tempos de irradiação	41

Figura 21:	Variação na absorbância em (A) 401nm e (B) 655nm do PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em 488nm e 514nm e com LED em 630nm, $I = 25\text{mW.cm}^{-2}$, em função do tempo de irradiação	42
Figura 22:	Espectro de emissão de fluorescência do PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (A) 488nm (B) 514nm e com LED em (C) 630nm por diferentes tempos de irradiação	46
Figura 23:	Variação da fluorescência em 656 nm do PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em 488nm e 514nm e com LED em 630nm, $I = 25\text{mW.cm}^{-2}$, em função do tempo de irradiação	47
Figura 24:	Espectro de (A) absorção ótica e de (B) fluorescência do PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com LED em 630nm por diferentes intensidades de irradiação	49
Figura 25:	Variação da absorbância em 401nm do PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (■) 488, (●) 514nm e com LED em (▲) 630nm por 10min em função da intensidade de irradiação	50
Figura 26:	Espectros de absorção do PDZ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (A) 514nm e com LED em (B) 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min em função da concentração (10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	52
Figura 27:	Absorbância em 401nm em função da concentração da solução de PDZ (10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) não irradiado e irradiado com laser de argônio em (A) 514nm e com LED em (B) 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min	53
Figura 28:	Espectros de fluorescência do PDZ em PBS fotodegradado (10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com laser de argônio em (A) 514nm e com LED em (B) 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min	54

Figura 29:	Espectros de absorção ótica do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em função do pH (A) não irradiado e (B) irradiado com LED em 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min	57
Figura 30:	Absorbância em 655nm em função do pH para solução de PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS não irradiado e irradiado com LED em 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min	58
Figura 31:	Espectro de fluorescência do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes pHs (A) não irradiado e (B) irradiado com LED em 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min	59
Figura 32:	Espectros de absorção do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução de (A) Triton-X e de (B) Brij-35 irradiado com LED em 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} de 0-180 min	61
Figura 33:	Variação da (A) absorbância em 401nm e da (B) fluorescência em 656nm do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na ausência ou presença de Triton e Brij-35 fotodegradado com LED em 630nm, $I = 25\text{mW.cm}^{-2}$, em função do tempo de irradiação .	62
Figura 34:	Variação da (A) absorbância em 401nm e da (B) fluorescência em 656nm do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ fotodegradado com LED em 630nm, $I = 25\text{mW.cm}^{-2}$, na ausência ou presença de azida e manitol	64
Figura 35:	Efeito da luz sobre a proliferação das células VERO () e de células HEP-2 (□) em função da intensidade e do tempo de irradiação	76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I:	Tempo de decaimento das bandas do espectro do PDZ após sua irradiação em 488, 514 e 630nm 43
Tabela II:	Valores de tempo de decaimento obtidos pelo do método do CCA para a banda de Soret do PDZ após sua irradiação em 488, 514 e 630nm 43
Tabela III:	Valores de tempo de decaimento da banda de Soret do PDZ e do Photogem [®] após irradiação em 630nm 44
Tabela IV:	Valores de tempo de decaimento das bandas do espectro do PDZ de absorção e fluorescência após sua irradiação em 488, 514 e 630nm 48
Tabela V:	Tempo de decaimento da banda de Soret do espectro de absorção do PDZ após sua irradiação com laser em 488, 514nm e com LED em 630nm em diferentes intensidades 50
Tabela VI:	Citotoxicidade no escuro do PDZ não irradiado na linhagem celular VERO em relação ao tempo de incubação e à presença de soro. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos citotóxicos realizados em cada condição. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO ₂ 66
Tabela VII:	Citotoxicidade no escuro do PDZ não irradiado na linhagem celular HEp-2 em relação ao tempo de incubação e à presença de soro. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos citotóxicos realizados em cada condição. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO ₂ 67
Tabela VIII:	Citotoxicidade no escuro dos fotoprodutos do PDZ obtidos após irradiação em 488, 514 e 630nm para as células normais VERO. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e 5% CO ₂ 69

Tabela IX:	Citotoxicidade no escuro dos fotoprodutos do PDZ obtidos após irradiação em 488, 514 e 630nm para as células tumorais HEP-2. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e 5% CO ₂ 70
Tabela X:	Valores de IC ₅₀ do PDZ no escuro para a linhagem VERO, após o PDZ ter sido fotodegradado em 488, 514nm e 630nm em diferentes intensidades de irradiação. As células foram incubadas por 2h a 37°C e 5% CO ₂ . O número de experimentos realizados foi igual ou superior a quatro 71
Tabela XI:	Valores de IC ₅₀ do PDZ no escuro para a linhagem HEP-2, após o PDZ ter sido fotodegradado em 488, 514nm e 630nm em diferentes intensidades de irradiação. As células foram incubadas por 2h a 37°C e 5% CO ₂ . O número de experimentos realizados foi igual ou superior a quatro 72
Tabela XII:	Efeito da intensidade de luz sobre o índice de sobrevivência celular (I.S.) para as células normais (VERO), nas intensidades de irradiação de 13, 20 e 25mW.cm ⁻² , em tempos variando de 0 - 60 min. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO ₂ 74
Tabela XIII:	Efeito da intensidade de luz sobre o índice de sobrevivência celular (I.S.) para as células tumorais (HEP-2), nas intensidades de irradiação de 13, 20 e 25mW.cm ⁻² , em tempos variando de 0 - 60 min. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO ₂ 75
Tabela XIV:	Citotoxicidade no claro do PDZ não irradiado na linhagem celular VERO em função do tempo de incubação, da presença de soro e da dose de luz. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos citotóxicos realizados em cada condição. A intensidade de irradiação igual 25mW.cm ⁻² . As células foram incubadas a 37°C e 5% CO ₂ 77

Tabela XV:	Citotoxicidade no claro do PDZ não irradiado na linhagem celular HEp-2 em função do tempo de incubação, da presença de soro e da dose de luz. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos citotóxicos realizados em cada condição. A intensidade de irradiação igual 25mW.cm^{-2} . As células foram incubadas a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ 78
Tabela XVI:	Citotoxicidade no escuro e no claro do PDZ e do Photogem [®] nas linhagens VERO e HEp-2. As células foram expostas a 2h de incubação sem soro a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ e, no claro, foram irradiadas por 21 min com LED com intensidade de 25 mW.cm^{-2} (Dose = $31,5 \text{ J.cm}^{-2}$) 80
Tabela XVII:	Citotoxicidade no claro dos fotoprodutos do PDZ induzidos por irradiação em 488,514 e 630 nm para as células VERO. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ e irradiadas com LED em 630 nm com intensidade de 25 mW.cm^{-2} por 14 min 82
Tabela XVIII:	Citotoxicidade no claro dos fotoprodutos do PDZ induzidos por irradiação em 488, 514 e 630 nm para as células HEp-2. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ e irradiadas com LED em 630 nm com intensidade de 25 mW.cm^{-2} por 14 min 82
Tabela XIX:	Valores de IC_{50} do PDZ no claro para a linhagem VERO quando o PDZ é fotodegradado laser em 488, 514 e 630nm em diferentes intensidades de irradiação. As células foram incubadas por 2h a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ e irradiadas com LED em 630 nm com intensidade de 25 mW.cm^{-2} por 14 min. Número de experimentos ≥ 4 84
Tabela XX:	Valores de IC_{50} do PDZ no claro para a linhagem HEp-2 quando o PDZ é fotodegradado em 488, 514 e 630nm em diferentes intensidades de irradiação. As células foram incubadas por 2h a 37°C e $5\% \text{ CO}_2$ e irradiadas com LED em 630 nm com intensidade de 25 mW.cm^{-2} por 14 min. Número de experimentos ≥ 4 85

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA – ácido 5-aminolevulínico

ATCC – do inglês, American Type Culture Collection

Brij-35 – Éter lauril polioxietileno

BSA – do inglês, bovine serum albumin

DMEM – do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxiribonucleico

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

FS – Fotossensibilizador

HEp-2 – linhagem celular tumoral de laringe humana

HpD – do inglês, Hematoporphyrin Derivative

LDL – do inglês, Low Density Lipoprotein

LED – do inglês, light emitting diode

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil tetrazólio

m-THPC – meta-tetra(hidroxifenil)clorina

PBS – solução salina tamponada com fosfato

PDT – do inglês, Photodynamic Therapy

PDZ – do inglês, Photodithazine

SFB – soro fetal bovino

TRITON X-100 – t-octil-fenoxipolietoxi-etanol

Versene – solução de EDTA 0,02%

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica consiste em uma nova e promissora técnica de diagnóstico e tratamento de tumores malignos. O tratamento se baseia na administração intravenosa de um fotossensibilizador que acumula-se seletivamente em tecido tumoral, sendo a seguir excitado com luz visível gerando espécies tóxicas às células levando-as à morte. Neste trabalho estudou-se o Photodithazine (PDZ), uma nova droga fotossensibilizadora produzida na Rússia que consiste de um derivado hidrossolúvel de mono-L-aspartil clorina, com potencial aplicação em Terapia Fotodinâmica (PDT). A fotodegradação do PDZ foi induzida em diferentes condições e a citotoxicidade do PDZ não irradiado e previamente irradiado foi investigada na ausência (escuro) e presença de luz (claro) em células normais (VERO) e tumorais (HEp-2). A fotodegradação do PDZ foi induzida com laser (488 e 514 nm) e com LED (630 nm). Quando PDZ é fotodegradado ocorre uma diminuição da intensidade de absorção e fluorescência e o aparecimento de uma nova banda de absorção em 668nm, o que sugere transformações químicas que levam à formação de fotoprodutos. Análises realizadas através do método CCA (Convex Constrain Analysis) demonstraram que existem duas espécies distintas, uma que se degrada e outra que se forma (fotoprodutos) em função do tempo. Observa-se também que a fotodegradação do PDZ é mais rápida em 630nm seguida de 514 e 488nm. Comparando-se estes resultados com o Photogem[®] (fotossensibilizador aprovado para uso em PDT no Brasil), nota-se que o PDZ não apresenta agregação numa ampla faixa de concentração, absorve em comprimento de onda maior do que o Photogem[®] e fotodegrada em tempo menor. O estado de agregação do PDZ depende do pH e em soluções ácidas apresenta-se agregado. Estudos na presença de surfactantes mostraram que os processos de degradação e formação de fotoprodutos do PDZ apresentaram comportamento diferente do que em PBS. Experimentos com azida sugerem que a fotodegradação do PDZ ocorre pelo mecanismo tipo II, via formação de oxigênio singlete. O tempo de incubação do fotossensibilizador nas células e a presença de soro afetam a citotoxicidade do PDZ nas células normais e tumorais, na ausência ou presença de luz. Quando PDZ é irradiado ocorre uma diminuição da citotoxicidade nas células VERO e HEp-2 no escuro em função do tempo de irradiação. Entretanto, o aumento do IC₅₀ para as células HEp-2 é de aproximadamente 58% contra 25% para as células VERO. No estudo citotóxico no claro, o aumento do tempo de incubação e tempo de irradiação aumentam a citotoxicidade do PDZ não irradiado. No claro, a citotoxicidade do PDZ é enormemente potencializada pela luz tanto para as células VERO quanto para as células HEp-2. Com o aumento do tempo de exposição da solução de PDZ à luz a citotoxicidade do fotossensibilizador no claro aumenta discretamente para ambas linhagens. Verificou-se que os fotoprodutos formados após a irradiação do PDZ são menos citotóxicos no escuro (2,2 vezes) do que o PDZ não irradiado e cerca de 18 vezes mais citotóxicos na linhagem normal e 10 vezes mais citotóxico na linhagem tumoral no claro. O PDZ apresentou uma importante vantagem sobre o Photogem[®], ou seja, é menos citotóxico no escuro e mais citotóxico no claro para ambas linhagens. Esses resultados sugerem um enorme potencial de aplicação clínica desse fotossensibilizador derivado de clorina em Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) consists in a technique for cancer treatment. The treatment is based on intravenous administration of the photosensitizer (PS), which is selectively retained in tumor tissue, and when is activated with visible light it can be able to become cytotoxic, being responsible for tumor death. In this study the PS used was Photodithazine (PDZ), a derivative water-soluble of mono-L-aspartil chlorine produced in Russia. It was investigated the PDZ degradation by light (photobleaching) in several conditions and the cytotoxicity of non-irradiated and previously irradiated PDZ in the absence (dark) and presence of light in culture of normal (VERO) and tumor cells (HEp-2). These results were compared with results obtained for Photogem[®] (photosensitizer approved for use in PDT in Brazil, a hematoporphyrin derivative). PDZ photobleaching was induced with laser in two wavelengths (488 and 514nm) and with LED in 630nm. The degradation was monitored by the decreasing in the absorption and fluorescence intensities. It was observed the appearance of a new absorption band in 668nm (band of photoproducts) suggesting chemistry transformation. Analyses performed with the CCA method (Convex Constrain Analysis) demonstrated that two distinct species are present after the degradation of PDZ, one of them probably being the photoproducts. The photobleaching of PDZ is faster in 630nm than in 514 and 488nm. In the used concentration range of PDZ there is no predominance of aggregated species in physiologic pH, it absorbs in wavelengths higher than Photogem[®] and degrades in shorter time than Photogem[®]. However the aggregation of PDZ depends on pH. Only in low pH PDZ presented aggregated species. Studies with surfactants showed that the degradation and formation of photoproducts of PDZ is different than in PBS. Experiments with azide (the singlet oxygen scavenger) suggest that the photobleaching of PDZ occurs by the type II mechanism (singlet oxygen formation). In the cytotoxic studies of PDZ it was observed that the incubation time of the photosensitizer with cells and the presence of serum affect its cytotoxicity in non-tumor and tumor cells in absence and presence of light. When PDZ is previously irradiated occurs a decreasing in cytotoxicity in the dark in function of the irradiation time in both lines. However, the increase of IC₅₀ is approximately 58% for HEp-2 and 25% for VERO. In the presence of light, the cytotoxicity of non-irradiated PDZ increases as a function of incubation and irradiation time. The cytotoxicity of PDZ is greater when in the presence of light in VERO and HEp-2. The increase of irradiation time of the PDZ solution enhances the cytotoxicity of photosensitizer in both cell lines. It is possible to conclude that the photoproducts of PDZ after irradiation are more cytotoxic in the dark (2,2 times) than non-irradiated PDZ and are more cytotoxic (18 folds) in non-tumor cells and 10 folds more cytotoxicity in tumor cell line in the presence of light. PDZ presents an important advantage compared to Photogem[®], it is less cytotoxic in the absence of light and more citotóxicas in the presence of light than Photogem[®] for both cell lines. These results suggest a greater potential for clinical application for this chlorine photosensitizer.

I. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um termo genérico utilizado para descrever mais de uma centena de doenças individuais, que progridem de forma diferente mas têm em comum certas características, como o crescimento de células anormais em qualquer tecido do hospedeiro. Estas células proliferam-se localmente, invadem e atravessam barreiras tissulares normais, reproduzindo-se indefinidamente, podendo levar o hospedeiro à morte. Uma das principais características das células tumorais é a capacidade de formar metástases. Metástase é o nome dado ao processo que ocorre quando uma ou mais células tumorais deixam seu local de origem, atravessam as barreiras teciduais, vasos sanguíneos e linfáticos, atingem a corrente circulatória e se instalam em um outro local, onde continuam a se proliferar¹.

As causas do câncer são muitas, podendo ser externas ou internas ao organismo. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente social, como exemplo o cigarro, a exposição excessiva ao sol, entre outros. As causas internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas. O desenvolvimento das doenças neoplásicas consiste de três estágios cronologicamente distintos: iniciação, promoção (o período de latência sub-clínico) e progressão (quando o tumor torna-se clinicamente visível)².

Segundo sua localização e forma, os tumores malignos recebem nomes diferentes: carcinoma (tecido glandular), sarcoma (tecido conectivo), melanoma (tecido epitelial), linfoma (gânglios linfáticos), leucemia (glóbulos sanguíneos), que pode ser leucemia mieloide e leucemia linfóide. Os tumores malignos podem ser classificados também segundo sua localização anatômica. As leucemias recebem igualmente nomes diferentes, de acordo com o quadro sanguíneo e os sintomas que apresentam³.

O câncer é considerado a segunda causa de morte no Brasil e nos Estados Unidos, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares^{1,4,5}. Por isso, estudos relacionados ao câncer são de extrema importância, principalmente no que concerne a novas modalidades terapêuticas.

1.1.1 Câncer de laringe

Poucos sabem da importância de um pequeno tubo de cartilagem, com cerca de 5 cm de comprimento, que fica conectado à traquéia, exercendo várias funções. A laringe, também conhecida por caixa vocal, está localizada na região do pescoço, acima da traquéia⁶.

O câncer de laringe é um dos mais comuns a atingir a região da cabeça e pescoço, representando cerca de 25% dos tumores malignos que acometem esta área e 2% de todas as doenças malignas⁷. O Brasil é o segundo país no mundo em incidência de câncer de laringe - atinge 17 indivíduos numa população de 100 mil habitantes - e detém a quarta colocação de câncer mais frequente no sexo masculino no país. Há uma nítida associação entre a ingestão excessiva de álcool e o hábito de fumar com o desenvolvimento de câncer nas vias aerodigestivas superiores. Pacientes com câncer de laringe que continuam a fumar e a ingerir álcool tem probabilidade de cura diminuída e aumento do risco de aparecimento de um segundo tumor primário na região da cabeça e pescoço^{6,7}.

1.2 Terapias convencionais para o câncer

Os tratamentos convencionais para o câncer são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a hormonioterapia e a imunoterapia. Todos apresentam efeitos benéficos no combate ao câncer, entretanto apresentam efeitos colaterais e psicológicos como menor resistência a infecções, perda de apetite, náusea, vômito, emagrecimento e queda de cabelo com conseqüente perda da auto-estima⁷.

A cirurgia consiste na remoção do tumor. Apesar de ser a técnica mais utilizada no tratamento do câncer, ela pode causar severas mutilações nos pacientes, como por exemplo, no caso de tumores de mama e laringe. A retirada de uma ou ambas as mamas pode ser bastante traumática para a mulher, acarretando graves problemas psicológicos e perda da auto-estima. Após a laringectomia total, ou seja, a retirada total da laringe, o paciente passa a respirar, tossir e espirrar através de um traqueostoma permanente. Além disso, ele terá que reaprender a falar^{7,8}.

A radioterapia do câncer baseia-se na utilização de raios-X, nêutrons e outras fontes de alta energia para matar as células tumorais e diminuir o volume dos tumores. Pode ser utilizada uma fonte de radiação externa ao organismo ou proveniente de radioisótopos. Os radioisótopos são administrados aos pacientes e produzem radiação próxima ao local do tumor⁹. O iodo 131 radioativo é um radioisótopo utilizado em casos de câncer da glândula tireóide. Outros exemplos são o cobalto 60 e o rádio 226. Na radioterapia, o tecido neoplásico é cuidadosamente exposto à radiação ao mesmo tempo em que a exposição das células normais é minimizada. O objetivo da radioterapia é a destruição das células neoplásicas antes que a radiação promova um dano muito externo ao tecido normal. Os raios ionizantes bloqueiam a divisão celular ou determinam sua destruição na tentativa de realizar esta divisão. Por isso, sua ação é maior sobre células em processo de divisão. A radioterapia apresenta alguns efeitos colaterais, tais como náuseas e vômitos, pois as células da mucosa gástrica são particularmente sensíveis à radiação¹⁰.

A quimioterapia, como o próprio nome já diz, baseia-se na utilização de compostos químicos, tais como agentes alquilantes e antimetabólicos¹¹. Enquanto a cirurgia e a radioterapia limitam-se a eliminar as células malignas de uma área restrita, a quimioterapia tem a capacidade de alcançá-las onde quer que estejam, dentro do organismo⁶. Os agentes alquilantes são compostos orgânicos reativos que transferem grupos alquila às bases

nitrogenadas do DNA (principalmente a guanina). Um exemplo é a ciclofosfamida, uma das drogas quimioterapêuticas mais utilizadas no tratamento do câncer. Os antimetabólicos interferem na síntese do DNA por terem estrutura molecular semelhante aos compostos utilizados na síntese desta molécula. Um exemplo é o metotrexato, que se assemelha em estrutura ao ácido fólico, utilizado na síntese dos ácidos nucleicos. As drogas quimioterápicas apresentam uma série de efeitos colaterais indesejáveis. Em geral, estas drogas afetam o crescimento celular, especialmente das células que se multiplicam rapidamente, como as células tumorais¹¹. Entretanto existem células normais que também têm multiplicação rápida, como as células de defesa do sangue, que combatem infecções, as células que recobrem o aparelho digestivo e as células dos folículos pilosos, ou seja, as células tumorais não sofrem mitose mais rápida que todas as células normais³. Em consequência disso os pacientes apresentam sérias reações adversas, tais como menor resistência a infecções, perda de apetite, náusea, vômito, diminuição da salivação e queda de cabelo^{8,12}.

Todas estas modalidades de tratamento não são seletivas, ou seja, agredem tanto as células tumorais como as células normais. Além disso, são formas de tratamento caras, podem causar cicatrizes, ocasionar hipo ou hiper-pigmentação, podem ter outros efeitos como dor, alguma irritação e feridas que podem durar semanas¹³. Diante dos graves efeitos colaterais e da eficiência limitada das terapias tradicionais, outras alternativas estão sendo constantemente propostas na área da oncologia. Dentre estas destaca-se a terapia fotodinâmica¹⁴.

1.3 Terapia Fotodinâmica ou PDT

A terapia fotodinâmica ou PDT (do inglês, Photodynamic Therapy) é uma técnica de diagnóstico e tratamento de tumores que se baseia na administração intravenosa de um fotossensibilizador (FS), seguida da irradiação do local do tumor, com luz visível de comprimento de onda compatível com a banda de absorção do fotossensibilizador, na

presença de oxigênio. O fotossensibilizador é distribuído pelo organismo através da corrente sanguínea atingindo todos os tecidos. Entretanto, após cerca de 24 h o fármaco é rapidamente eliminado dos tecidos normais, ficando retido seletivamente em tumores por um tempo mais longo^{15,16}. São necessários três componentes para criar o efeito tumoricidal fotodinâmico desejado: fotossensibilizador, luz e oxigênio. Quando as células tumorais tratadas são irradiadas, o fotossensibilizador absorve luz, reage com o oxigênio e produz espécies radicalares que levam a célula tumoral à morte. A Figura 1 mostra um modelo esquemático da aplicação da PDT.

Figura 1: Esquema indicando a seqüência de aplicação da Terapia Fotodinâmica para o tratamento de um tumor¹⁷.

A fototerapia e a fotoquimioterapia, conhecidas desde a antiguidade, são formas de tratamento para diversas patologias. Tanto uma quanto a outra fundamentam-se na ação da luz sobre componentes químicos do tecido biológico ou retidos nestes. As raízes da fototerapia datam dos tempos pré-históricos. Hipócrates estudou a helioterapia (propriedades da luz solar sobre o corpo humano); gregos e romanos praticavam banhos de sol como um tratamento de doenças específicas. A fototerapia foi introduzida na Europa no século XIX pelo médico dinamarquês Niels Ryberg Finsen¹⁸. Finsen demonstrou que a luz ultravioleta emitida pelo sol foi altamente eficaz no tratamento de Lupus vulgaris¹⁹, uma doença endêmica de pele, encontrada com frequência no inverno entre pacientes tuberculosos escandinavos. A

fotoquimioterapia também é utilizada desde a antiguidade. Os egípcios tratavam vitiligo utilizando uma combinação de plantas e luz solar¹⁹. O conceito de terapia fotodinâmica começou em 1900 quando Oscar Raab descreveu a ação do corante acridina e da luz em *Paramecia*, mostrando que esta combinação poderia ser letal a estes organismos unicelulares^{20,21}. No início da década de 50, visando otimizar uma preparação para ser utilizada na localização de tumores, Schwartz tratou a hematoporfirina com ácido acético e sulfúrico e obteve uma mistura de porfirinas que ele chamou de “derivado de hematoporfirina” (HpD, do inglês, Hematoporphyrin Derivative)²², que foi utilizado por Lipson para detecção de tumores. Considera-se que a era moderna da PDT começou em 1960 com os estudos de Lipson e Schwartz; eles observaram que a injeção de preparações brutas de HpD tornava as lesões neoplásicas fluorescentes. Richard Lipson foi o primeiro a realmente tratar uma paciente com câncer de mama com metástase em 1966, assinalando o início da PDT como uma terapia para o tratamento do câncer^{18,23,24}. Atualmente a PDT vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada por muitos grupos em todo o mundo e a cada ano surge um grande número de drogas com potencial para serem utilizadas como fotossensibilizadores em PDT.

Desse modo, a PDT é uma modalidade de tratamento que se caracteriza por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que permite a completa restauração do tecido, é mais seletiva, não apresenta efeitos colaterais e pode ser repetida quantas vezes forem necessárias, sendo esta uma das maiores vantagens em relação aos incômodos das modalidades convencionais de tratamento^{25,26}. Pode também ser associada à quimioterapia, à radioterapia e à cirurgia, possibilitando uma regressão da massa tumoral bem como uma remoção mais seletiva do tumor. No entanto, quando porfirinas são usadas como fotossensibilizador, deve-se tomar precauções quanto à exposição ao sol, já que a pele se torna altamente sensível a luz, sendo este o único efeito colateral indesejado^{27,28}.

A otimização da PDT e fotodeteção de câncer no contexto clínico envolve a variação de diversos parâmetros, como dose da droga, dose de luz, tempo entre a injeção da droga e aplicação da luz, comprimento de onda de excitação do corante, bem como a pureza química, estabilidade dos fotossensibilizadores e sua atividade fotodinâmica²⁹.

Esta técnica tem-se mostrado promissora no tratamento de diversos tipos de tumores, tais como câncer de pele e do trato aerodigestivo, câncer superficial de bexiga e câncer de pulmão³⁰, entre outros.

Além do tratamento e diagnóstico do câncer, PDT pode ser utilizada em oftalmologia no tratamento da degeneração macular relacionada à idade, em dermatologia em casos de psoríase e queratose solar, artrite reumatóide sistêmica, micoses fungóides, infecções bacterianas, verrugas, entre outros^{14, 31-33}.

1.4 Processos fotoquímicos envolvidos na terapia fotodinâmica

Os fotossensibilizadores são moléculas heterocíclicas grandes que absorvem luz. Quando estas moléculas são irradiadas com luz visível, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singlete (elétrons de spins desemparelhados). Este elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência, ou na forma de calor, ou passar para o estado triplete (spins paralelos), de menor energia, através do cruzamento intersistemas (ISC). De acordo com as regras espectroscópicas de seleção este processo não é permitido, pois ele requer uma inversão de spins e a probabilidade que ele ocorra é menor do que a dos processos permitidos³⁴. Entretanto, uma das propriedades desejáveis para um bom fotossensibilizador é uma alta eficiência para sofrer cruzamento inter-sistemas. Como o tempo de vida do estado triplete é relativamente longo (10^{-3} a 10 s)¹⁵, o fotossensibilizador excitado pode interagir com moléculas vizinhas. A Figura 2 representa o Diagrama de Jablonski, com os níveis de energia

eletrônico/vibracional de um fotossensibilizador o qual é excitado a um determinado nível de energia após ser irradiado através de uma fonte de excitação.

Figura 2: Diagrama de Jablonski³⁵.

Existem dois mecanismos de ação dos fotossensibilizadores sobre as biomoléculas: mecanismo do Tipo I e mecanismo do Tipo II^{31,37-39}:

a) Mecanismo Tipo I ou via formação de radical: os fotossensibilizadores no estado tripleto (estado excitado) interagem diretamente com o substrato e/ou solvente, através de reações de transferência de elétrons ou transferência de hidrogênio, gerando íons radicais ou radicais, os quais reagem instantaneamente com oxigênio, produzindo uma mistura de intermediários de oxigênio altamente reativos, como radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas⁴⁰.

b) Mecanismo Tipo II ou via formação de oxigênio singlete (transferência de energia): o fotossensibilizador no estado triplete transfere energia ao oxigênio molecular no estado fundamental (tripleto) produzindo oxigênio singlete. O oxigênio singlete é uma forma reativa de oxigênio e é considerado o principal mediador do dano fotoquímico causado à célula por muitos fotossensibilizadores¹⁵. O oxigênio singlete possui tempo de vida em água de aproximadamente 4 μs e em sistemas biológicos esse tempo é extremamente baixo, inferior a 0,04 μs. Em função disso, seu raio de ação é extremamente reduzido (<0,02μm)²⁵, atuando apenas onde é produzido, fato muito importante para PDT que se baseia no efeito fotodinâmico localizado.

Existe uma competição entre os dois mecanismos e os produtos de cada reação são diferentes. Os dois processos podem ocorrer simultaneamente sendo que a proporção entre eles é altamente influenciada pelo sensibilizador, pelo substrato, pela concentração de oxigênio e pela ligação do sensibilizador com o substrato¹⁵. No entanto, o mecanismo de transferência de energia aparenta ser mais eficiente (constante de velocidade em torno de $2 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) quando comparado às constantes de velocidade das reações de transferência de carga, usualmente abaixo de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^{38,41,42}. Consequentemente, a energia transferida para outros compostos que possam competir com o oxigênio deve ser de menor importância e o mecanismo do Tipo II, é comumente dominante⁴³.

1.5 Fotossensibilizadores

Atualmente, a PDT vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada por muitos grupos de vários países e, a cada ano, surge um grande número de compostos com potencial para serem utilizados como fotossensibilizadores. Uma substância química para atuar como sensibilizador fototerápico deve ter propriedades específicas, tais como:

- ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico, para permitir circulação e acúmulo seletivo nas células;
- apresentar seletividade quanto a retenção por células malignas após algumas horas da introdução da droga na circulação sanguínea, isto é, ser eliminado pelo tecido normal com maior facilidade do que pelo cancerígeno;
- requerer um pequeno intervalo de tempo entre a administração do fotossensibilizador e a máxima acumulação no tecido tumoral (fotossensibilidade não prolongada);
- ter habilidade para transporte passivo ou ativo, dentro das células, e ter um alvo intracelular bem conhecido;
- possuir alto rendimento quântico nos estados triplete (energia $> 94 \text{ KJ mol}^{-1}$) ou singlete;
- apresentar elevada absorvidade molar na região espectral compreendida entre 600 a 1000 nm, conhecida como janela fototerapêutica;
- não ser tóxico e apresentar mínima morbidez para o indivíduo em níveis terapêuticos, como também ser metabolizado rapidamente, minimizando possíveis efeitos colaterais^{25,33}.

O mecanismo envolvido na distribuição preferencial dos fotossensibilizadores no tecido tumoral ainda não está completamente elucidado e acredita-se que diferenças existentes entre os tecidos tumoral e normal contribuam para esta distribuição seletiva. Dentre as

propriedades que diferenciam o tecido tumoral do tecido normal podem-se destacar: grande número de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), presença de macrófagos, baixos valores de pH do fluido intersticial e estrutura do estroma tumoral⁴⁴. A Figura 3 é uma representação esquemática do transporte e localização de fotossensibilizadores bem como dos principais alvos celulares.

Figura 3: Representação esquemática do sistema de transporte e localização dos fotossensibilizadores e os principais alvos fotodinâmicos dos tumores *in vivo*⁴⁴.

A captação do sensibilizador é controlada pela hidrofobicidade ou estado de agregação da droga. Sensibilizadores hidrofóbicos (tais como porfirinas ou ftalocianinas monossulfonadas) ou agregados de porfirina (tais como oligômeros de HpD) são transportados por lipoproteínas. Muitos tipos de células tumorais expressam um grande número de receptores de membrana para LDL devido à grande exigência de colesterol para a biossíntese de membrana⁴⁴. Fotossensibilizadores hidrofílicos são largamente transportados por albumina e globulinas e preferencialmente acumulados no estroma vascular de tumor⁴⁵.

O fluido intersticial é o fluido que circula entre a membrana das células e as paredes dos vasos que irrigam os tecidos. O pH de tecidos tumorais é frequentemente menor do que o de tecidos normais. Esta diferença está relacionada com os fatores nutritivos e metabólicos,

mas o funcionamento inadequado do sistema vascular é a principal causa para um ambiente ácido. No tecido tumoral a microvasculatura está bastante alterada e o fluxo sanguíneo reduzido; conseqüentemente, as células tumorais passam a utilizar a via anaeróbica e produzem grandes quantidades de ácido láctico. O pH de tecidos tumorais humanos é, em média, 6,77⁴⁶, enquanto que o pH de tecidos normais se situa entre 7,2 e 7,4. Com o aumento da acidez, a ionização de espécies de porfirina com valores de pKa levemente ácidos é afetada, elas se tornam mais hidrossolúveis podendo assim ser retidas de forma seletiva⁴⁷. Entretanto, em adição às propriedades dos tecidos, a natureza do fotossensibilizador é importante, principalmente porque a captura da droga e distribuição desta depende das propriedades físico-químicas da droga, especialmente da estrutura molecular, tamanho, carga e solubilidade⁴⁸.

A penetração da luz através dos tecidos é facilitada na região compreendida entre 600 a 1000 nm. A absorção e o espalhamento de luz são dependentes do comprimento de onda. Os tecidos normais contêm muitas substâncias que absorvem ou refletem radiação eletromagnética. As proteínas e o DNA absorvem na faixa do ultravioleta (200-350 nm), a melanina absorve em comprimentos de onda pequenos entre 200 e 300 nm e no visível entre 315 e 400 nm e a hemoglobina absorve na região do verde-amarelo do espectro visível (400-600nm). A água absorve na região do infravermelho (acima de 800 nm). Desta forma, resta apenas uma faixa do espectro eletromagnético (600-1000 nm) na qual os tecidos são relativamente transparentes. Esta faixa de comprimento de onda é conhecida como “janela terapêutica” e pode ser utilizada em terapia fotodinâmica^{14,18}. O decréscimo na intensidade da luz (fluência) no tecido exposto a um feixe de luz plano de diferentes comprimentos de onda em função da penetração está representado na Figura 4.

Figura 4: Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração de luz de diferentes comprimentos de onda⁴⁴.

Atualmente diversos compostos com características para aplicação em PDT estão sob investigação, dentre os quais podem ser citados porfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, naftalocianinas, purpurinas e outros¹⁴.

A primeira geração de agentes fototerapêuticos (comprimento de onda de irradiação entre 620-630nm), baseada em misturas de derivados porfirínicos, tem sido substituída por uma segunda geração de fotossensibilizadores que possuem elevada absorvidade molar na região espectral correspondente à cor vermelha, resultando assim em elevada resposta fototerapêutica, com a administração ao paciente, de doses apreciavelmente menores que as usuais. Nessa classe estão as ftalocianinas e as clorinas²⁵.

1.6 Porphirinas

As porfirinas tem sido muito utilizadas como fotossensibilizadores⁴⁹. São derivadas da porfina e contêm quatro anéis pirrólicos ligados entre si por átomos de carbono em um sistema altamente conjugado, diferindo entre si apenas quanto à posição dos seus substituintes no anel. Devido a este tipo de sistema altamente conjugado, suas transições eletrônicas encontram-se na faixa do visível e ultra-violeta próximo. A Figura 5 mostra a estrutura básica da porfina; os quatro anéis pirrólicos são numerados pelos algarismos romanos de I a IV e os

quatro carbonos das metinas (ou também posições meso) são identificados pelas letras α , β , γ e δ .

Figura 5: Estrutura básica das porfirinas⁵⁰.

O derivado de hematoporfirina, denominado comercialmente como Photofrin[®], produzido nos Estados Unidos e Canadá, é um fotossensibilizador de primeira geração eficaz para a maioria dos tumores que podem se tratados por PDT. O Photogem[®] é um fotossensibilizador de origem russa análogo ao Photofrin[®] em termos de estrutura, características físicas e químicas, propriedades terapêuticas e de diagnóstico. Ambos consistem em uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirina unidos por ligações éter ou éster⁵¹, sendo que não é possível isolar um único constituinte dessa mistura complexa⁴². Entretanto, nenhum deles se constitui no fotossensibilizador ideal, pois induzem uma prolongada fotossensibilização cutânea - a pele dos pacientes se torna fotosensível e eles devem se proteger da exposição à luz solar ou luz brilhante por um período de 4 a 8 semanas, que é o tempo de retenção destas drogas na pele^{26,30} - e apresentam uma absorção relativamente fraca em 630nm ($\epsilon = 1500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁵², sua banda de absorção no vermelho, e por essa razão, o comprimento de onda onde o tecido é irradiado. Sendo que a penetração de luz nos tecidos cresce com o comprimento de onda de irradiação, é desejável se obter fotossensibilizadores com bandas em comprimentos de onda

maiores. Outra desvantagem do Photofrin[®] é o fato dele ser uma mistura complexa da qual não é possível isolar um único constituinte⁴². Além disso, formar agregados em diferentes extensões e diferentes ambientes, o que resulta em alterações na eficácia terapêutica da droga¹⁶. A estrutura química do Photofrin[®] está apresentada na Figura 6.

Figura 6: Estrutura química do Photofrin[®], evidenciando a formação de uma ligação tipo éter entre duas unidades de porfirina.

Devido a estas características indesejáveis estão sendo estudados novos compostos com potencial para atuarem como fotossensibilizadores que sejam tão eficientes quanto o Photofrin[®] e o Photogem[®] e que tenham composição definida, não apresentem o efeito colateral de fotossensibilização cutânea e que absorvam luz em comprimentos de onda maiores onde a pele é mais transparente à luz. Estas substâncias são conhecidas como fotossensibilizadores de segunda geração⁵³. Dentre estes compostos estão clorinas (640-700nm)⁵⁴, bacterioclorinas (640-760nm), ftalocianinas (675-700nm), derivados de benzoporfirinas (620-760nm), purpurinas (630-715nm) e outros^{18,30,33,55}. A Figura 7 apresenta as estruturas químicas de algumas destas substâncias citadas como fotossensibilizadores.

Figura 7: Estrutura química de alguns fotossensibilizadores⁶¹.

Um exemplo de fotossensibilizador de segunda geração é o Foscan[®] (meta-tetra(hydorsyphenyl)chlorine; mTHPC) que apresenta favoráveis propriedades fotoquímicas e imunológicas. Trata-se de um fármaco sintético análogo a meso-tetrafenilporfirina, que contém temoporfina, um agente de fotossensibilização desenvolvido para o tratamento de carcinoma das células escamosas na cabeça e no pescoço. Estudos demonstraram que a atividade fotodinâmica para PDT é mais acentuada com o mTHPC do que com o Photofrin[®]. O mTHPC possui maior tempo de vida do estado triplete, maior absorvidade molar, maior hidrofobicidade, maior seletividade e pode ser excitado em um comprimento de onda maior

(652nm). Contudo a fotossensibilidade é ligeiramente menor do que a provocada pelo Photofrin[®]. Estudos demonstraram redução de no mínimo 50% da massa tumoral após o tratamento com Foscan[®]. O estudo envolveu pacientes com carcinoma de células escamosas do lábio, da cavidade oral ou da língua, sem metástases, previamente tratados com radioterapia ou submetidos à cirurgia⁵⁶⁻⁵⁹.

Uma outra abordagem de PDT é a indução da produção endógena do fotossensibilizador pela administração via oral ou mesmo uso tópico do ácido δ -aminolevulínico (ALA). Este ácido é o precursor metabólico da protoporfirina IX (PpIX) na rota biossintética para o heme que ocorre em parte nas mitocôndrias e em parte no citossol. Por razões ainda não conhecidas, os tecidos tumorais são capazes de metabolizar o ALA com uma velocidade muito maior do que os tecidos normais e, algumas horas após a administração da droga, os tecidos tumorais acumulam níveis muito maiores de Pp IX do que o tecido normal^{37,60}. A Pp IX, ao contrário do ALA, é fotodinamicamente ativa e quando excitada pela luz produz $^1\text{O}_2$ causando morte celular^{25,33}.

1.7 Clorinas

As clorinas são porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região de 640-700nm (vermelho). A hidrogenação de uma ou mais duplas ligações pirrólicas produz uma dramática mudança no espectro do anel pirrólico: um considerável deslocamento para o vermelho e um considerável aumento da intensidade no comprimento de onda de maior absorção. A clorina e_6 é uma forma derivada da clorofila-a e apresenta importantes propriedades que a viabiliza como fotossensibilizador em potencial: um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete^{49,62} e uma intensa absorção em comprimentos de onda maiores, onde os tecidos biológicos são mais transparentes à luz (610-630nm)^{51,62}.

O fármaco Visudyne é uma clorina e se constitui de uma mistura racêmica de quatro regioisômeros de uma benzoporfirina derivada do monoácido BPDMA. Sua síntese é feita a partir da reação de Diels-Alder entre a porfirina natural Pp IX com dimetilacetileno-dicarboxilato, rendendo uma mistura equimolar de dois regioisômeros benzoporfirínicos. Os produtos (clorina) apresentam banda Q em 666nm. Quanto aos efeitos colaterais o BPDMA apresenta fotoestabilidade na pele menor do que o Photofrin® e tem tempo de meia vida de 6 h em seres humanos (sendo excretado principalmente pelas fezes). O Visudyne foi desenvolvido para o tratamento de doenças como degeneração macular relacionada com a idade dos pacientes⁶³.

O Photodithazine (PDZ) é um fotossensibilizador de segunda geração preparado na Rússia e será empregado nesse estudo. Trata-se de uma clorina e₆ cuja estrutura química é modificada através da adição de N-metil-D-glicosamina 0,5% como um agente solubilizante e estabilizante⁶⁴, tornando-a hidrossolúvel. Essa clorina é obtida a partir de uma cianobactéria *Spirulina platensis* cuja estrutura foi modificada e é encontrada em grande quantidade o que faz com que tenha um baixo custo. A estrutura química do Photodithazine está apresentada na Figura 8.

Figura 8: Estrutura química do Photodithazine⁶⁴.

As propriedades fototóxicas do PDZ têm sido estudadas na Rússia e a alta eficácia fotodinâmica parece estar relacionada com sua capacidade de penetrar nas células através das membranas biológicas. Estudos *in vitro* mostraram que este composto não apresenta toxicidade no escuro, exceto em concentrações muito elevadas⁶². Além da vantagem em relação aos fotossensibilizadores de primeira geração de absorver em comprimentos de onda maiores, o PDZ é eliminado rapidamente do organismo, sendo que 94% da eliminação ocorre em 24h e 98% em 48h⁶⁵. O PDZ é também mais estável ao armazenamento e apresenta uma absorção relativamente alta em 663nm ($\epsilon = 3,82 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁶². Os espectros óticos do PDZ e do Photogem[®] estão apresentados na Figura 9 para comparação.

Figura 9: Espectro de absorção (A) do PDZ 20 µg.mL⁻¹ e (B) do Photogem[®] 25µM/mL em tampão fosfato pH 7,4.

Na Rússia, a aplicação de PDZ em PDT se encontra na fase de testes clínicos. Num estudo, 44 pacientes com tumores malignos de pele, cavidade oral, laringe, brônquios, esôfago, estômago, vulva, dentre outros, foram tratados por PDT com PDZ. Em todos os casos observou-se um efeito terapêutico, sendo que a regressão do tumor foi completa em 53,7% e parcial em 46,3% dos casos. Pacientes submetidos à PDT com PDZ não

apresentaram complicações locais ou sistêmicas. O tratamento foi bem tolerado e não houve reações de fotossensibilização cutânea⁶⁴.

A utilização do PDZ como fotossensibilizador em PDT é bastante promissora. Entretanto, são necessários outros estudos para estimar as quantidades adequadas do fármaco e de luz para vários tipos de tumores, tanto *in vitro* como *in vivo*⁶⁴.

1.8 Sistemas ópticos para a fotossensibilização

Como fonte de luz para a terapia fotodinâmica podem ser utilizadas lâmpadas de tungstênio ou halogênio mas geralmente são usados lasers para o tratamento clínico, pois eles podem ser empregados em conjunto com fibras óticas, o que facilita o tratamento de tumores internos. Nestes casos, é necessário levar a luz até o local do tumor, o que é feito através de sondas³⁴. O laser é essencialmente um amplificador ótico, composto por um meio ativo (sólido, líquido ou gás), que amplifica a luz que o atravessa, e uma cavidade óptica que consiste de espelhos especiais que confinam esta amplificação de luz. Esses meios ativos apresentam emissão de luz quando excitados por uma fonte externa (elétrica ou óptica). O resultado é a saída de um feixe de radiação eletromagnética intensa, coerente e monocromática⁶⁶. Como a irradiação com laser produz um único comprimento de onda, a potência de saída pode ser medida corretamente, a luz pode ser administrada seletivamente a partes do tumor e também devido sua alta intensidade, podem ser utilizadas altas doses de luz reduzindo o tempo de aplicação no paciente³³. Em culturas de células, a utilização de lasers com altas potências não promove o aquecimento local das células, o que representa uma vantagem adicional. As principais desvantagens do laser são o alto custo e as dificuldades operacionais^{37,67}.

Com o emprego de agentes fototerapêuticos de segunda geração, em virtude de sua elevada absorvidade molar, o uso de diodos emissores de luz (LED – Light emitting diode)

tem também se tornado viável, possibilitando uma redução no custo dos procedimentos e maior facilidade de operação²⁵. Ao contrário das lâmpadas halógenas, os LEDs não produzem luz visível através do aquecimento de filamentos metálicos, os LEDs são a combinação de dois semicondutores diferentes. Alguns destes semicondutores possuem excesso de elétrons e outros falta de elétrons. Os elétrons conectam-se sempre que é aplicada tensão sobre a combinação dos dois tipos de semicondutores. O resultado é a emissão de luz com comprimento de onda específico. A cor da luz de um LED é determinada pela composição química da combinação dos semicondutores⁶⁸. O tipo de laser mais utilizado em terapia fotodinâmica é o laser de corante bombeado com laser de argônio. Entretanto, estes lasers são caros, grandes e requerem a presença de um técnico para aplicação e manutenção^{37,67}. Um dos avanços mais recentes é a utilização de LEDs, pois são sistemas mais compactos, o que facilita sua utilização em consultórios médicos. Além disso seu custo representa aproximadamente um quarto do custo de um laser de corante.

1.9 Fotodegradação de Fotossensibilizadores

A maior parte dos fotossensibilizadores utilizados em PDT sofre degradação pela luz^{61,69-75}. O interesse na fotodegradação de corantes e pigmentos evoluiu com os avanços tecnológicos e científicos. Com a utilização do laser em fotomedicina, ficou evidente a importância da fotodegradação de medicamentos terapêuticos cujo meio de ação ocorre através da incidência de luz⁶¹.

Na literatura existem vários termos que são empregados referentes à degradação de corantes e pigmentos sob irradiação, sendo os mais frequentemente usados “photofading” e “photobleaching”^{61,69,70}. Em fotoquímica e fotobiologia o termo fotocclareamento (ou clareamento) é amplamente usado e é definido como a diminuição da absorção e intensidade de fluorescência do fotossensibilizador podendo ocorrer *in vitro*, *in vivo*, nos fluidos celulares

do corpo, células e tecidos^{61,71-74}. No entanto, a diminuição da absorbância e intensidade de fluorescência não ocorrem necessariamente em paralelo⁶⁹. Fotodegradação das porfirinas e análogos mais comumente utilizados em PDT pode ocorrer por processo de foto-oxidação ou foto-redução, sendo o de foto-oxidação o mais comum^{61,69,70}.

Os fotossensibilizadores comportam-se diferentemente um do outro em relação à fotodegradação, apresentando-se estáveis ou instáveis (pela maior ou menor resistência à fotodegradação, respectivamente) frente à iluminação⁷¹. Em relação à fotodegradação, os fotossensibilizadores utilizados em PDT podem apresentar vantagens e desvantagens, visto que a destruição do tumor pode não ser completa caso o fotossensibilizador sofra rápida fotodegradação durante a iluminação, diminuindo a eficiência da PDT^{61,71}. Taxa alta de fotodegradação pode ser corrigida pela diminuição da irradiação de luz, seguida de múltiplas sessões de irradiação, levando as células tumorais à necrose⁷⁶.

Estudos mostram que o processo de fotodegradação das porfirinas é significativamente dependente do pH da solução e torna-se dominante quando a formação de fotoproduto atinge a saturação⁷⁴. Rotomskis et al. estudaram o efeito da fotodegradação em função do pH do meio e observaram que a formação de fotoprodutos atinge uma saturação em pH 10, já a fotodegradação não foi inibida e continua ocorrendo mesmo com pH acima de 10⁷¹.

Várias pesquisas têm demonstrado que a fotodegradação tende a ser menor em fotossensibilizadores que estão agregados. Streckeyte et al. estudaram os estados de agregação do Photosan[®] e sugeriram que o composto existe na forma de oligômeros lineares ligados covalentemente e não covalentemente (por meio de ligações de Van der Waals) e também na forma de agregados tipo “sanduiche” (tipo H). Este estudo demonstrou que porfirinas que apresentam agregado do tipo H, como o Photosan[®] e hematoporfirina, apresentam pequeno fotobranqueamento. Quando o fotossensibilizador encontra-se agregado, diminui-se o tempo de vida da fluorescência e fosforescência, devido ao aumento dos decaimentos não radioativos

por conversão interna o que torna mais difícil a transferência de energia do fotossensibilizador do estado triplete excitado para o estado singlete, diminuindo a eficiência do fotossensibilizador^{61,77}.

Juntamente com a fotodegradação ocorre a formação dos fotoprodutos, evidenciada pelo aparecimento de uma nova banda de absorção entre 640-660 nm^{61,71-74}. Um aumento na absorção na região de 240-320 nm tem sido relacionado com a abertura do macrociclo da porfirina. A Figura 10 mostra o esquema de possíveis fotoprodutos formados após fotodegradação de fotossensibilizadores em solução aquosa. Três tipos de fotoprodutos, caracterizados somente pelos espectros de absorção e fluorescência são isolados: produtos que absorvem no UV (240-320 nm) como mono ou di-pirróis, moléculas tipo bilirrubina ($\lambda \sim 545$ nm) e dois fotoprodutos que absorvem no vermelho, como tipos de clorinas e bacterioclorinas, com máximos em 640 e 660 nm, respectivamente⁶¹. Os fotoprodutos tipo bilirrubina podem aparecer como intermediários no estágio inicial do processo de fotodegradação⁷³.

Deve-se salientar que os fotossensibilizadores derivados de hematoporfirinas geralmente são iluminados com laser no vermelho em 630 nm (na faixa do espectro eletromagnético em que os tecidos são relativamente transparentes à luz)⁵⁵. Já os fotoprodutos decorrentes desta fotodegradação apresentam banda de absorção em torno de 640 nm, sendo detectados pelo espectro de absorção e pelo espectro de emissão de fluorescência^{61,69-74}. Os fotoprodutos tipo bilirrubina não participam no processo de sensibilização na iluminação por luz vermelha mas algumas destas frações podem ser fototóxicas. Estes fotoprodutos precisam ser mais investigados. A absorção UV dos fotoprodutos não tem influência na PDT, porque eles não absorvem luz vermelha usada no tratamento fotodinâmico⁷³.

De acordo com a formação dos fotoprodutos em decorrência da fotodegradação, o fotossensibilizador estável pode vir a sofrer reduzida fotodegradação ou então nenhuma, bem como um fotossensibilizador de baixa fotoestabilidade pode sofrer uma fotodegradação total,

não gerando, em ambos os casos, fotoprodutos⁷¹. A relevância deste efeito reside no fato que para o desenvolvimento de padrão de dosagem de luz (dosimetria em Terapia Fotodinâmica) durante a iluminação, faz-se necessário o bom entendimento do efeito causado por esta degradação³³.

Figura 10 – Esquema das possíveis fototransformações de fotossensibilizadores em solução aquosa⁶¹.

Em PDT, os sensibilizadores estão tipicamente presentes em altas concentrações nas células tumorais e ao redor das células normais^{18,55,78}. Desta forma, a fotodegradação dos fotossensibilizadores em taxas apropriadas durante a iluminação em PDT, pode vir a diminuir a concentração destes fotossensibilizadores nos tecidos normais, levando a uma diminuição da fototoxicidade, enquanto quantidade suficiente de fotossensibilizador pode persistir nas

células tumorais para posterior fotodestruição, resultando em menor dano para o tecido normal⁷⁹. Deste modo verifica-se que a fotodegradação do fotossensibilizador é um elo fundamental da distribuição da dose fotodinâmica nos fluidos biológicos, estando relacionada com a cinética de eliminação do fotossensibilizador do organismo⁷¹.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo investigar alterações espectrais, fotodinâmicas e na citotoxicidade do PDZ originadas pela fotodegradação induzida por irradiação em diferentes comprimentos de onda de PDZ em solução.

A fotodegradação do PDZ foi induzida pela irradiação em diferentes comprimentos de onda (com laser em 514 e 488 nm e com LED em 630 nm), tempos de irradiação, concentração do fotossensibilizador, pH da solução do fotossensibilizador e intensidade de irradiação acompanhando-se as alterações nos espectros de absorção ótica e emissão de fluorescência.

Foi investigado o efeito citotóxico do PDZ e dos fotoprodutos obtidos após irradiação em diferentes condições, na ausência e presença de luz (no claro) utilizando-se linhagens de células normais e tumorais.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fotossensibilizador

O Photodithazine foi fornecido pelo Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences de Moscou. O PDZ foi obtido na concentração de 0,55%, a partir da qual preparou-se uma solução estoque 5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato pH=7,4 (PBS) que foi mantida a 4°C. A solução estoque foi diluída em meio de cultura sem soro e sem o indicador vermelho de fenol e a solução diluída foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm antes de ser adicionada às células.

3.2 Cultura de células

Uma linhagem de células epiteliais normais de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops* (VERO) e uma linhagem de células epiteliais tumorais de laringe humana (HEp-2) foram utilizadas. Devido à sua morfologia ambas as linhagens crescem aderidas ao substrato sólido (garrafa de polipropileno)⁸¹. As células HEp-2 foram cultivadas em meio Eagle e as células VERO em meio DMEM, ambos com 10% de soro fetal bovino (SFB), ampicilina, estreptomicina e 1,1 µM de piruvato de sódio. As células foram incubadas em estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. O repique (subcultivo) das células é feito submetendo a monocamada celular a lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Após lavagem, adiciona-se solução de Versene (EDTA 0,02%), como desagregante, para a linhagem tumoral e solução de tripsina (1% em PBS) para linhagem normal. Decorridos 4 minutos, adiciona-se PBS para facilitar a dissociação das membranas celulares do substrato e centrifuga-se a suspensão para retirar o sobrenadante (1000rpm por 40s). A seguir, ressuspende-se as células em meio. As células são contadas em hemocítômetro e distribui-se as células nos frascos de cultura conforme o número de subculturas desejadas. Um

estoque de células é mantido em nitrogênio líquido e sempre que necessário podem ser descongeladas e cultivadas⁸². Todos os procedimentos com células são realizados sob fluxo laminar para garantir um ambiente estéril.

3.3 Teste de viabilidade

Este teste é usado para quantificar a proporção de células vivas e baseia no rompimento da integridade da membrana causado pela captação de um corante para o qual a membrana da célula normalmente é impermeável (no caso o “trypan blue” 0,4%). Dessa forma, as células coradas são as mortas e as não coradas, as células vivas. Procedimento: o meio de cultura das células é removido e acrescenta-se Versene (EDTA 0,02%) para a linhagem HEp-2 ou tripsina (1% em PBS) para a linhagem VERO para desprender as células da garrafa; retira-se uma alíquota de células e adiciona-se o corante “trypan blue”. Procede-se então a contagem em hemocitômetro das células coradas e não coradas. Para os cálculos, usa-se a seguinte relação:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{\text{número de células não coradas}}{\text{número total de células}} \times 100$$

3.4 Estocagem das células

A criopreservação é a estocagem de células a temperatura muito baixas de modo a inibir qualquer atividade enzimática. Utilizam-se substâncias conhecidas como crioprotetores para prevenir danos às células durante o processo de congelamento, devido principalmente ao crescimento de cristais de gelo e às trocas osmóticas⁸². Como crioprotetor foi utilizado dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. O congelamento é importante para a preservação das células instáveis em cultura, para a manutenção de um estoque de células que serão utilizadas por longos períodos e também em casos de uma eventual contaminação.

- ***Congelamento das células:*** A suspensão obtida do subcultivo (descrito no item 3.2) é diluída para $2-6 \times 10^6$ células.mL⁻¹ em meio contendo 10% de SFB e 10% de DMSO e aliquotada em pequenos volumes. As células são então armazenadas em nitrogênio líquido até o momento de sua utilização.
- ***Descongelamento das células:*** O conteúdo do tubo criogênico é cuidadosamente homogeneizado e transferido para um frasco de cultura contendo meio com 10% de SFB. As células são incubadas a 37°C e 5% CO₂ e após cerca de 24 horas o meio é trocado para remover o DMSO.

3.5 Investigação da agregação do Photodithazine

Para verificar até qual concentração de Photodithazine esta droga obedece a Lei de Lambert-Beer, ou seja, conserva a linearidade da absorbância em função da concentração, preparou-se uma solução estoque de Photodithazine 5 mM em água Ultra Pura Mili-Q. A partir da solução estoque, preparou-se diluições (0 – 100µM) em tampão fosfato 20 mM. Mediu-se a absorbância de cada concentração de Photodithazine na região de 240 a 800 nm e a fluorescência (com excitação em 505 nm) na região de 515 a 750 nm. Analisando os valores experimentais, obteve-se gráficos de absorbância ou fluorescência em função da concentração da droga para verificar a que concentração a droga começa a perder a linearidade o que implica em possível agregação. Para estes experimentos utilizou-se uma cubeta de quartzo com duas faces polidas e caminho ótico de 1,0 cm. As medidas de fluorescência foram feitas em espectrofluorímetro Hitachi (F-4500) e as de absorbância no espectrofotômetro Shimadzu modelo PC-1601.

3.6 Indução da fotodegradação do Photodithazine com laser e obtenção dos fotoprodutos

Photodithazine foi irradiado por tempos variando de 10 a 120 min com o laser de íon argônio- modelo Coherent Innova 100 nos comprimentos de onda 488nm (azul) e 514nm (verde) e com laser de corante bombeado com argônio em 630nm (vermelho) pertencentes ao Grupo de Ótica do Instituto de Física de São Carlos – USP ou com um LED em 630 nm. A indução a fotodegradação do Photodithazine pela irradiação em diferentes comprimentos de onda foi realizada em diferentes tempos de irradiação, concentração do fotossensibilizador, pH da solução do fotossensibilizador e intensidade de irradiação. A fotodegradação do fotossensibilizador, bem como a formação de fotoprodutos foram analisados através dos espectros de absorção óptica e de emissão de fluorescência.

Deve-se salientar que a necessidade de irradiação deste fotossensibilizador com laser ou com LED consiste no fato de que os fotoprodutos gerados podem ser diferentes quando irradiados em diferentes comprimentos de onda, apresentando portanto atividade fotodinâmica e citotoxicidade diferenciada.

Figura 11 – Esquema de irradiação dos fotossensibilizadores: (A) 488nm, (B) 514nm e (C) 630nm.

3.7 Análise dos espectros através do algoritmo “Convex Constraint Analysis (CCA)”

Este método de análise de espectros foi desenvolvido por Perczel, Park e Fasman⁸³ para determinar as porcentagens das estruturas secundárias e os respectivos espectros a partir

de um conjunto de espectros de dicroísmo circular de proteínas. O CCA é um método geral de deconvolução espectral para um conjunto completo de funções (espectros) que são obtidas pela combinação linear de outras funções (espectros puros correspondentes às espécies em equilíbrio na solução). É um método baseado no processo de minimização “simplex” que calcula um número variável p de funções f_i (espectros puros) e dos coeficientes $C(i,j)$ que permitem recuperar as funções experimentais f_j (espectros experimentais).

$$f_j = \sum_{i=1}^p C(i, j) \times f_i$$

onde p é o número de funções que serão combinadas e $C(i,j)$ são os coeficientes nas combinações aplicadas nas funções f_i . O processo baseia-se no estabelecimento de três restrições:

- (1) a soma dos coeficientes é unitária para cada valor de j :

$$\sum_{i=1}^p C(i, j) = 1$$

onde: $j = 1, 2, \dots, N$ representa o número de funções experimentais analisadas.

- (2) os coeficientes são positivos: $C(i,j) \geq 0$

- (3) os pontos de $C(i,j)$ precisam obedecer a um “simplex” do espaço Euclidiano de dimensão p com o menor volume possível.

A adaptação deste método de análise para um conjunto de espectros requer a definição do número de funções bases (f_i) que serão combinadas. Neste trabalho o método foi aplicado na análise dos espectros óticos de absorção e espectros de emissão de fluorescência do Photodithazine cuja fotodegradação foi induzida por irradiação com laser onde várias espécies

espectralmente ativas estavam presentes em equilíbrio em proporções variáveis. Foi assumido que cada espécie contribui com um espectro característico.

3.8 Ensaios citotóxicos

1×10^5 células. ml^{-1} em meio DMEM ou EAGLE com 10% de SFB foram plaqueadas em placas com 96 poços. Após 24h, as células foram incubadas por 1, 2 ou 4 h⁷⁹ com PDZ não irradiado ou previamente irradiado (por tempos determinados e em diferentes comprimentos de onda (488nm, 514nm ou 630nm) e posteriormente diluído em meio de cultura sem soro ou com 3% de soro. Após o tempo de incubação com o PDZ, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado meio com 10% de soro. Para o estudo da citotoxicidade no claro, as células foram a seguir irradiadas em 630nm o que não foi feito no estudo de citotoxicidade no escuro. Em seguida as células foram incubadas por 48 h a 37° C em estufa com 5% de CO₂. Depois deste tempo, as células foram lavadas com PBS e o número de células contado pelo método do MTT, um teste de viabilidade que não envolve o uso de hemocítômetro. É um método colorimétrico rápido que envolve a redução de MTT 3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio, que é amarelo, a um produto azul de formazam que absorve em 570 nm. A redução é feita pelas dehidrogenases mitocondriais das células vivas e ocorre se as células tem um nível significativo de metabolismo oxidativo⁷⁸. Após MTT ser adicionado, as células foram incubadas por 3 h em estufa. Ao final deste tempo de incubação o MTT foi retirado e 50 μ l de etanol puro foi adicionado para dissolver os cristais formados. Após diluição completa, 150 μ l de PBS com isopropanol na proporção 1:1 foi adicionado. A placa foi então lida no leitor de células BIO-RAD (em 550 nm) e os resultados foram apresentados por meio de gráficos da sobrevivência celular (%) em função da concentração da droga. Para obter o valor de IC₅₀, ou seja, a concentração da droga capaz de matar 50% da população de células, utilizou-se o programa CalcuSyn⁸⁴.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Espectros de absorção e de emissão de fluorescência do Photodithazine

O espectro de absorção ótica de uma solução de Photodithazine $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS, pH 7,4 está apresentado na Figura 12.

Figura 12: Espectro de absorção ótica do PDZ em PBS na concentração $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em pH 7,4.

Os espectros de absorção das porfirinas não metaladas diferenciam-se das metaladas por apresentarem 4 bandas Q ao invés de 2 bandas. As porfirinas não metaladas apresentam distorções na sua estrutura principal, ou seja, no conjunto dos anéis pirrólicos, ocasionando uma diferença de 25 a 29 KJ.mol^{-1} entre os níveis de energia, e conseqüentemente, o aumento do número de bandas Q. As clorinas são porfirinas reduzidas e apresentam mudanças espectrais em relação as porfirinas, como deslocamento das bandas para o vermelho e aumento da intensidade de absorção⁸⁵.

O Photodithazine apresenta bandas características de clorina, ou seja, banda de Soret com máximo de absorção em 401nm e três bandas Q, com máximos em 505, 600 e 655nm. Observa-se que o Photodithazine apresenta máximo de absorção em comprimento de onda

maior (655nm) do que o Photogem[®] (620nm). Isto é uma vantagem do Photodithazine em relação ao Photogem[®] para aplicação em PDT, uma vez que a luz penetra mais profundamente na pele em comprimentos de onda maiores. Além disto, o Photodithazine apresenta na última banda Q um coeficiente de extinção molar 25 vezes maior do que o Photogem[®] ($\epsilon_{PDZ} = 3,82.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{Photogem} = 1,5.10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)^{52,62}, absorvendo deste modo mais energia.

O espectro de emissão de fluorescência do Photodithazine excitado tanto em 401 quanto em 465 e 505 nm apresenta apenas uma banda de emissão com máximo em 656nm como mostrado na Figura 13.

Figura 13: Espectros de emissão de fluorescência do PDZ em PBS na concentração $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em pH 7,4 com excitação em (A) 401, (B) 465 e (C) 505nm.

4.2 Agregação do Photodithazine

A agregação reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete. Isto porque os agregados provocam a diminuição do tempo de vida dos estados singlete e triplete do fotossensibilizador, resultando na diminuição do rendimento quântico do oxigênio singlete, o que diminui a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador. Desse modo, é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solubilizado e na forma monomérica^{14,86,87}.

Para investigar a ocorrência de agregação, obteve-se os espectros de absorção (na região de 240 a 800nm) e de emissão de fluorescência (na região de 550 a 750nm com excitação em 505nm) de soluções de Photodithazine em várias concentrações (0 – 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em PBS, pH 7,4. Deve-se ressaltar que a técnica espectroscópica de fluorescência é mais sensível do que a de absorção ótica. Os espectros resultantes de cada diluição apresentam o mesmo comportamento já mencionado, diferenciando-se apenas na intensidade de absorção ou fluorescência (espectros não mostrados).

A partir dos valores de absorbância em 401, 505 e 655nm e de fluorescência em 656nm para o Photodithazine obteve-se os gráficos de absorbância ou fluorescência em função da concentração do fotossensibilizador. A Figura 14 apresenta dois destes gráficos, sendo que os demais apresentaram o mesmo comportamento.

Figura 14: (A) Absorbância em 505nm e (B) fluorescência em 656nm do Photodithazine em PBS, pH 7,4 em função da concentração do fotossensibilizador.

Através dos gráficos pode-se verificar que o Photodithazine tem comportamento linear na faixa da concentração utilizada neste estudo, obedecendo a Lei de Lambert-Beer, o que sugere que até a concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não ocorre a formação de agregados. Os ajustes foram feitos por regressão linear dos valores de absorbância ou fluorescência em função da concentração obtendo-se elevados valores de coeficientes de correlação linear ($R > 0,994$).

4.3 Estudo da estabilidade do Photodithazine

4.3.1 Estabilidade em função do solvente

Realizou-se um estudo preliminar de estabilidade do Photodithazine em diferentes solventes: água, PBS e tampão fosfato 20 mM a fim de verificar se a presença do sal, no PBS, interfere nas propriedades espectrais do PDZ. A Figura 15 apresenta os espectros de absorção ótica e de emissão de fluorescência do Photodithazine obtidos nas diferentes soluções.

Figura 15: Espectro de (A) absorção ótica e de (B) emissão de fluorescência do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em água, PBS e tampão fosfato.

Observou-se que não ocorre diferença significativa nos espectros de absorção ótica e emissão de fluorescência do Photodithazine nas soluções estudadas pois os espectros

coincidem. Assim, os resultados sugerem que a presença de sal não afeta as propriedades espectrais do PDZ e, portanto, PBS foi utilizado nos experimentos subsequentes.

4.3.2 Estabilidade em função do tempo de armazenamento

Para verificar se ocorrem alterações espectroscópicas com o tempo de armazenamento do Photodithazine foram realizados experimentos de absorção ótica de uma solução de PDZ $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS armazenada no escuro por um período de 16 meses. A Figura 16 apresenta o espectro de absorção do PDZ neste período e o gráfico de absorbância em 655nm em função do tempo de armazenamento (o gráfico de absorbância em 401nm apresenta o mesmo comportamento).

Figura 16: (A) Espectro de absorção ótica do PDZ $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS no período de 16 meses de armazenamento e (B) absorbância em 655nm em função do tempo de armazenamento.

Pode-se observar que a solução de Photodithazine $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ é estável mesmo após um período de estocagem de 480 dias. A variação da absorbância em 401, 505 ou 655nm obtidos foram menores de 1, 8 e 3%, respectivamente, sendo que esta porcentagem não deve ser considerada como variação já que este valor está dentro do erro experimental. Estes

resultados estão condizentes com a literatura onde é descrito que uma solução aquosa de Photodithazine é estável se estocada no escuro por um período maior do que 2 anos⁶⁵.

4.4 Fotodegradação induzida do Photodithazine

A fim de se estudar as alterações espectrais quando o Photodithazine é irradiado em diferentes soluções (PBS e em duas concentrações diferentes de tampão fosfato), acompanhou as alterações espectroscópicas na absorção e fluorescência irradiando-se nas mesmas condições. Este experimento foi realizado para verificar se a presença do sal NaCl na composição do PBS interfere ou não na fotodegradação induzida do PDZ a fim de se escolher um solvente adequado a ser usado na fotodegradação. Os espectros do Photodithazine em diferentes condições apresentaram comportamento semelhante (Figura 17).

Figura 17: Espectros de absorção ótica do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ fotodegradado com LED em 630nm de 0 à 60 min com intensidade de 25mW.cm^{-2} (A) em PBS (B) em tampão fosfato 1mM (C) em tampão fosfato 20mM, pH 7,4.

A partir destes espectros construiu-se gráficos com os valores de absorbância em 401 e 655 nm e de fluorescência em 656 nm em função do tempo de irradiação (Figura 18). Observou-se que a fotodegradação do Photodithazine ocorre da mesma forma em diferentes soluções, não ocorrendo influência da força iônica no processo de “photobleaching”. Desse modo, escolheu-se fazer a degradação do PDZ em PBS permitindo que as amostras irradiadas em diferentes condições possam ser testadas posteriormente nas células.

Figura 18: Valores de absorbância em (A) 401 nm e (B) 655 nm e de fluorescência em (C) 656 nm em função do tempo de irradiação quando PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS, tampão fosfato 1mM e tampão fosfato 20mM é irradiado com LED em 630 nm de 0 à 60 min com intensidade de 25mW.cm⁻².

4.4.1 Efeito do tempo de irradiação

4.4.1.1 Espectroscopia de absorção

A análise espectroscópica por absorção ótica foi realizada para uma solução de Photodithazine $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradada com laser no azul (488nm) e no verde (514nm) e com LED no vermelho (630 nm), mantendo a intensidade de 25 mW.cm^{-2} e variando-se o tempo de irradiação de 0 – 180 min (Figura 19).

Figura 19: Espectro de absorção ótica do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (A) 488nm, (B) 514nm e com LED em (C) 630nm por diferentes tempos de irradiação.

Quando o Photodithazine foi irradiado em 488, 514 e 630 nm observou-se a diminuição da intensidade de absorção da banda de Soret (em 401 nm) e das bandas Q (505, 600 e 655 nm), seguida do aparecimento de uma nova banda em 668nm, sugerindo transformações químicas levando à formação de fotoprodutos. As análises realizadas através do método o CCA também demonstram que existem duas espécies distintas, uma que se degrada em função do tempo (espécie 2) a outra que se forma (máximo em 668nm) em função do tempo (espécie 1) para irradiação nos três comprimentos de onda estudados (Figura 20).

Figura 20: Gráficos obtidos pelo método CCA para PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (A) 488nm, (B) 514nm e com LED em (C) 630nm por diferentes tempos de irradiação.

Nos gráficos obtidos pelo método CCA observa-se que, conforme a espécie 2 (fotossensibilizador) fotodegrada, ocorre a formação da espécie 1 (fotoprodutos), isto indica que os processos ocorrem simultaneamente. A fotodegradação e a formação de fotoprodutos atingem uma saturação no mesmo tempo de irradiação, tempo este que difere para cada comprimento de onda de irradiação. Estas observações são dificultadas quando se observa os espectros de absorção devido ao fato da ocorrência simultânea dos dois processos.

A Figura 21 apresenta as mudanças nos valores de absorbância na banda de Soret (401nm) e na banda Q (655nm) para o Photodithazine em função do tempo de irradiação em 488, 514 e 630nm. A partir do ajuste destes gráficos pode-se obter os valores de tempo de decaimento que são mostrados na Tabela I.

Figura 21: Variação na absorbância em (A) 401nm e (B) 655nm do PDZ 20 µg.mL⁻¹ em PBS fotodegradado com laser de argônio em 488nm e 514nm e com LED em 630nm, I = 25mW.cm⁻², em função do tempo de irradiação.

Além disso essa figura mostra que a fotodegradação atinge uma saturação em torno de 20 min quando o PDZ é irradiado em 630nm e em tempos maiores quando irradiado em 514nm e em 488nm.

Tabela I: Tempo de decaimento das bandas do espectro do PDZ após sua irradiação em 488, 514 e 630nm.

Comprimento de onda de Irradiação (nm)	τ (401 nm) (min)	τ (655 nm) (min)
630	14	13
514	51	65
488	104	120

Analisando a Tabela I verifica-se que os valores do tempo de decaimento para degradação induzida num mesmo comprimento de onda de irradiação, estão na mesma ordem de grandeza quando se acompanha a fotodegradação pela banda em 401 ou em 655nm. A fotodegradação é mais rápida em 630nm seguida de 514 e 488nm. Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que o PDZ apresenta um valor alto de absorvidade molar em 655nm e a irradiação em 630nm abrange esta banda. Deve-se destacar também que valores semelhantes aos apresentados na Tabela I são obtidos pelo ajuste dos gráficos do CCA para a espécie que fotodegrada (espécie 2). Estes valores são mostrados na Tabela II.

Tabela II: Valores de tempo de decaimento obtidos pelo do método do CCA para a banda de Soret do PDZ após sua irradiação em 488, 514 e 630nm.

Comprimento de onda de Irradiação (nm)	Photobleaching τ (min)
630	18
514	50
488	98

Pelos valores de τ mostrados nas Tabelas I e II para a banda de Soret em 401nm apresentam os valores médios de 16, 50,5 e 101 min para irradiação em 630, 514 e 488nm, respectivamente.

A Tabela III apresenta os valores de tempo de decaimento do PDZ e do Photogem[®], acompanhando na Banda de Soret, obtidos por fotodegradação em 630nm. Observa-se que o Photodithazine fotodegrada mais rápido (2,3 vezes) do que o Photogem[®]. Desse modo, o PDZ é menos fotoestável do que o Photogem[®].

Tabela III: Valores de tempo de decaimento da banda de Soret do PDZ e do Photogem[®] após irradiação em 630nm.

Fotossensibilizador	Tempo de degradação τ (min)	Degradação acompanhada no λ
PDZ	14	401 nm
Photogem[®]	32	369 nm

O acompanhamento da formação de fotoprodutos do PDZ pela absorção em função do tempo de irradiação é dificultado devido ao fato destas substâncias se formarem e se fotodegradarem em processos simultâneos. O decaimento da banda de Soret e da banda Q em 655nm não é proporcional à formação da banda em 668nm. O aumento da banda em 668nm foi observado até 40 min de irradiação para degradação em 488, 514 e 630nm e então a intensidade da banda começou a diminuir com a irradiação. Os resultados indicam a fotodegradação dos fotoprodutos a um outro composto com rendimento quântico menor. A formação de fotoprodutos estáveis na região espectral do vermelho possui um papel importante já que estes fotoprodutos parecem ter atividade em PDT⁷³.

Estudos descritos na literatura da fotodegradação de vários fotossensibilizadores como derivados de hematoporfirina, clorinas e ftalocianinas, mostraram que a clorina e₆ é a menos

fotoestável da sequência estudada. Tem sido sugerido que um dos possíveis mecanismos da foto-oxidação de clorina e_6 envolve o ataque do oxigênio na unidade de dieno (consistindo do grupo vinil e uma ligação dupla do endociclo na unidade pirrólica), uma reação que tem sido investigada com detalhes para a protoporfirina IX, considerado um fotossensibilizador muito fotolábil. Clorina e_6 contém um substituinte vinil o qual pode ser suscetível à foto-oxidação. Os autores estudaram a mesma sequência de fotossensibilizadores (derivados de hematoporfirina, clorinas e ftalocianinas) para verificar a eficiência da formação de fotoprodutos que absorvem no vermelho e não observaram a formação de fotoprodutos para clorina e_6 . Para fotossensibilizadores como hematoporfirinas a eficiência da formação de fotoprodutos é correlacionada com a eficiência do “photobleaching”⁵². Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo com PDZ estão de acordo com os estudos de clorina descritos na literatura⁷¹.

Segundo Rotomskis et al.⁷³ e Bonnett et al.⁶¹, podem ocorrer mudanças espectrais devido à modificação fotoinduzida das porfirinas com ou sem a quebra do macrociclo. É descrito que a quebra do macrociclo implica no aparecimento de uma banda na região do UV após a irradiação, e ainda, que o não rompimento do macrociclo leva a uma diminuição da absorbância na banda de Soret e banda Q associada ao surgimento de uma nova banda Q^{61,69,70-74}. No presente estudo não foi observado o aparecimento de uma banda de absorção na região do UV após irradiação nos três comprimentos de onda. Assim, os resultados obtidos sugerem que a exposição do PDZ à luz em 488, 514 e 630nm não causou a ruptura do anel, mas apenas a formação de fotoprodutos do tipo bacterioclorinas (absorção em 660nm). Para o Photogem[®] a fotodegradação induzida causa a diminuição da absorção na banda de Soret (369nm) e nas bandas Q (507, 540, 570 e 620nm) e o surgimento de uma nova banda em 640 nm sugerindo que o fotoproduto seja uma clorina que absorve em menor comprimento de onda em relação as bacterioclorinas^{61,73,80}.

4.4.1.2 Espectroscopia de fluorescência

A análise espectroscópica por fluorescência foi realizada para uma solução de Photodithazine $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser em 488, 514nm e com LED em 630 nm, com intensidade de 25 mW.cm^{-2} variando-se o tempo de irradiação de 0 – 180 min (Figura 22). Os espectros de fluorescência foram obtidos com excitação em 505nm.

Figura 22: Espectro de emissão de fluorescência do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (A) 488nm (B) 514nm e com LED em (C) 630nm por diferentes tempos de irradiação.

Observa-se que o aumento no tempo de irradiação leva à diminuição da intensidade da banda de emissão original do PDZ (656 nm) quando este é irradiado em qualquer dos três comprimentos de onda, comportamento também observado para o Photogem[®]. Entretanto,

quando o Photogem[®] é fotodegradado, ocorre a formação de uma nova banda atribuída aos fotoprodutos o que não é observado nos espectros do Photodithazine na Figura 22. A Figura 23 apresenta a variação na intensidade de fluorescência do PDZ após exposição à luz, em diferentes comprimentos de onda, em função do tempo de irradiação.

Figura 23: Variação da fluorescência em 656 nm do PDZ $20\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em 488nm e 514nm e com LED em 630nm, $I= 25\text{mW.cm}^{-2}$, em função do tempo de irradiação.

Através do ajuste dos gráficos pode-se obter valores do tempo de decaimento da banda de fluorescência em 656nm (Tabela IV). Observa-se que o decaimento é muito mais rápido quando o Photodithazine é irradiado em 630 do que em 514 e 488 nm como já observado para os tempos de decaimento obtidos a partir do espectro de absorção. Isto é facilmente explicável pelo fato do PDZ possuir intensa banda em 655 nm valor próximo ao comprimento de onda de irradiação o que facilita a absorção da energia luminosa para levar à fotodegradação. Observa-se que os valores de τ para absorção e fluorescência em 630nm são da mesma ordem de grandeza o que não ocorre nos outros dois comprimentos de onda.

Tabela IV: Valores de tempo de decaimento das bandas do espectro do PDZ de absorção e fluorescência após sua irradiação em 488, 514 e 630nm.

Comprimento de onda de Irradiação (nm)	τ_{A401} (min)	τ_{A655} (min)	τ_{F656} (min)
630	14	13	18
514	51	65	36
488	104	120	80

No entanto, quando se compara os valores de τ obtidos nota-se que por fluorescência estes valores são menores que os obtidos por absorbância. Isto pode-se dever ao fato da técnica de fluorescência ser mais sensível que a espectroscopia ótica.

Desse modo, não foi observado a formação de uma nova banda nos espectros de fluorescência quando se irradia o PDZ nos diferentes comprimentos de onda. Este comportamento espectral difere do obtido para Photogem[®] irradiado que apresenta decréscimo nas intensidades das bandas de 611 e 672nm bem como o aparecimento de uma nova banda em 636nm⁸⁰.

4.4.2 Efeito da intensidade de irradiação

4.4.2.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência

O efeito fotodinâmico é dependente da magnitude da absorção da dose de luz (produto da intensidade de luz pelo tempo de exposição à luz)⁸⁸. A fim de se estudar o efeito da intensidade de irradiação nos espectros de absorção e de fluorescência do Photodithazine irradiou-se soluções de PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS por 10 min com laser em 488, 514 nm e com LED em 630nm variando-se a intensidade de irradiação de 0 – 500 mW.cm^{-2} . A Figura 24

mostra os espectros de absorção ótica e de fluorescência do PDZ fotodegradado em 630nm (os espectros do PDZ fotodegradado em 488 e 514nm apresentam o mesmo comportamento).

Figura 24: Espectro de (A) absorção ótica e de (B) fluorescência do PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com LED em 630nm por diferentes intensidades de irradiação.

Observou-se nos espectros de absorção e de fluorescência comportamento semelhante ao apresentado no estudo do tempo de irradiação, ou seja, conforme aumenta a intensidade de irradiação, menor a absorbância e a fluorescência, o que pode ser explicado pela diminuição da concentração de PDZ. Nos espectros de absorção observa-se também o surgimento de uma nova banda em 668nm atribuída à formação de fotoprodutos do PDZ.

As variações da absorbância na banda de Soret (401nm) para o Photodithazine em função da intensidade de irradiação em 488, 514 e 630nm estão apresentadas na Figura 25.

Figura 25: Variação da absorvância em 401nm do PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (■) 488, (●) 514nm e com LED em (▲) 630nm por 10min em função da intensidade de irradiação.

Através do ajuste dos gráficos apresentados na Figura 25 pode-se obter valores do tempo de decaimento. Observa-se na Tabela V que a fotodegradação do PDZ é mais rápida em 630nm, seguida de 514 e 488nm, fato já observado nos experimentos em função do tempo de irradiação.

Tabela V: Tempo de decaimento da banda de Soret do espectro de absorção do PDZ após sua irradiação com laser em 488, 514nm e com LED em 630nm em diferentes intensidades.

Comprimento de onda (nm)	τ (min)
630	31
514	45
488	91

Resultados semelhantes a esses observados para o Photodithazine foram obtidos na fotodegradação do Photogem[®], ou seja, a fotodegradação depende diretamente da potência de irradiação⁸⁰. No entanto, para o Photogem[®] a fotodegradação é maior quando se irradia em

514 e 488nm, provavelmente devido ao fato de que a absorbância desse fotossensibilizador ser maior nestes comprimentos de onda do que em 630nm⁸⁰.

4.4.3 Efeito da concentração

4.4.3.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência

Tem sido demonstrado que a agregação dos fotossensibilizadores usados em PDT tem um papel decisivo na atividade fotodinâmica destes compostos, uma vez que esta depende das propriedades físico-químicas e do comportamento fotofísico dos fotossensibilizadores⁸⁹. O conhecimento da relação entre a agregação e a atividade fotodinâmica pode facilitar o desenvolvimento de drogas e pode contribuir significativamente para aumentar a eficiência em PDT. É descrito na literatura que derivados de hematoporfirina apresentam banda de Soret com máximo em torno de 370nm (atribuída aos agregados) e/ou em 395nm (atribuída às espécies monoméricas). Segundo Rotomskis et al. a formação de grandes agregados está ligada às altas concentrações de porfirinas que criam condições anaeróbicas, dificultando a penetração do oxigênio que tem papel importante nos processos de degradação e formação de fotoprodutos⁷⁴.

Com o objetivo de estudar a ocorrência de agregação em altas concentrações e de se observar as diferenças espectrais do PDZ fotodegradado em diferentes concentrações, irradiou-se soluções do fotossensibilizador em concentrações de 10 – 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS, pH 7,4, com laser em 514nm e com LED em 630nm, com intensidade fixa de 25 mW.cm^{-2} por 20 min. A Figura 26 apresenta os espectros de absorção da fotodegradação em função da concentração do fotossensibilizador.

Figura 26: Espectros de absorção do PDZ em PBS fotodegradado com laser de argônio em (A) 514nm e com LED em (B) 630nm com intensidade de $25\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ por 20 min em função da concentração ($10\text{-}100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Na literatura é descrito que derivados de hematoporfirina apresentam dois tipos de agregados formados em solução aquosa: agregados “J” (tipo linear) e agregados “H” (tipo sanduíche). Os agregados tipo “H” (arranjo face-a-face) causam deslocamento da banda de Soret para o azul e das bandas Q para o vermelho, no espectro de absorção; já os agregados tipo “J” (arranjo lado-a-lado) promovem um leve deslocamento da banda de Soret para o

vermelho como também um deslocamento da posição da última banda Q para o vermelho^{74,77,89}.

Analisando a Figura 26 nota-se o mesmo comportamento observado nos experimentos anteriores de tempo de irradiação e de intensidade de irradiação, ou seja, ocorre diminuição da absorção na banda de Soret e bandas Q e o surgimento de uma nova banda em 668nm após irradiação. Não se observou o deslocamento da banda de Soret ou mesmo o surgimento de uma nova banda próxima à banda de Soret o que se atribuiria ao desaparecimento dos agregados. Desse modo, pode-se concluir que as soluções de PDZ na faixa de concentração estudadas não se encontram na forma agregada.

A Figura 27 mostra a variação da absorbância na banda de Soret para as soluções de PDZ 10 - 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não irradiadas e irradiadas.

Figura 27: Absorbância em 401nm em função da concentração da solução de PDZ (10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) não irradiado e irradiado com laser de argônio em (A) 514nm e com LED em (B) 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min.

Na Figura 27 observa-se um comportamento linear da absorção do PDZ em relação a concentração antes e depois da irradiação, ou seja, obedece a Lei de Lambert-Beer. Ocorre uma dependência da fotodegradação em relação a concentração da solução utilizada. Quando

a solução de PDZ é irradiada em 630nm observa-se que conforme aumenta-se a concentração, aumenta-se a fotodegradação (maior a variação de absorção da solução não irradiada em relação a irradiada) em toda a faixa de concentração estudada. Na irradiação em 514nm o mesmo comportamento foi observado até a concentração de 90 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

Obteve-se também os espectros de fluorescência para os experimentos do efeito da concentração na fotodegradação do PDZ (Figura 28) já que esta técnica espectroscópica é mais sensível que a espectroscopia ótica.

Figura 28: Espectros de fluorescência do PDZ em PBS fotodegradado (40-100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) com laser de argônio em (A) 514nm e com LED em (B) 630nm com intensidade de 25mW.cm⁻² por 20 min.

Dependendo da concentração de fotossensibilizador utilizada pode-se ter um maior ou menor predomínio de espécies monoméricas e agregadas, com já mencionado. Em solução muito concentrada, ocorre o predomínio de agregados o que resulta em baixa fluorescência; já em soluções diluídas as espécies monoméricas estão presentes em maior quantidade. Pode-se observar também em soluções não irradiadas uma fluorescência menor do que nas amostras degradadas pela luz, uma vez que com a degradação ocorrem fotomodificações na composição química do fotossensibilizador, decorrentes das reações de foto-redução e foto-oxidação que este sofre, levando desta forma a um desequilíbrio na proporção monômero-agregado existente no fotossensibilizador⁹⁰. Em consequência disto a porfirina mais degradada apresenta uma maior fluorescência. Este fato pode ser explicado visto que a fluorescência dos monômeros é dominante desde que a fluorescência de agregados é menor e que segundo Khairutdinov et al.⁹¹, a excitação com laser das soluções de porfirinas resulta na degradação destas com o aparecimento de espécies monoméricas.

Na Figura 28 observa-se que em altas concentrações de PDZ a intensidade de fluorescência não diminui e quando estas soluções são irradiadas a fluorescência é menor e não ocorre o surgimento de uma nova banda. Estes resultados sugerem que o PDZ não forma agregados na faixa de concentração estudada. Para o Photogem[®], a formação de agregados pode ser observada a partir da concentração de 50µg.mL⁻¹. Sabendo-se que os fotossensibilizadores em sua forma agregada são pouco ativos devido à baixa geração de oxigênio singlete e que ainda o estado de agregação pode gerar problemas de administração e incorporação da droga nas células, conclui-se que o PDZ, por não se apresentar na forma agregada, apresenta vantagem para a aplicação em PDT em relação ao Photogem[®] 14,65,80,97 .

4.4.4 Efeito do pH

4.4.4.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência

O pH dos tecidos tumorais apresenta-se mais baixo do que o pH dos tecidos normais, este fato tem sido proposto como um fator que contribui para a captura seletiva pelo tumor dos diversos tipos de agentes fotossensíveis^{48,92,93}. Na literatura a seletividade dos fotossensibilizadores por células tumorais é explicada pelo fato das células tumorais apresentarem grande número de receptores de lipoproteína que são os maiores transportadores de fotossensibilizadores. O aumento da lipofilicidade dos fotossensibilizadores leva a um aumento da captura celular da droga e este parâmetro pode ser modulado pelo pH através do equilíbrio ácido-base uma vez que pequenas mudanças no pH extracelular do tumor podem levar ao deslocamento do equilíbrio entre várias espécies iônicas (cátions e ânions) do fotossensibilizador. Portanto, pequenas mudanças de pH do tecido podem levar ao deslocamento do equilíbrio entre as várias espécies iônicas do fotossensibilizador bem como sua protonação que pode estar relacionada com o aumento de sua lipofilicidade levando a uma maior captura do fotossensibilizador pelas células⁴⁸. E sabendo que a maioria dos compostos utilizados em PDT são moléculas com estrutura semelhante a porfírina, que possuem sítios de protonação/desprotonação em sua estrutura molecular, é muito importante considerar o pH um dos fatores mais importantes para sua eficácia^{48,92,93}.

Foi realizada análise espectroscópica por absorção ótica e fluorescência de soluções de PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS variando o pH de 2 a 12. Irradiou-se as soluções com laser em 514 e com LED em 630nm com intensidade de 50 mW.cm^{-2} por 10 min. A Figura 29 apresenta os espectros de absorção do PDZ não irradiado e irradiado em 630nm. Os espectros resultantes da irradiação em 514nm não foram mostrados por apresentarem o mesmo comportamento, diferindo apenas na intensidade de absorção.

Figura 29: Espectros de absorção ótica do PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em função do pH (A) não irradiado e (B) irradiado com LED em 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min.

Na Figura 29 observa-se que o aumento do pH leva a um aumento na intensidade de absorção, já que em soluções muito ácidas há um predomínio de espécies agregadas o que diminui a absorção. Pode-se observar também que o aumento do pH causa um deslocamento da banda de Soret para o azul e um deslocamento das bandas Q para o vermelho, causados pela desagregação uma vez que, quanto menor o pH, maior o predomínio de espécies de agregados causado pelo equilíbrio ácido-base entre as espécies iônicas. O espectro de absorção do PDZ em pH 12 é caracterizado pela banda de Soret com máximo em 401 nm e bandas Q em 505 e 655 nm, valores estes que se mantêm até pH 6. A acidificação da solução para pH 4 resulta num gradual deslocamento hipsocrômico (para o vermelho) da banda de Soret para 403 nm e um deslocamento batocrômico (para o azul) das bandas Q para 504 e 651 nm. Observa-se ainda que para pH 2 a banda de Soret tem máximo em 403nm e ocorre a formação de picos em 640 e 669 nm. Portanto as propriedades físico-químicas do PDZ dependem do pH.

Pode-se observar que a irradiação da solução de PDZ em diferentes pHs não levou a alteração no comprimento de onda máximo de absorção na faixa de pH estudada, ou seja, em relação às amostras não irradiadas não ocorreu deslocamento quando a solução foi irradiada, observou-se apenas diminuição na intensidade de absorção. O surgimento da banda em 668nm, atribuída a formação de fotoprodutos após irradiação, foi observada a partir de pH 4.

Na Figura 30 está apresentado gráfico da absorbância em 655 nm das soluções não irradiadas e irradiadas em função do pH. A partir deste gráfico observa-se que a absorção aumenta conforme aumenta o pH para soluções irradiadas e não irradiadas.

Figura 30: Absorbância em 655nm em função do pH para solução de PDZ 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS não irradiado e irradiado com LED em 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min.

Obteve-se também os espectros de fluorescência para os experimentos do efeito do pH na fotodegradação do PDZ (Figura 31).

Figura 31: Espectro de fluorescência do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em diferentes pHs (A) não irradiado e (B) irradiado com LED em 630nm com intensidade de 25mW.cm^{-2} por 20 min.

Assim como observado nos espectros de absorção, o aumento do pH leva a um aumento na intensidade de fluorescência. No intervalo de pH 2 até 6 ocorre um deslocamento para o vermelho da banda de fluorescência, e a partir daí não há deslocamento do comprimento de onda máximo de fluorescência (656 nm) até pH 12. Nos espectros de fluorescência não se observou a formação de nova banda em toda faixa de pH estudada. Estes resultados confirmam que o estado de agregação do PDZ depende do pH e que em soluções ácidas o PDZ apresenta-se agregado.

Estudos realizados no grupo mostraram que o aumento do pH leva a um aumento na absorbância do Photogem[®] e que nos espectros de absorção ocorre o deslocamento da banda de Soret em 400nm para o azul (pH 1-6) e em 369nm para o vermelho (pH 6-12). Quando a solução de Photogem[®] é irradiada em pHs ≤ 5 não ocorre a formação da banda em 640nm, atribuída aos fotoprodutos. Nos espectros de fluorescência o aumento do pH leva a um aumento na intensidade de fluorescência, já que em soluções muito ácidas há um predomínio de espécies agregadas levando a uma baixa fluorescência. Quando as soluções são irradiadas

há uma diminuição da fluorescência em 611 e em 672nm, bem como a formação da banda do fotoproduto em 636nm. Portanto, os resultados em função do pH obtidos pra Photogem[®] (porfirina) foram bastante semelhantes aos obtidos neste estudo para o PDZ (clorina).

4.4.5 Efeito de surfactantes

4.4.5.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência

É descrito na literatura que a incorporação das porfirinas em micelas muda seu estado de agregação. Micelas são definidas como agregados coloidais estáveis termodinamicamente, espontaneamente formados quando se atinge uma determinada concentração de anfifílico em solução (concentração micelar crítica – CMC). Anfifílicos, também conhecidos como surfactantes ou tensoativos, quando adicionado em solução, migram para a interface, diminuindo a tensão superficial da solução quando comparada com a tensão superficial do solvente puro, pela auto-agregação. Os estudos que empregam surfactantes tentam mimetizar a membrana biológica para estudo de agregação dos diferentes tipos de fotossensibilizadores^{77,89}.

Neste trabalho foram realizados experimentos de fotodegradação do PDZ na presença de surfactantes neutros (Triton X-100 e Brij-35) a fim de investigar como a agregação do PDZ é afetada pela presença de meio micelar bem como suas consequências na fotodegradação. A Figura 32 mostra espectros de absorção ótica do PDZ não irradiado e irradiado em 630nm na presença de Triton X-100 e Brij-35.

Figura 32: Espectros de absorção do PDZ 20 µg.mL⁻¹ em solução de (A) Triton-X e de (B) Brij-35 irradiado com LED em 630nm com intensidade de 25mW.cm⁻² de 0-180 min.

A Figura 32 mostra que houve diminuição da absorbância em toda região do espectro quando o PDZ é irradiado na presença dos surfactantes Triton e Brij-35. No entanto, não houve a formação da banda em 668nm, atribuída aos fotoprodutos, nem o deslocamento das bandas de Soret e bandas Q.

Nos experimentos foi utilizada concentração de Triton X-100 (14mM) acima da sua CMC (0,24mM) e de Brij-35 (0,05mM) abaixo da sua CMC (0,09mM). Sabe-se que quando o fotossensibilizador está em solução de surfactante acima da CMC, ele se apresenta em uma micromulsão com predomínio de espécies monoméricas (desagregação do fotossensibilizador frente ao surfactante), já o fotossensibilizador em solução de surfactante abaixo da CMC, apresenta-se um predomínio de espécies agregadas. No entanto, não foi observada diferença devido à concentração dos surfactantes utilizadas. As considerações apresentadas para o PDZ na presença de surfactante podem não ser devidas à agregação do PDZ.

Obteve-se também os espectros de fluorescência do PDZ fotodegradado na presença de surfactantes (não mostrados) e confirmou-se que a presença de surfactantes diminui a fluorescência em toda região do espectro.

A partir destes espectros de absorção e de fluorescência, construiu-se um gráfico da absorbância em 401nm e fluorescência em 656nm em função do tempo de irradiação (Figura 33).

Figura 33: Variação da (A) absorbância em 401nm e da (B) fluorescência em 656nm do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na ausência ou presença de Triton e Brij-35 fotodegradado com LED em 630nm, $I = 25\text{mW.cm}^{-2}$, em função do tempo de irradiação.

Através do ajuste dos gráficos obteve-se os valores de tempo de decaimento. Quando o PDZ é irradiado em 630nm na presença de Triton X-100 e Brij-35 obteve-se valores de tempo de decaimento de 91 e 101 min na banda de Soret e de 119 e 66 min na banda de fluorescência, respectivamente. Esses valores são diferentes dos obtidos pela fotodegradação do PDZ em 630nm na ausência de surfactantes (14 min na banda de Soret e 18 min na banda de fluorescência). Houve um aumento de 85% no tempo de decaimento obtido pela absorbância em 401nm para os dois surfactantes e aumento de 85% e 72% para Triton X-100 e Brij-35, respectivamente, na fluorescência em 656nm. Estes resultados indicam que a presença de surfactantes na solução diminui a fotodegradação do PDZ, que pode ser explicado pelo fato do fotossensibilizador encontrar-se agregado em solução com surfactantes.

Estudos realizados no grupo com Photogem[®] (resultados ainda não publicados) nas mesmas condições que as empregadas com o PDZ, mostraram que o Photogem[®] apresenta-se na forma monomérica na presença de Triton X-100, o que pode ser visto pela formação de uma nova banda em 660nm, pelo deslocamento das banda de Soret e bandas Q e pela maior degradação, e no entanto, apresenta-se na forma agregada na presença de Brij-35, onde não se observou a formação da banda em 660nm e a degradação foi menor do que em solução de Triton X-100 e PBS.

Foi observado por Rotomskis et al.⁷⁷ que não há evidência da correlação entre a eficiência de formação do fotoproduto e o estado de agregação da porfirina, entretanto, a mudança no estado de agregação, resulta na formação de um novo fotoproduto com banda de absorção em 660nm. Segundo o autor, a formação de fotoprodutos em 640nm é condicionada pela presença de agregados tipo “sanduíche” e o fotoproduto em 660nm ao tipo “linear” ligado covalentemente (estruturas mais fotoestáveis). A banda de Soret reflete as características predominantes em solução uma vez que o tipo “sanduíche” apresenta deslocamento da banda de Soret para ao azul e o tipo “linear” para o vermelho. O mesmo comportamento observado para o Photogem[®] foi observado para o Photofrin[®], Photosan[®] e derivado de hematoporfirina em estudos com Triton X-100^{71,77}.

4.4.6 Efeito de supressores na fotodegradação do PDZ

4.4.6.1 Espectroscopia de absorção e de fluorescência

Para investigar o envolvimento do oxigênio singlete ou de radicais no mecanismo de formação de fotoprodutos do PDZ, experimentos foram realizados na presença de azida e manitol⁹⁴. A azida de sódio (NaN₃) é um eficiente supressor de oxigênio singlete, portanto, quando presente no meio reacional, deve diminuir a constante de velocidade da reação de

foto-oxidação das biomoléculas se o mecanismo envolve a reação com oxigênio singlete. O manitol é supressor de radical ($\bullet\text{OH}$) e se o mecanismo de ação do fotossensibilizador sobre as biomoléculas for do tipo I, deve causar uma diminuição na constante de velocidade quando presente no meio reacional⁹⁵.

Os espectros de absorção ou fluorescência (não mostrados) apresentam o mesmo comportamento encontrado na degradação do PDZ na ausência de azida e manitol, diferindo apenas nas intensidades.

A Figura 34 mostra o decaimento da absorção em 401nm e da fluorescência em 656nm na fotodegradação do PDZ na ausência e presença de azida e manitol.

Figura 34: Variação da (A) absorbância em 401nm e da (B) fluorescência em 656nm do PDZ $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ fotodegradado com LED em 630nm, $I = 25\text{mW.cm}^{-2}$, na ausência ou presença de azida e manitol.

Na presença de azida a fotodegradação do PDZ ocorre em tempo ligeiramente maior (9%), ou seja, a fotodegradação é mais lenta, e na presença de manitol não há uma diferença significativa em relação a fotodegradação do controle (PDZ na ausência de azida ou manitol). Estes resultados sugerem que a fotodegradação do PDZ ocorre pelo mecanismo tipo II, ou seja, via formação de oxigênio singlete (processo foto-oxidativo).

Estudos de foto-hemólise na presença de PDZ realizados no grupo (resultados não publicados) mostram que na presença de azida a hemólise se dá em tempo 130% maior e na presença de manitol ocorre no mesmo tempo que a hemólise do controle, sugerindo que o processo ocorre via oxigênio singlete. Experimentos descritos na literatura na presença de azida mostram que este protege as leveduras da ação fotossensível do PDZ. O efeito protetor da azida de sódio indica que o oxigênio singlete contribui consideravelmente para a fototoxicidade do PDZ, isto é, para o efeito fotodinâmico via mecanismo tipo II⁹⁶. Estudos realizados por Bonnett et al.⁶¹, Ericson et al.⁹⁵ e Moan⁹⁷ na presença de azida ou D₂O para protoporfirina IX (PpIX), Photofrin[®] e Foscan[®] mostraram também que o processo de fotodegradação é via mecanismo tipo II tanto para as duas porfirinas quanto para a clorina estudadas.

4.5 Ensaios citotóxicos

4.5.1 Ensaios citotóxicos na ausência de luz (escuro)

4.5.1.1 Efeito do tempo de incubação e da presença de soro na citotoxicidade no escuro do Photodithazine não irradiado

Experimentos controle foram realizados com as células normais (Tabela VI) e tumorais (Tabela VII) para verificar a dependência da citotoxicidade do Photodithazine não irradiado em função do tempo de incubação do fotossensibilizador com as células e da presença de soro no meio de incubação.

Tabela VI: Citotoxicidade no escuro do PDZ não irradiado na linhagem celular VERO em relação ao tempo de incubação e à presença de soro. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos citotóxicos realizados em cada condição. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂.

Tempo de incubação Ausência ou presença do soro	1 h	2 h	4 h
	IC ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)		
Incubação sem soro	70 ± 1 (6)	62 ± 3 (12)	41 ± 1 (8)
Incubação com 3% de soro	104 ± 7 (6)	89 ± 2 (8)	60 ± 2 (8)

Estes resultados sugerem que o tempo de incubação do fotossensibilizador nas células e a presença de soro afetam a citotoxicidade do Photodithazine na linhagem de células normais. Verifica-se que o aumento do tempo de incubação causa uma diminuição do IC₅₀, o que significa que concentração menor de fotossensibilizador é necessária para matar as células em tempos de incubação maiores. Comparando 1h com 4h de incubação, na ausência de soro, observa-se uma diminuição de 41% no valor do IC₅₀. A presença de soro no meio de incubação diminui o IC₅₀, comparando-se novamente 1h com 4h de incubação, verifica-se que a diminuição no valor do IC₅₀ foi de 42%, praticamente igual à anterior. Pode-se observar ainda que os valores de IC₅₀ para as células normais aumentam (aproximadamente 30%) com a adição de 3% de soro no meio de incubação nos diferentes tempos de incubação estudados. Isto deve-se ao fato de que o fotossensibilizador liga-se as proteínas do soro, diminuindo assim a concentração de Photodithazine livre e aumentando o valor de IC₅₀, ou seja, da concentração de fotossensibilizador necessária para matar 50% da população celular.

Tabela VII: Citotoxicidade no escuro do PDZ não irradiado na linhagem celular HEP-2 em relação ao tempo de incubação e à presença de soro. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos citotóxicos realizados em cada condição. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂.

Tempo de incubação Ausência ou presença do soro	1 h	2 h	4 h
	IC ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)		
Incubação sem soro	62 ± 3 (6)	32 ± 4 (12)	25 ± 2 (6)
Incubação com 3% de soro	72 ± 2 (6)	58 ± 4 (8)	33 ± 3 (6)

Pode-se observar na Tabela VII que a variação nos valores de IC₅₀ são mais acentuados para as células HEP-2. Quando se compara 1h com 4h de incubação do fotossensibilizador com as células tumorais há uma diminuição nos valores no IC₅₀ de 60% e 53% tanto na ausência como na presença de soro, respectivamente.

Entretanto deve-se observar que os valores de IC₅₀ do Photodithazine em células normais e em células tumorais diferem e essa diferença persiste mesmo quando varia-se o tempo de incubação e adiciona-se ou não soro no meio de incubação. Para 1h de incubação na ausência de soro o valor de IC₅₀ do Photodithazine para as células normais é 12% maior do que o valor para as células tumorais, para 4h de incubação na presença de soro, o valor de IC₅₀ do Photodithazine para as células normais é 45% maior do que para células tumorais. Desse modo, pode-se concluir que o Photodithazine é mais citotóxico no escuro para as células tumorais.

Um estudo de Ivanov et al.⁶⁵ encontrou que 10µM de PDZ causa cerca de 17% de inibição no crescimento de células CaOv (carcinoma ovário humano), no escuro. Na mesma concentração foi encontrado neste trabalho que o índice de morte celular para o PDZ é de 4%

nas células normais VERO e 15% nas células tumorais HEp-2, concordando com o trabalho mencionado.

Comparando os valores de IC_{50} no escuro do PDZ incubado com células por 2h com os resultados obtidos no grupo com o Photogem[®], o valor de IC_{50} do Photogem[®] nas células VERO é $19 \pm 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na ausência de soro e para o Photodithazine $62 \pm 3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, portanto 70% menos citotóxico do que o Photogem[®] em células normais.

Nas células tumorais HEp-2, o IC_{50} no escuro do Photogem[®] foi $8,8 \pm 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na ausência de soro e para o Photodithazine $32 \pm 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o que equivale a um decréscimo na citotoxicidade no escuro de 72%, portanto uma variação muito próxima da encontrada em células normais.

O coeficiente de partição (K_p) é um método simples de estimar as propriedades anfífilas de fotossensibilizadores a fim de prever seu comportamento em meio biológico. Os valores de K_p para o Photodithazine e para o Photogem[®] em 1-octanol/tampão fostafo pH 7,4 foram determinados no grupo resultando em 1,6 e 1,3 indicando que PDZ é bastante lipofílico e portanto capaz de se localizar na membrana plasmática. Assim, a alta eficiência fotodinâmica do Photodithazine pode estar relacionada com sua habilidade de penetrar em membranas biológicas⁶² e assim causar foto-oxidações irreversíveis que culminarão na morte celular.

4.5.1.2 Citotoxicidade no escuro do Photodithazine não irradiado e previamente irradiado em 488, 514 e 630 nm

A Tabela VIII apresenta os valores de IC_{50} em células normais VERO do Photodithazine não irradiado e previamente irradiado com laser em 488 e 514nm e com LED em 630nm por tempos de 0-60 min. O tempo de incubação do fotossensibilizador com as células foi de 2 h na ausência de soro.

Tabela VIII: Citotoxicidade no escuro dos fotoprodutos do PDZ obtidos após irradiação em 488, 514 e 630nm para as células normais VERO. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e 5% CO₂.

Comprimento de onda de irradiação	488 nm (azul)	514 nm (verde)	630 nm (vermelho)	Número de experimentos
Tempo de irradiação (min)	IC₅₀ ± DP (µg.mL⁻¹)			
0	62 ± 3			12
10	64 ± 4	73 ± 1	65 ± 3	5
20	68 ± 3	75 ± 1	72 ± 2	5
40	73 ± 1	80 ± 1	75 ± 1	5
60	80 ± 1	83 ± 1	86 ± 2	5

Pode-se observar na Tabela VIII, um efeito similar na citotoxicidade do Photodithazine quando este é irradiado nos três comprimentos de onda; ocorre uma diminuição da citotoxicidade no escuro para as células VERO já que os valores de IC₅₀ aumentam com o aumento do tempo de irradiação. Comparando os três comprimentos de onda, pode-se concluir que a irradiação prévia da solução de PDZ causa uma diminuição equivalente (aproximadamente 1,3 vezes) na sua citotoxicidade.

A Tabela IX apresenta os valores de IC₅₀ em células tumorais HEp-2 do Photodithazine não irradiado e previamente irradiado com laser em 488 e 514nm e com LED em 630nm por tempos de 0-60 min.

Tabela IX: Citotoxicidade no escuro dos fotoprodutos do PDZ obtidos após irradiação em 488, 514 e 630nm para as células tumorais HEP-2. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e 5% CO₂.

Comprimento de onda de irradiação	488 nm (azul)	514 nm (verde)	630 nm (vermelho)	Número de experimentos
Tempo de irradiação (min)	IC₅₀ ± DP (µg.mL⁻¹)			
0	32 ± 4			12
10	65 ± 2	69 ± 1	64 ± 1	5
20	68 ± 1	70 ± 1	65 ± 1	5
40	69 ± 1	73 ± 2	71 ± 1	5
60	73 ± 1	75 ± 1	80 ± 1	5

Observa-se na Tabela IX uma diminuição da citotoxicidade no escuro para as células HEP-2 em função do tempo de irradiação prévia da solução de Photodithazine. Entretanto, o aumento do IC₅₀ para as células HEP-2 é de aproximadamente 58% contra 25% para as células VERO. Estes resultados sugerem que os fotoprodutos do PDZ são menos citotóxicos no escuro que a droga não irradiada.

Este mesmo comportamento é também observado para o Photogem[®], ou seja, seus fotoprodutos são menos tóxicos no escuro que o Photogem[®] não degradado.

Outros trabalhos da literatura também descrevem comportamento semelhante. Um estudo da fototoxicidade do Quinifuryl (composto nitroheterocíclico com atividade anticâncer) em células de leucemia de rato (P388) mostrou que os produtos finais da fotodecomposição do Quinifuryl apresentam menor citotoxicidade no escuro do que o Quinifuryl não degradado, causando a morte de menos que 10% das células com 100 min de incubação. Os produtos finais do Quinifuryl não são tóxicos depois de 60 min de irradiação, sendo que o Quinifuryl não degradado causa a morte de aproximadamente 90% das células.

Estes resultados mostram claramente que os produtos finais da fotodecomposição do Quinifuryl não são responsáveis pela citotoxicidade desta droga⁹⁸.

4.5.1.3 Efeito da intensidade de irradiação na citotoxicidade no escuro do Photodithazine previamente irradiado em 488, 514 e 630 nm em células normais e tumorais

As Tabelas X e XI apresentam os valores de IC₅₀ no escuro do Photodithazine previamente irradiado em diferentes intensidades com laser em 488 e 514nm e com LED em 630nm para células normais e tumorais. As células foram incubadas por 2 h na ausência de soro a 37°C e 5% CO₂.

Tabela X: Valores de IC₅₀ do PDZ no escuro para a linhagem VERO, após o PDZ ter sido fotodegradado em 488, 514nm e 630nm em diferentes intensidades de irradiação. As células foram incubadas por 2h a 37°C e 5% CO₂. O número de experimentos realizados foi igual ou superior a quatro.

Comprimento de onda de irradiação	488 nm	514 nm	630 nm
Intensidade de irradiação da solução de PDZ (mW.cm⁻²)	IC₅₀ ± DP (µg.mL⁻¹)		
0	63 ± 10		
25	72 ± 2	76 ± 1	76 ± 1
75	86 ± 1	84 ± 2	83 ± 2
100	87 ± 1	88 ± 1	92 ± 3
500	98 ± 3	99 ± 1	106 ± 2

A partir dos valores da Tabela X verifica-se que a citotoxicidade do Photodithazine diminui com o aumento da intensidade de irradiação, ou seja, os fotoprodutos formados após

irradiação nos três comprimentos de onda são menos citotóxicos no escuro (cerca de 1,6 vezes para irradiação em 500mW.cm^{-2}) do que o Photodithazine não irradiado.

Nos estudos espectroscópicos observou-se que a fotodegradação do PDZ é maior quando se irradia em 630nm seguida de 514 e 488nm. No entanto, não se observa uma diferença significativa nos valores de IC_{50} quando se compara a citotoxicidade dos fotoprodutos formados pela irradiação nos comprimentos de onda estudados. Isso sugere que a irradiação nos três comprimentos de onda produz fotoprodutos semelhantes mas em quantidades diferentes.

Tabela XI: Valores de IC_{50} do PDZ no escuro para a linhagem HEP-2, após o PDZ ter sido fotodegradado em 488, 514nm e 630nm em diferentes intensidades de irradiação. As células foram incubadas por 2h a 37°C e 5% CO_2 . O número de experimentos realizados foi igual ou superior a quatro.

Comprimento de onda de irradiação	488 nm	514 nm	630 nm
Intensidade de irradiação da solução de PDZ (mW.cm^{-2})	$\text{IC}_{50} \pm \text{DP } (\mu\text{g.mL}^{-1})$		
0	32 ± 7		
25	70 ± 2	71 ± 2	76 ± 2
75	72 ± 3	73 ± 2	85 ± 3
100	81 ± 1	79 ± 1	89 ± 1
500	84 ± 4	87 ± 3	92 ± 1

Também para as células tumorais os valores de IC_{50} aumentam com a intensidade de irradiação. Entretanto, quando se compara a maior intensidade de irradiação estudada (500mW.cm^{-2}), observa-se que o aumento do IC_{50} para as células HEP-2 é de aproximadamente 63% contra aproximadamente 37% para as células VERO.

Portanto, da mesma forma que no estudo em função do tempo de irradiação, verificou-se que os fotoprodutos formados após irradiação de PDZ são menos citotóxicos no escuro do que o PDZ não degradado e que o efeito da irradiação na citotoxicidade é maior nas células HEp-2 do que nas células VERO.

4.5.2 Ensaios citotóxicos na presença de luz (no claro)

4.5.2.1 Efeito da luz em cultura de células

Foram realizados experimentos controle com as linhagens VERO e HEp-2 em que as células foram irradiadas com três diferentes intensidades de luz em intervalos de tempo variáveis a fim de determinar a influência da luz sobre a proliferação celular na ausência do fotossensibilizador. Estes experimentos foram utilizados como um segundo controle, pois em PDT somente a luz na ausência do fotossensibilizador não deve apresentar efeito tóxico às células. Os dados estão apresentados nas Tabelas XII (células normais) e XIII (células tumorais).

Tabela XII: Efeito da intensidade de luz sobre o índice de sobrevivência celular (I.S.) para as células normais (VERO), nas intensidades de irradiação de 13, 20 e 25mW.cm⁻², em tempos variando de 0 - 60 min. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂.

Tempo de Irradiação (min)	Intensidade de irradiação (mW.cm ⁻²)					
	13		20		25	
	Dose J.cm ⁻²	I.S. (%)	Dose J.cm ⁻²	I.S. (%)	Dose J.cm ⁻²	I.S. (%)
0	0	100	0	100	0	100
7	5,4	99,2	8,4	98,9	10,5	98,2
14	10,9	98,4	16,8	98,2	21,0	97,9
20	15,6	97,5	24,0	97,0	30,0	97,0
25	19,5	97,2	30,0	96,9	38,5	96,5
40	31,2	96,8	48,0	96,0	60,0	95,6
60	46,8	96,1	72,0	95,5	90,0	94,8

Para as células VERO verifica-se que o aumento na intensidade de irradiação na ausência de fotossensibilizador praticamente não afetou a mortalidade celular. Observou-se que a irradiação na dose máxima de 90 J.cm⁻² causou a maior de morte celular, ou seja, 5%.

Tabela XIII: Efeito da intensidade de luz sobre o índice de sobrevivência celular (I.S.) para as células tumorais (HEp-2), nas intensidades de irradiação de 13, 20 e 25mW.cm⁻², em tempos variando de 0 - 60 min. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂.

Tempo de Irradiação (min)	Intensidade de irradiação (mW.cm⁻²)					
	13		20		25	
	Dose J.cm⁻²	I.S. (%)	Dose J.cm⁻²	I.S. (%)	Dose J.cm⁻²	I.S. (%)
0	0	100	0	100	0	100
7	5,4	98,7	8,4	98,5	10,5	97,9
14	10,9	96,2	16,8	94,9	21,0	93,5
20	15,6	92,0	24,0	91,5	30,0	90,8
25	19,5	87,1	30,0	86,2	38,5	84,9
40	31,2	80,2	48,0	79,7	60,0	78,5
60	46,8	77,2	72,0	76,5	90,0	75,0

A Tabela mostra que para as células HEp-2 o índice de morte celular pode chegar até a 25% na dose de 90 J.cm⁻². Morte celular semelhante à obtida em células normais na dose de 90 J.cm⁻² é conseguida para essa linhagem tumoral para irradiação com dose em torno de 15 J.cm⁻². A mortalidade celular para as células HEp-2 na ausência de fotossensibilizador aumenta ligeiramente com a intensidade e aumenta muito em função do tempo de irradiação. Pode concluir que as células tumorais são mais sensíveis a irradiação. Deve-se ressaltar que na aplicação clínica de PDT dificilmente uma lesão é irradiada por tempo superior a 40 min.

A Figura 35 apresenta o efeito da luz sobre a proliferação celular 48 horas após o tratamento das células com laser em 630 nm em diferentes intensidades (13, 20 e 25mW.cm⁻²) e em diferentes tempos de irradiação para as células normais (VERO) e células tumorais (HEp-2).

Figura 35: Efeito da luz sobre a proliferação das células VERO () e de células HEP-2 () em função da intensidade e do tempo de irradiação.

Pode-se observar na Figura 35 que as células VERO praticamente não são afetadas pela luz e que já existe uma alteração significativa ($p < 0,01$) na sobrevivência celular das células HEP-2 após 25 min de irradiação para as três intensidades.

Desse modo, nos estudos citotóxicos na presença de luz (no claro), utilizou-se irradiação com LED em 630nm, intensidade de irradiação de $25 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ e tempo de irradiação máxima de 25min, ou seja, dose máxima $37,5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ para garantir que o efeito da luz não apresente efeito tóxico às células superior a 25%.

4.5.2.2 Efeito do tempo de incubação, do soro e da dose de luz na citotoxicidade no claro do Photodithazine não irradiado

Foram realizados experimentos citotóxicos no claro, irradiando com LED em 630nm, para o Photodithazine não irradiado em função do tempo de incubação do fotossensibilizador com as células, da ausência ou presença de 3% de soro no meio de incubação e da dose de luz. Os valores de IC₅₀ obtidos estão apresentados na Tabela XIV (células normais) e na Tabela XV (células tumorais).

Tabela XIV: Citotoxicidade no claro do PDZ não irradiado na linhagem celular VERO em função do tempo de incubação, da presença de soro e da dose de luz. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos citotóxicos realizados em cada condição. A intensidade de irradiação igual a 25mW.cm⁻². As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂.

Tempo de Tempo de Irradiação (min)	2 h		4 h	
	IC ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)			
	Sem soro	Com soro	Sem soro	Com soro
0	62 ± 3 (12)	89 ± 2 (8)	41 ± 1 (8)	60 ± 2 (8)
7	6 ± 1 (8)	17 ± 5 (4)	3,5 ± 0,2 (4)	13 ± 2 (5)
14	3,4 ± 0,3 (8)	14 ± 4 (4)	3,5 ± 0,2 (5)	16 ± 1 (4)
21	2,8 ± 0,2 (6)	3,8 ± 0,6 (4)	3,0 ± 0,5 (4)	3,6 ± 0,3 (4)

A partir dos valores da Tabela XIV, observa-se que o tempo de incubação do fotossensibilizador com as células, a presença de soro no meio de incubação e o tempo de irradiação afetam a citotoxicidade do PDZ. O aumento no tempo de incubação de 2h para 4h

leva a um aumento (aproximadamente 1,5 vezes) na citotoxicidade do Photodithazine nas células VERO, na presença ou ausência de soro, tanto no escuro quanto para irradiação por 7 min. No entanto, para tempos de irradiação maiores, o tempo de incubação já não importa, ou seja, os valores de IC₅₀ para 2 e 4h de incubação não apresentam diferença significativa tanto na ausência ou presença de soro. Assim, conclui-se que o efeito final é mais dependente do tempo irradiação do que do tempo de incubação.

Quanto à ausência ou presença de soro, verifica-se que a presença de 3% de soro diminui a citotoxicidade do Photodithazine, já que os valores de IC₅₀ aumentam, para tempos de irradiação ≤ 14 min. Este resultado provavelmente pode ser explicado pelo fato do fotossensibilizador se ligar às proteínas do soro e com isso deixar menos fotossensibilizador livre para atuar nas células.

Tabela XV: Citotoxicidade no claro do PDZ não irradiado na linhagem celular HEp-2 em função do tempo de incubação, da presença de soro e da dose de luz. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos citotóxicos realizados em cada condição. A intensidade de irradiação igual a 25mW.cm⁻². As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂.

Tempo de incubação	1 h		2 h		4 h	
Tempo de irradiação (min)	IC ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)					
	Sem soro	Com soro	Sem soro	Com soro	Sem soro	Com soro
0	62 ± 3 (6)	72 ± 2 (6)	32 ± 4 (12)	58 ± 4 (8)	25 ± 2 (6)	33 ± 3 (6)
7	5,1 ± 0,5 (4)	12 ± 2 (4)	4 ± 1 (6)	9 ± 1 (6)	1,9 ± 0,3 (6)	8 ± 1 (5)
14	4 ± 1 (5)	9,7 ± 0,5 (5)	3,1 ± 0,7 (6)	6,9 ± 0,2 (6)	1,8 ± 0,2 (5)	5,5 ± 0,6 (5)
21	3,3 ± 0,8 (4)	7,0 ± 0,3 (4)	2,3 ± 0,7 (5)	6,9 ± 0,2 (5)	1,7 ± 0,4 (6)	4 ± 1 (4)

Analisando a Tabela XV (células tumorais) verifica-se que esta apresenta resultados similares aos apresentados na XIV. O aumento do tempo de incubação resulta numa diminuição dos valores de IC_{50} do Photodithazine nas células HEp-2, quando as células são expostas às mesmas condições de tempo de irradiação e presença de soro. Observa-se que o aumento do tempo de incubação de 1h para 2h leva a um aumento (aproximadamente 1,4 vezes) da citotoxicidade do Photodithazine nas células HEp-2, na presença e ausência de soro, tanto sem irradiar como para os diferentes tempos de irradiação estudados. Aumentando o tempo de incubação de 2h para 4h o aumento do IC_{50} é de no mínimo 1,1 vezes tanto no escuro quanto para irradiação por 7, 14 e 21min.

Comparando a ausência e presença de soro no meio de incubação verifica-se que para todos os tempos de incubação e todos os tempos de irradiação, os valores de IC_{50} do PDZ na presença de 3% de soro são maiores (em pelo menos 13%), ou seja, é necessário mais fotossensibilizador para obter o mesmo efeito citotóxico.

Quanto ao tempo de irradiação, verifica-se que o aumento deste aumenta a citotoxicidade para os tempos de incubação estudados tanto na presença quanto na ausência de soro. É fácil mostrar que a citotoxicidade do Photodithazine é enormemente potencializada pela luz. O aumento na citotoxicidade pode chegar a 18 vezes na ausência de soro e 8 vezes na presença de soro no claro.

Comparando-se as duas tabelas anteriores verifica-se que os valores de IC_{50} são menores para as células HEp-2 em todas as condições estudadas tanto na ausência (escuro) como na presença de luz (claro). Entretanto, é importante ressaltar que a citotoxicidade do Photodithazine é enormemente potencializada pela luz tanto para as células VERO quanto para as células HEp-2. Comparando os valores de IC_{50} do Photodithazine na ausência de luz e presença de luz, verifica-se que ocorre um decréscimo nestes valores de no mínimo 92% e 87%, na ausência e presença de soro, respectivamente.

Os resultados relativos ao efeito do tempo de incubação e do tempo de irradiação concordam com resultados descritos na literatura em um estudo da bioluminescência de células *E. coli* TG1 (pXen7) na presença de PDZ 15 μM . O estudo mostrou que esse fotossensibilizador não é tóxico para as células bacterianas no escuro, mas nesta mesma concentração é 2 vezes mais tóxico no claro com iluminação de 30 KJ.m^{-2} por 10 min. Verificou-se também neste trabalho que esta toxicidade aumenta com o aumento da concentração do PDZ, com o aumento do tempo de incubação e com o aumento da dose de luz⁹⁶.

A Tabela XVI apresenta uma comparação dos valores de IC_{50} do Photodithazine e do Photogem[®] no escuro e no claro em células normais e tumorais.

Tabela XVI: Citotoxicidade no escuro e no claro do PDZ e do Photogem[®] nas linhagens VERO e HEp-2. As células foram expostas a 2h de incubação sem soro a 37°C e 5% CO_2 e, no claro, foram irradiadas por 21 min com LED em 630nm com intensidade de 25 mW.cm^{-2} (Dose = 31,5 J.cm^{-2}).

Fotossensibilizador	$\text{IC}_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1}) \pm \text{DP}$			
	VERO		HEp-2	
	Escuro	Claro	Escuro	Claro
Photodithazine	62 $\pm$ 3	2,8 $\pm$ 0,2	32 $\pm$ 4	2,3 $\pm$ 0,7
Photogem[®]	16 $\pm$ 1	7,5 $\pm$ 0,9	8,8 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,9

No escuro o Photodithazine é cerca de 3,7 vezes menos citotóxico do que o Photogem[®] tanto para as células VERO como para as células HEp-2 nas mesmas condições experimentais. Quando se compara a citotoxicidade no claro, verifica-se que o PDZ apresenta valores aproximadamente iguais de IC_{50} para as células VERO e HEp-2. Já para o Photogem[®] o IC_{50} é 60% maior na VERO do que na HEp-2. No entanto, o tempo de eliminação do PDZ

dos tecidos normais e cerca de 5h⁶⁵, sendo assim, quando o procedimento clínico de PDT é realizado, não existe mais fotossensibilizador nestes tecidos. O decréscimo do IC₅₀ no escuro em relação ao claro é de aproximadamente 94% e 59% para o PDZ e para o Photogem[®], respectivamente, o que significa que o PDZ é cerca de 1,5 vezes mais potencializado pela luz do que o Photogem[®].

Estudos realizados por Banfi et al.⁵⁶ com células tumorais de colo de útero, mostraram que o Foscan[®] (clorina) é significativamente mais citotóxico no claro do que o Photofrin[®] (derivado de hematoporfirina), ou seja, o IC₅₀ do Foscan[®] é $24,8 \pm 1,3$ e do Photofrin[®] é $73,7 \pm 8,0$ ng.mL⁻¹, sendo $p < 0,05$. Desse modo, os resultados obtidos para o PDZ e para o Photogem[®] concordam com os obtidos na literatura.

4.5.2.3 Citotoxicidade no claro do Photodithazine não irradiado e previamente irradiado em 488, 514 e 630 nm

As Tabelas XVII e XVIII apresentam a citotoxicidade no claro do Photodithazine não irradiado e previamente irradiado com laser em 488 e 514 nm e com LED em 630 nm por tempos de 0-60 min em células normais VERO e células tumorais HEp-2, respectivamente. O tempo de incubação do fotossensibilizador com as células foi de 2 h na ausência de soro e a irradiação das células foi feita com LED em 630 nm com intensidade de 25 mW.cm⁻² por 14 min.

Tabela XVII: Citotoxicidade no claro dos fotoprodutos do PDZ induzidos por irradiação em 488, 514 e 630 nm para as células VERO. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e 5% CO₂ e irradiadas com LED em 630 nm com intensidade de 25 mW.cm⁻² por 14 min.

Comprimento de onda de irradiação	488 nm (azul)	514 nm (verde)	630 nm (vermelho)	Número de Experimentos		
Tempo de irradiação (min)	IC ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)					
0	3,4 ± 0,3			8		
10	3,8 ± 0,6	3,8 ± 0,2	3,5 ± 0,1	6	5	7
20	3,4 ± 0,1	3,3 ± 0,3	2,6 ± 0,3	6	6	5
40	3,2 ± 0,4	2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,2	5	7	4
60	2,8 ± 0,2	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,4	6	5	6

Tabela XVIII: Citotoxicidade no claro dos fotoprodutos do PDZ induzidos por irradiação em 488, 514 e 630 nm para as células HEp-2. As células foram incubadas por 2 h a 37°C e 5% CO₂ e irradiadas com LED em 630 nm com intensidade de 25 mW.cm⁻² por 14 min.

Comprimento de onda de irradiação	488 nm (azul)	514 nm (verde)	630 nm (vermelho)	Número de Experimentos		
Tempo de irradiação (min)	IC ₅₀ ± DP (µg.mL ⁻¹)					
0	3,1 ± 0,7			6		
10	3,8 ± 0,3	3,4 ± 0,3	3,0 ± 0,2	4	5	5
20	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,8	2,6 ± 0,1	5	6	6
40	2,8 ± 0,2	2,2 ± 0,6	2,3 ± 0,1	5	6	4
60	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,1	5	6	6

Verifica-se nas tabelas anteriores que com o aumento do tempo de exposição prévia da solução de Photodithazine à luz a citotoxicidade no claro do fotossensibilizador aumenta para ambas linhagens. Por outro lado, os valores de IC_{50} são menores em todas as condições para as células tumorais em relação as células normais. Comparando-se a irradiação prévia do PDZ nos três comprimentos de onda, pode-se concluir que a irradiação no vermelho causa uma diminuição maior na citotoxicidade seguida da irradiação no verde e azul tanto para as células HEP-2 como para as células VERO. Nos estudos espectroscópicos observou-se que a fotodegradação e conseqüentemente formação de fotoprodutos é maior em 630nm seguida de 514 e 488nm. Desse modo pode-se concluir que nas condições de iluminação em que ocorre uma maior formação de fotoprodutos, a citotoxicidade no claro do PDZ fotodegradado aumenta. Esses resultados sugerem que os fotoprodutos do PDZ são mais citotóxicos que este fotossensibilizador sem prévia irradiação. É importante ressaltar que os fotoprodutos do Photodithazine são cerca de 18 vezes mais citotóxicos na linhagem VERO e 10 vezes mais citotóxicos nas células HEP-2 no claro em relação ao escuro.

O contrário acontece com o Photogem[®] e derivados de hematoporfirina, ou seja, seus fotoprodutos são menos citotóxicos do que Photogem[®] não irradiado^{79,80}. Os valores de IC_{50} aumentam quando o Photogem[®] é irradiado em 488 seguido de 514 e 630nm. Portanto, tanto no escuro como no claro, a citotoxicidade é menor para o Photogem[®] degradado em 630nm (comprimento de onda utilizado em PDT). Desse modo, o Photodithazine apresenta uma vantagem na aplicação em PDT já que com a irradiação ele fotodegrada e seus fotoprodutos são mais citotóxicos levando provavelmente a uma maior eficiência de morte celular e pouca ou nenhuma fotossensibilidade da pele do paciente já que é rapidamente eliminado do organismo.

Belitchenko et al.⁵⁸ estudaram a citotoxicidade na presença de luz (Dose 0,31 J.cm⁻²) do m-THPC (Foscan[®]) não irradiado e previamente irradiado em células tumorais de colo de

útero e constataram que a maior citotoxicidade foi observada na presença de corante não irradiado e esta citotoxicidade decresce em função da pré-irradiação do corante.

4.5.2.4 Efeito da intensidade de irradiação na citotoxicidade no claro do Photodithazine irradiado em 488, 514 e 630 nm

Foram realizados experimentos citotóxicos no claro com os fotoprodutos do Photodithazine obtidos a partir da irradiação com laser em 488 e 514 nm e com LED em 630 nm em diferentes intensidades ($0\text{-}500\text{ mW/cm}^2$) por 10 min. As Tabelas XIX e XX apresentam os valores de IC_{50} no claro para células normais e tumorais, respectivamente.

Tabela XIX: Valores de IC_{50} do PDZ no claro para a linhagem VERO quando o PDZ é fotodegradado laser em 488, 514 e 630nm em diferentes intensidades de irradiação. As células foram incubadas por 2h a 37°C e 5% CO_2 e irradiadas com LED em 630 nm com intensidade de 25 mW.cm^{-2} por 14 min. Número de experimentos ≥ 4 .

Comprimento de onda de irradiação	488 nm	514 nm	630 nm
Intensidade de irradiação da solução de PDZ (mW.cm^{-2})	$IC_{50} \pm DP (\mu\text{g.mL}^{-1})$		
0	$3,4 \pm 0,3$		
25	$4,2 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,3$
75	$3,3 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,3$
100	$3,2 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,1$
500	$2,9 \pm 0,1$	$2,7 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,2$

Verifica-se que a citotoxicidade do PDZ no claro aumenta (aproximadamente 1,3 vezes) com o aumento da intensidade de irradiação. Não se observa uma diferença

significativa ($p > 0,05$) nos valores de IC_{50} quando se compara a citotoxicidade dos fotoprodutos formados pela irradiação nos três comprimentos de onda.

Tabela XX: Valores de IC_{50} do PDZ no claro para a linhagem HEp-2 quando o PDZ é fotodegradado em 488, 514 e 630nm em diferentes intensidades de irradiação. As células foram incubadas por 2h a 37°C e 5% CO_2 e irradiadas com LED em 630 nm com intensidade de 25 $mW.cm^{-2}$ por 14 min. Número de experimentos ≥ 4 .

Comprimento de onda de irradiação	488 nm	514 nm	630 nm
Intensidade de irradiação da solução de PDZ ($mW.cm^{-2}$)	$IC_{50} \pm DP (\mu g.mL^{-1})$		
0	$3,1 \pm 0,7$		
25	$2,7 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$
75	$2,4 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$
100	$2,3 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$
500	$2,0 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,3$

Assim como para as células normais, é observado para as células tumorais que quando a solução do fotossensibilizador é exposta a diferentes intensidades de irradiação em 488, 514 e 630nm, sua citotoxicidade é maior do que o PDZ intacto (ou seja, não irradiado previamente), isto significa que os fotoprodutos matam um maior número de células tumorais. Por exemplo, quando se acompanha o índice de sobrevivência das células HEp-2 expostas a 8 $\mu g.mL^{-1}$ do Photodithazine não irradiado ou previamente irradiado com intensidade de 500 $mW.cm^{-2}$, tem-se a morte de 72 e 91% das células, respectivamente.

V. CONCLUSÕES

A partir dos resultados e discussões apresentados conclui-se que o PDZ é um fotossensibilizador com grande potencial para ser usado em PDT.

Os experimentos espectroscópicos realizados com o PDZ mostraram que sua irradiação prévia causa diminuição nas intensidades de absorção e fluorescência bem como a formação de uma nova banda de absorção em 668nm atribuída aos fotoprodutos. Tanto a fotodegradação como a formação de fotoprodutos dependem da concentração do PDZ, da intensidade de irradiação, do pH da solução e do meio em que o PDZ se encontra (presença de surfactantes). Verificou-se também que o estado de agregação do PDZ depende do pH e que em soluções ácidas este fotossensibilizador apresenta-se agregado. A partir dos estudos da fotodegradação do PDZ na presença de azida ou manitol pode-se concluir que a fotodegradação ocorre pelo mecanismo tipo II, ou seja, via formação de oxigênio singlete.

Além do PDZ ser eliminado do organismo em tempo menor, o que diminui o efeito indesejado da fotossensibilidade da pele, o PDZ apresenta algumas vantagens sobre o Photogem[®] (fotossensibilizador aprovado para uso em PDT no Brasil), como absorver em comprimento de onda maior do que o Photogem[®] onde a penetração da luz nos tecidos é maior, não apresentar agregação numa ampla faixa de concentração e fotodegradar em tempo menor do que o Photogem[®] o que permite menor tempo de irradiação no tratamento de PDT.

Quanto à citotoxicidade o PDZ também apresenta duas importantes vantagens sobre o Photogem[®]: é menos citotóxico no escuro para células normais e tumorais e mais citotóxico no claro para ambas linhagens.

Os resultados mostraram também que as células tumorais são mais afetadas pela PDT com PDZ do que as células normais, provavelmente porque captam quantidade maior de

fotossensibilizador. Além disso, no estudo do efeito do tempo de incubação e tempo de irradiação concluiu-se que o efeito final na citotoxicidade é mais dependente do tempo de irradiação do que do tempo de incubação.

Resultados interessantes também foram obtidos quando se investigou a citotoxicidade dos fotoprodutos do PDZ. Verificou-se que os fotoprodutos formados após a irradiação do PDZ são menos citotóxicos no escuro (2,2 vezes) do que o PDZ não irradiado e cerca de 18 vezes mais citotóxicos na linhagem VERO e 10 vezes mais citotóxico na linhagem HEp-2 no claro. Estes resultados sugerem que o Photodithazine previamente irradiado é mais eficiente em PDT do que o Photodithazine e melhor ainda do que o Photogem[®] não irradiado ou irradiado, já que os fotoprodutos do Photogem[®] são menos citotóxicos no escuro e no claro.

Desse modo este trabalho reforça que o PDZ obedece a exigências importantes que o coloca como fotossensibilizador em potencial para uso em PDT e também sugere o uso em PDT dos fotoprodutos obtidos após irradiação de uma solução de PDZ, ou seja, a aplicação do PDZ fotodegradado, já que o PDZ fotodegrada rapidamente e que os fotoprodutos são menos citotóxicos no escuro e mais citotóxicos no claro. O uso do Photodithazine fotodegradado em pacientes é uma possibilidade real e que já vem sendo testada em alguns países.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRYAN, G.T. Histórias Naturais dos Cânceres. **Manual de oncologia clínica**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 28-31.
2. FERLITO, A. The natural history of early vocal cord cancer. **Acta Otolaryngol**, v. 115, n. 2, p. 345–347, 1995.
3. KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982.
4. RUDDON, R. W. **Cancer Biology**. New York: Oxford University, 1995. p. 520.
5. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Disponível em:
<<http://www.inca.org.br/epidemiologia/cancernoBrasil.html>>. Acesso em: 23 jan. 2006.
6. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO CÂNCER. Disponível em:
<<http://www.abcancer.org.br>>. Acesso em: 08 dez. 2005.
7. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. Câncer: tabagismo. Disponível em:
<<http://www.inca.org.br>>. Acesso em: 23 jan. 2006.
8. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer of the larynx: treatment options: chemotrerapy. Disponível em:
<http://www.cancernet.nci.nih.gov/wyntk_pubs/larynx.htm>. Acesso em: 23 jan. 2006.
9. NATIONAL CANCER INSTITUTE. Cancer of the larynx: glossary. Disponível em:
<http://www.cancernet.nci.nih.gov/wyntk_pubs/larynx.htm>. Acesso em: 23 jan. 2006.
10. FEIGL, D.M.; HILL, J.W.; BOSCHMANN, E. **Foundations of life**. New York: MacMillan, 1992. p. 609.
11. JOESTEN, M.D.; WOOD, J.L. **World of Chemistry**. Fort Worth: Sounders College, 1996. p. 731.
12. GRINGAUZ, A. **Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why**. New York: VCH, 1997. p. 520.
13. ROSA, F.S.; BENTLEY, M.V.L.B. Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives. **Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 12, p. 1447-1455, 2000.
14. SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.
15. HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy works? **Photochemistry and Photobiology**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

16. PHILLIPS, D. The photochemistry of sensitizers for photodynamic therapy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 117-126, 1995.
17. CENTRE FOR PHOTOBIOLOGY AND PHOTODYNAMIC THERAPY. Disponível em: <www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/>. Acesso em: 25 jan. 2006.
18. COLUSSI, V.C. **Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos**. 1997. 100f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
19. BONNET, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, p. 19-33, 1995.
20. RAAB, O. Über die Wirkung Fluoreszierenden Stoffen. **Infusoria Zeitschrift Biologic**, v. 39, p. 524-526, 1900.
21. LASER IN MEDICAL RESARCH FOUNDATION. Disponível em <<http://www.209.41.235.5/pdt@lrmf>>. Acesso em: 12 dez. 2005.
22. SCHWARZ, S.; ABSOLON, K.; VERMUD, H. Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. **Bull Minnesota University School Medicine**, v. 27, p. 7-23, 1955.
23. BICKERS, D. R. Photoradiation diagnosis and therapy: dermatologic and photobiologic aspects. **Investigative Radiology**, v. 21, n. 11, p. 885-890, 1986.
24. LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; GRAY, M.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of câncer. **Cancer**, v. 20, n. 12, p. 2255-2258, 1967.
25. MACHADO, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.
26. STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, p. 4151-4202, 1998.
27. MITCHELL, J.B.; MORSTYN, G. KAYE, A.H. **Phototherapy of Cancer**. Chur: Harwood Academic, 1990. p. 1-22.
28. ZEZELL, D.M. **Processos para monitoração e otimização da terapia fotodinâmica de tumores**. 1991. Tese (Doutorado) – Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
29. NERI, C.R.; PRADO, A.P.J.M.; RIBEIRO, A.O.; SERRA, O.A.; IAMAMOTO, Y. Determination of the photodynamic activity of porphyrins: potential photosensitizers for treatment of age-related macular degeneration. **Materials Science**, v. 20, n. 2, p. 69-75, 2002.

30. SCHUITMAKER, J.J.; BOAS, P.; VAN LEENGOLD, H.L.L.M.; VAN DEN MEULEN, F.N., STAR, W.M., VAN ZANDWIJK, N. Photodynamic Therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 34, p. 3-12, 1996.
31. HANDJUR, C.; RICHARD, M.J.; PARAT, M.O.; FAVIER, A.; JARDON, P. Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cell line MRC5. **Journal of Photochemistry and Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 27, p.139-146, 1995.
32. PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microorganismos. **Química Nova**, submetido, 2006.
33. COLUSSI, V.C.; NICOLA, E. M.D; NICOLA, J.H.I. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns Fotossensibilizadores. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 42, n. 4, p. 229-236, 1996.
34. VANDENBERGH, H. Light and porphyrins in cancer therapy. **Chemistry in Britain**, v. 22, n. 5, p. 430-434, 1986.
35. CHEMKEYS, o seu site de química. Disponível em:
<http://www.chemkeys.com/bra/md/ede_5/edl_14/eede_25/eede_25.htm>. Acesso em: 26 jan. 2006.
36. TESES e dissertações. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-01022002-114630/publico/15>>. Acesso em: 26 jan. de 2006.
37. BROWN, S.B.; TRUSCOTT, T.G. New light on cancer therapy. **Chemistry in Britain**, v. 29, p. 955-958, 1993.
38. FOOTE, C.S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, p. 659, 1991.
39. STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D. Second generation photodynamic agents: a review. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 11, n. 5, p. 233-241, 1993.
40. CHATTERJEE, S.R.; SRIVASTAVA, T.S.; KAMAT, J.P.; DEVASAGAYAN, T.P.A. Lipid peroxidation induced by a novel porphyrin plus light in isolated mitochondria: possible implications in photodynamic therapy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 166, p. 25-33, 1997.
41. PARKER, J. P.; STANBRO, W. D. Optical determination of the collisional lifetime of singlet molecular oxygen[O₂(1- δ -G)] in acetone and deuterated acetone. **Journal American Chemistry Society**, v. 104, n. 7, p. 2067-2069, 1982.

42. FOOTE, C.S. Photo-oxidation and toxicity. **Abstracts of papers of the American Chemistry Society**, v. 176, p. 157-157, 1978.
43. HOWE, L.; ZHANG, J. Z. The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution. **Photochemistry and Photobiology**, v. 67, n. 1, p. 90-96, 1998.
44. DOUGHERTY, T.J.; GOMER, C.J.; HENDERSON, B.W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KOBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Review: photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
45. CUNDERLIKOVÁ, B.; KONGSHAUG, M.; GANGESKAR, L.; MOAN, J. Increased binding of chlorin e₆ to lipoproteins at low pH values. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 32, p. 759-768, 2000.
46. POTTIER, R.; KENNEDY, J.C. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 8, p. 1-16, 1990.
47. HAMBLIN, M.R.; NEWMAN, E.L. On the mechanism of the tumor-localising effect in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 23, p. 3-8, 1994.
48. CUNDERLIKOVÁ, B.; GANGESKAR, L.; MOAN, J. Acid-base properties of chlorin e₆: relation to cellular uptake. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 53, p. 81-90, 1999.
49. PASS, H.I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 6, p. 443-456, 1993.
50. TOMINAGA, T.T. **Estudos espectroscópicos de porfirinas aquo-solúveis em função do pH e da interação com albumina de soro bovino**. 1997. 148f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
51. MIRANOV, A.F.; NIZHNIC, A. Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 4, p. 297-306, 1990.
52. DOUGHERTY, T.J.; GRINDEY, G.B.; FIEL, R.; WEISHAUP, R.; BOYLE, D.G. Photoradiation therapy II. Cure of animal tumours with hematoporphyrin and light. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 55, n. 1, p. 115-121, 1975.

53. CHATTERJEE, S.R.; POSSEL, H.; SRIVASTAVA, T.S.; KAMAT, J.P.; WOLF, G; DEVASAGAYANM, T.P.A. Photodynamic effects induced by meso-tetrakis[4-(carboxymethyleneoxy)phenyl] porphyrin on isolated sarcoma 180 ascites mitochondria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 50, p. 79-87, 1999.
54. SPIKES J.D. Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 6, p. 259-274, 1990.
55. CARVALHO, V. C. M. **Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer**. 2001. 91f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
56. BANFI, S.; CARUSO, E.; CAPRIOLI, S.; MAZZAGATTI, L.; CANTI, G.; RAVIZZA, R.; GARIBOLDI, M.; MONTI, E. Photodynamic effects of porphyrin and chlorin photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4853-4860, 2004.
57. TEITEN, M. H.; BEZDETNYA, L.; MERLIN, J. L.; BOUR-DILL, C.; PAULY, M. E.; DICATO, M.; GUILLEMIN, F. Effect of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC)-mediated photodynamic therapy on sensitive and multidrug-resistant human breast cancer cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 62, n. 3, p. 146-152, 2001.
58. BELITCHENKO, I.; MELNIKOVA, V.; BEZDETNYA, L.; REZZOUG, H.; MERLIN, J. L.; POTAPENKO, A.; GUILLEMIN, F. Characterization of photodegradation of meta-tetra (hydroxyphenyl)chlorine (mTHPC) in solution: biological consequences in human tumor cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 67, n. 5, p. 584-590, 1998.
59. D'CRUZ, A. K.; ROBINSON, M. H.; BIEL, M. A. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. **Head and Neck Cancer**, v. 26, n. 3, p. 232-240, 2004.
60. KENNEDY, J.C.; POTTIER, R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 14, p. 275-92, 1992.
61. BONNETT, R., MARTÍNEZ, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9517-9547, 2001.

62. RESHETNICKOV, A.V.; PONOMAREV, G.V.; ABAKUMOVA O.Y.; TSVETKOVA, T.A.; KARMENYAN, A.V.; REBEKO, A.G.; BAUM, R.P. Novel drug form of chlorin E₆. In: OPTICAL METHODS FOR TUMOR TREATMENT AND DETECTION: MECHANISMS AND TECHNIQUES IN PHOTODYNAMIC THERAPY, 9. **Proceedings of SPIE**, v. 3909, p. 124-130, 2000.
63. KEAM, S.J.; SCOTT, L.J.; CURRAN, M.P. A review of its use in the management of subfoveal choroidal neovascularisation. **Drugs**, v. 63, n. 22, p. 2521-2554, 2003.
64. STRANADKO, E.PH.; PONOMAREV, G.V.; MECHKOV, V.M.; RIABOV, M.V.; IVANOV A.V.; RESHETNIKOV, A.V.; KORABOYEV, U..M. The first experience of Photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors. In: OPTICAL METHODS FOR TUMOR TREATMENT AND DETECTION: MECHANISMS AND TECHNIQUES IN PHOTODYNAMIC THERAPY, 9. **Proceedings of SPIE**, v. 3909, p. 138-144, 2000.
65. IVANOV, A.V.; RESHETNICKOV, A.V.; PONOMAREV, G.V. One more PDT application of chlorin E₆. **Proceedings of SPIE**, v. 3909, p. 131-137, 2000.
66. PROGRAMA ECUC@R. Disponível em:
<<http://educar.sc.usp.br/licenciatura/2001/laser/favorite.htm>>. Acesso em: 02 fev. 2006.
67. CIBA FOUNDATION. **Photosensitizing compounds**: their chemistry, biology and clinical use. Chichester: John Willey, 1989. 241p.
68. 3M BRASIL. Disponível em: <<http://www.3mespe.com.br/new/catalogos/elipar.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2005.
69. BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching studies on azabenzoporphyrins and related systems: a comparison of the photobleaching of the zinc (II) complexes of the tetrabenzoporphyrin, 5-azadibenzo(b, g) porphyrin and phthalocyanine systems. **Journal Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 4, p. 544-550, 2000.
70. BONNETT, R.; DJELAL, B.D.; HAMILTON, P.A.; MARTINEZ, G. WIERRANI, F. Photobleaching of 5, 10, 15, 20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 53, p. 136-143, 1999.
71. ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformations of sensitizers. 1. Significance of nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 39, p. 167-171, 1997.

72. ROTOMSKIS, R.; BAGDONAS, S. STRECKYTE, G.; WENDENBURG, R.; DIETEL, W.; DIDZIAPETRIENE, J.; IBELHAUPTAITE, A.; STACIOKIENE, L. Phototransformation of sensitizers 3. Implications for clinical dosimetry. **Lasers in Medical Science**, v. 13, p. 271-278, 1998.
73. ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformation of sensitizers 2. Photoproducts formed in aqueous solution of porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 39, p. 172-175, 1997.
74. ROTOMSKIS, R.; BAGDONAS, S.; STRECKYTE, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumor therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 33, p. 61-67, 1996.
75. STRATIBBUJIVM, A.A.; MEEROVICH, G.A.; LOSCHENOV, V.B. Photobleaching of photosensitizers applied for photodynamic therapy. **Proceedings of SPIE**, v. 3909, 2000.
76. HADJUR, C.; LANGE, N.; REBSTEIN, J.; MONNIER, P.; VANDENBERG, H.; WAGNIERES, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta (tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 45, p. 170-178, 1998.
77. STRECKYTE, G.; ROTOMSKIS, R. Phototransformations of porphyrins in aqueous and micellar media. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 18, p. 259-263, 1993.
78. DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.
79. MOAN, J.; RIMINGTON, C.; MALIK, ZVI. Photoinduced degradation and modification of Photofrin II in cells in vitro. **Photochemistry and Photobiology**, v. 47, p. 363-367, 1988.
80. MENEZES, P.F.C; MELO, C.A.S.; BAGNATO, V.S; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct of the photosensitizer Photogem during intense illumination. **Laser Physics**, v. 14, n. 9, p. 1-5, 2004.
81. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION: Cell lines. Disponível em: <www.atcc.org> Acesso em: 22 mar. 2005.
82. FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. New York: Wiley-Liss, 2000.

83. PERCZEL A.; PARK, K.; FASMAN, G.D. Analysis of the circular-dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm – a practical guide. **Analytical Biochemistry**, v. 203, n. 1, p. 83-93, 1992.
84. CHOU, T.C. and HAYBALL, M. **CalcuSyn**: Windows software for dose effect analysis. Cambridge: Biosoft, 1996.
85. KALYANASUNDARAM, K. **Photochemistry of polypyridine an porphyrin complexes**. New York: Academic Press, 1992.
86. DAZIANO, J. P.; STEENKEN, S.; CHABANNON, C. et al. Photophysical and redox properties of a series of phthalocyanines: Relation with their photodynamic activities on TF-1 and Daudi leukemic cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n. 4, p. 712-719, 1996.
87. CROUCH, A. M.; LANGFORD, C.H. Photophysical behavior of zinc tetraphenylporphyrins in solutions and polymer-films. **Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 55-64, 1990.
88. MOAN, J. Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. **Cancer Letters**, v. 33, p. 45-53, 1986.
89. SANTIAGO, P. S. **Estudos espectroscópicos da interação de porfirinas catiônicas com modelos de membrana biológica**. 2004. 145f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
90. FERREIRA, J; KURACHI, C.; MORIYAMA, L.T.; MENEZES, P.F.C.; PERUSSI, J.R.; SIBATA, C.; ZUCOLOTO, S.; SILVA, O.C.; BAGNATO, V.S. Correlation between the photostability and photodynamic efficacy for different photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 3, n. 2, p. 91-95, 2006.
91. KHAIRUTDINOV, R.F.; SERPONE, N. Laser-induced light attenuation in solutions of porphyrin aggregates. **Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 31, p. 11952-11958, 1995.
92. CUNDERLIKOVA, B.; BJORKLUND, E.G.; PETTERSEN, E. O.; MOAN, J. pH-dependent spectral properties of HpIX, TPPS2a, mTHPP and mTHPC. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 2, p. 246-52, 2001.
93. FRIBERG, E.G.; CUNDERLIKOVA, B.; PETTERSEN, E.O.; MOAN, J. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. **Cancer Letters**, v. 195, n. 1, p. 73-80, 2003.

94. SPIKES, J.D.; BOMMER, J.C. Photobleaching of mono-L-aspartyl chlorin e_6 (NPE6) – a candidate sensitizer for the Photodynamic Therapy of tumors. *Photochemistry and Photobiology*, v. 58, n. 3, p. 346-350, 1993.
95. ERICSON, M.R.; GRAPENGIESSER, S.; GUDMUNDSON, F.; WENNERBERG, A-M.; LARKO, O.; MOAN, J.; ROSEN, A. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution. **Laser Medical Science**, v. 18, p. 56-62, 2003.
96. STRAKHOVSKAYA, M.G.; PARKHOMENKO, I.M.; RUMBAL, Ya.V.; ZARUBINA, A.P.; DANILOV, V.S.; STRANADKO, E.F. Photoquenching of the bioluminescence of the genetically engineered *Escherichia coli* TG1 (pXen7) strain in the presence of Photodithazine. **Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 294-297, 2002.
97. MOAN, J. Photoproducts formed from Photofrin II in cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology**, v. 1, p. 429-436, 1988.
98. DAGHASTANLI, N.A.; DEGTEREV, I.A.; TEDESCO, A.C.; BORISEVICH, I.E. Photocytotoxicity of a 5-nitrofuranyl-ethenyl-quinoline antiseptic (Quinifuryl) to P388 mouse leukemia cells. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 37, p. 1873-1879, 2004.