UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

***ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CITOTÓXICOS DO
PHOTOGEN[®] FOTODEGRADADO E DOS FOTOPRODUTOS
FORMADOS PELA IRRADIAÇÃO COM LASER***

PRISCILA FERNANDA CAMPOS DE MENEZES

São Carlos

2006

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

***ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E CITOTÓXICOS DO
PHOTOGEN[®] FOTODEGRADADO E DOS FOTOPRODUTOS
FORMADOS PELA IRRADIAÇÃO COM LASER***

Priscila Fernanda Campos de Menezes

**Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo como
requisito para obtenção do título
de Doutor em Ciências (Química
Analítica).**

Orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos

2006

“A mais bela experiência que podemos ter é a do mistério. É a emoção fundamental existente na origem da verdadeira arte e ciência. Aquele que não a conhece e não pode se maravilhar com ela está praticamente morto e seus olhos estão ofuscados.”

(Albert Einstein)

Dedicatória

Aos meus pais Alberto A. Menezes e Leila M. Campos de Menezes, aos meus avós José Barros e Maria de Lourdes Barros e Maria Mariana de Menezes, aos meus irmãos Rodolfo e Ricardo e ao meu noivo Tiago Broggio Arré.

Agradeço a todos vocês por sempre acreditarem em mim me encorajando a nunca desistir de meus propósitos, deste modo todos os problemas pelos quais enfrentei tornaram-se pequenos diante do apoio incondicional e da compreensão e carinho de vocês.

De acordo com Albert Einstein “A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”. Desta simples e objetiva frase posso dizer que vocês me deram asas para a imaginação, acreditando e apostando sempre em todas as minhas idéias científicas me encorajando a nunca desistir por mais absurdas que fossem principalmente porque as coisas mais importantes na vida são as mais difíceis de se realizarem.

Entre todos os meus propósitos sonhados, hoje realizo um deles com a ajuda de vocês. O meu muito obrigado a todos vocês que se fizeram presentes em todos os momentos da minha vida. Esta Tese de Doutorado é o resultado de muito esforço e coragem como também do desejo de provar a vocês que valeu a pena acreditar em mim!!!! Amo vocês!!!!!!!!!!!!

Agradecimentos

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura Celular:

Cláudia Bernal, Renato, Juliana Camilo e Valéria Carvalho (*in memorian*).

Aos meus amigos do Laboratório de Biofísica:

Patrícia, Marilene, Alessandra, Shirley, Leonardo, Julio, Marco, Aline.

Aos meus amigos do Laboratório de Biofotônica:

Cláudia Melo, Cristina Kurachi, Juliana Ferreira, Lílían Tan Moriyama, José Dirceu, Emery, Clóvis.

Aos meus amigos do Instituto de Química e Física de São Carlos.

Agradeço pela amizade, carinho e disponibilidade em sempre me ajudar.

Enfim a todos os meus amigos, que de uma forma ou de outra sempre participaram da minha vida e estiveram presentes em todos os momentos, difíceis ou fáceis, sempre me encorajando a nunca desistir e sim lutar para dar o melhor de mim mesmo.

Ao Instituto de Química de São Carlos-USP, Grupo de Fotossensibilizadores;

Que me acolheu e me proporcionou toda a estrutura necessária para o desenvolvimento do meu projeto de pesquisa.

Ao Instituto de Física de São Carlos-USP, Grupo de Ótica;

Onde realizei a maior parte dos meus experimentos de fotodegradação, e experimentos *in vivo*.

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Dep. de Patologia da FMRP;

Que me forneceu animais para os experimentos *in vivo* como também preparou as lâminas com os cortes histológicos.

A FAPESP pela bolsa de Mestrado e depois de Doutorado Direto.

Aos funcionários do Instituto de Química e Física de São Carlos;

Sempre prontos a me ajudar

Agradecimentos Especiais

**Aos meus pais Alberto A. Menezes e Leila M. Campos de Menezes;
Aos meus avós José Barros e Maria de Lourdes Barros e Maria Mariana de
Menezes;**

Aos meus irmãos Rodolfo e Ricardo;

À minhas cunhadas Consuelo Garrido e Carolina Lara;

Ao meu noivo Tiago Broggio Arré;

Por todo amor, carinho, compreensão e respeito.

Amo muito vocês!!!

A Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi, que me acolheu em seu laboratório,
apostando e acreditando em mim.

Obrigada pela oportunidade de realizar este projeto de pesquisa!! Você nestes 5 anos de pesquisa, foi amiga e mãe, estando sempre disposta a me mostrar o melhor caminho a seguir e sempre torcendo pelo meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Vanderlei S. Bagnato por trabalhar em colaboração neste projeto,
sempre dando novas idéias e sempre 24h disposto a ajudar.

Obrigado pela amizade, respeito e carinho!!!!!! Você nestes 5 anos também foi
amigo e pai, sempre me encorajando e me apoiando.

Ao Prof. Dr. Hidetake Imasato, pelas horas incalculáveis em discussão em
artigos e nesta Tese, estando sempre pronto a me ajudar.

A minha amiga Patrícia, sempre disposta a me ajudar.

Aos professores da Banca examinadora: Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco, Prof. Dr. Fergus Gessner, Prof. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo e Prof. Dra. Leila Maria Beltramini.

Obrigada pela contribuição nesta Tese de Doutorado!!!

SUMÁRIO

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvi
 I. INTRODUÇÃO	1
1.1 CRESCIMENTO, DIFERENCIAÇÃO CELULAR E O CÂNCER.	1
1.1.1 CICLO CELULAR.....	2
1.1.2 CÂNCER	3
1.1.3 CÂNCER DE LARINGE.....	6
1.2 TERAPIAS UTILIZADAS NO COMBATE AO CÂNCER	7
1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA	11
1.3.2. PROCESSOS FOTOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA	15
1.3.3 CAMINHOS DA TFD PARA A DESTRUIÇÃO TUMORAL.....	17
1.4 DISTRIBUIÇÃO PREFERENCIAL DOS FOTOSSENSIBILIZADORES	18
1.5 FOTOSSENSIBILIZADORES	19
1.5.1 PORFIRINAS.....	19
1.5.2 FOTOSSENSIBILIZADORES DE PRIMEIRA GERAÇÃO	21
1.5.3 FOTOSSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GERAÇÃO	23
1.5.3.1 Ftalocianinas e Naftalocianinas.....	23
1.5.3.2 Clorinas e Bacterioclorinas	23
1.5.3.3 Purpurinas	25
1.5.4 ACIDO AMINOLEVULÍNICO (ALA)	25
1.6 TRANSPORTE E LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DOS FS	27
1.7 INTERAÇÃO DA LUZ COM O TECIDO.....	29
1.8 FOTODEGRADAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES.....	30
1.8.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO NOS PROCESSOS DE FOTODEGRADAÇÃO E FORMAÇÃO DE FOTOPRODUTOS.....	34
 I. OBJETIVOS.....	44
 III. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 FOTOSSENSIBILIZADOR	45
3.2 LINHAGENS CELULARES.....	45
3.3 CULTIVO CELULAR	45
3.3.1 SUBCULTIVO.....	45

3.3.3 CONTAGEM DAS CÉLULAS	46
3.3.4 ESTOCAGEM DAS CÉLULAS	47
3.3.5 CONGELAMENTO DE CÉLULAS	47
3.3.6 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS	47
3.4 SISTEMA DE IRRADIAÇÃO	48
3.6 TRATAMENTO FOTODINÂMICO	49
3.6.1 IRRADIAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR	49
3.6.2 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DO PHOTOGEN [®]	50
3.6.2.1 Medida de Absorção Ótica	50
3.6.2.2 Medida de Fluorescência	50
3.6.3 EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE	51
3.6.3.1 Estocagem do fotossensibilizador	51
3.6.3.2 Ensaio de viabilidade celular para as células epiteliais - VERO e HEP-2	51
3.6.4 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS	52
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DO PHOTOGEN[®]	55
4.1.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO ÓTICA	55
4.1.1.2 Espectro de absorção ótica em função da concentração	55
4.1.2 ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA	57
4.2 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN[®]	57
4.2.1 EFEITO DO $\lambda_{IRRADIAÇÃO}$ NA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN [®]	57
Para a análise do efeito da concentração nos processos de degradação e formação de fotoprodutos, a tabela 6 resume os resultados para Photogen [®] 20 e 40 µg/mL degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 50mW/cm ²	67
4.2.2 ESTUDO DA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN [®] NO UV-VIS	71
4.2.2.1 Propriedades espectrais do Photogen [®] degradado no ultravioleta	71
4.2.2.2 Propriedades espectrais do Photogen [®] degradado no verde (514nm)	74
4.2.2.2.1 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogen [®]	74
4.2.3 EFEITO DA POTÊNCIA ELEVADA NA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN [®]	78
4.2.3.1 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogen [®] 50µg/mL degradado em 514nm	78
4.2.3.2 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogen [®] 25µg/mL	80
4.2.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO PHOTOGEN [®] APÓS DEGRADAÇÃO INDUZIDA	86
4.2.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE PHOTOGEN [®] NA FOTODEGRADAÇÃO	87
4.2.6 EFEITO DO MEIO NA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN [®]	89
4.2.6.1 Espectro de absorção ótica	89
4.2.6.2 Espectro de Fluorescência	97
RESULTADOS CITOTÓXICOS	103
4.3 ESTUDOS CITOTÓXICOS NO ESCURO DO PHOTOGEN [®]	103
4.3.1 CITOTOXICIDADE NO ESCURO DO PHOTOGEN [®] E SEUS FOTOPRODUTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO PRÉVIA	103
4.3.2 CITOTOXICIDADE NO ESCURO DO PHOTOGEN [®] E SEUS FOTOPRODUTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO	107
4.4 ESTUDOS CITOTÓXICOS DO PHOTOGEN[®] NO CLARO	110
4.4.1 EFEITO DA LUZ EM CULTURAS DE CÉLULAS	110
4.4.2 COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE DO PHOTOGEN [®] E DE SEUS FOTOPRODUTOS (OBTIDOS NA IRRADIAÇÃO EM 514nm) EM CULTURA DE CÉLULAS EM DIFERENTES DOSES DE IRRADIAÇÃO	113
4.4.2.1 Citotoxicidade e Fotocitotoxicidade do Photogen [®] em cultura de células em diferentes doses de irradiação	113
4.4.2.2 Citotoxicidade e Fotocitotoxicidade dos Fotoprodutos do Photogen [®] em cultura de células em diferentes doses de irradiação	115

4.4.3 CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE DO PHOTOGEN [®] E DE SEUS FOTOPRODUTOS (OBTIDOS NA IRRADIAÇÃO PRÉVIA EM 488, 514 e 630nm) EM CULTURA DE CÉLULAS.....	118
4.4.3.1 Citotoxicidade e Fotocitotoxicidade do Photogen [®] e seus fotoprodutos em cultura de células.....	118
4.4.3.2 Citotoxicidade e Fotocitotoxicidade do Photogen [®] e seus fotoprodutos em cultura de células em função do tempo de incubação.	121
4.4.4 COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE DO PHOTOGEN [®] E SEUS FOTOPRODUTOS EM CULTURA DE CÉLULAS EM FUNCAO DO TEMPO DE IRRADIACAO PRÉVIA EM 630nm.....	123
4.4.5 COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE DO PHOTOGEN [®] NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SORO.....	125
4.5 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS	127
 V. CONCLUSÕES.....	 138
 IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo celular esquemático do tumor de um mamífero.....	3
Figura 2: Esquema ilustrativo da evolução hipotética de células não tumorais para malignas A-D.....	5
Figura 3: Efeito da irradiação da luz no fotossensibilizador dentro das células.....	13
Figura 4: Terapia Fotodinâmica: a) Paciente com tumor recebendo diferentes fotossensibilizadores intravenoso; b) FS localizado no tumor após um certo tempo; c) tumor sendo irradiado por luz visível de λ adequado; d) desaparecimento do tumor.....	13
Figura 5: Estrutura básica das porfirinas.....	20
Figura 6: Estrutura básica do heme.....	21
Figura 7: Estrutura monomérica do Photogem®	22
Figura 8 – Estruturas químicas dos FS: (a) Photofrin®; (b) ftalocianina; (c) Foscan®; (d) N-aspartilclorina e ₆ MACE; (e) Radaclorina®; (f) purpurina; g) Visudyne® (derivado de benzoporfirina); h) Photoditazine®; i) ALA e Protoporfirina IX.....	27
Figura 9: Representação esquemática do sistema de transporte e localização dos FS e os principais alvos fotodinâmicos dos tumores <i>in vivo</i>	29
Figura 10: Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração de luz de diferentes comprimentos de onda.....	30
Figura 11: Tipos de agregados formados pelos FS derivados de hematoporfirina	39
Figura 12: Esquema das possíveis fototransformações de Hp.....	41
Figura 13: Esquema dos possíveis fotoprodutos das porfirinas em soluções aquosas.....	42
Figura 14: Esquema ilustrativo dos sistemas de irradiação utilizados nos experimentos em solução, citotóxicos e em animais. A: Laser de íon argônio e Laser de corante bombeado pelo laser de argônio, B) Laser de diodo em 630nm. C) Dispositivo a base de LED.....	49
Figura 15: Esquema ilustrativo do procedimento de irradiação do fotossensibilizador Photogem® com laser de íon argônio em 514nm.....	50
Figura 16: Esquema ilustrativo do procedimento de irradiação com LED em 630nm do fotossensibilizador Photogem® em cultura celular.....	52
Figura 17: Esquema ilustrativo da detecção do FS no fígado por espectroscopia de fluorescência e a irradiação do fígado respectivamente, com laser de diodo em 630nm.....	54
Figura 18: Espectro de absorção ótica do Photogem® na concentração 50µg/ml, em PBS, pH 7,4 e c=0,2cm.....	55

Figura 19: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] em PBS em concentrações variando de 1,25-100µg/mL em pH 7,4, c=0,2cm.....	56
Figura 20: Absorbância do Photogem [®] em PBS na banda de Soret (369nm) em função da concentração de Photogem [®]	56
Figura 21: Espectro de emissão de uma solução de Photogem [®] 50µg/mL em PBS, pH 7,4, c=0,2cm, $\lambda_{exc}=507nm$	57
Figura 22: Espectros de absorção ótica de uma solução de Photogem [®] 40µg/mL em PBS, pH=7,4, c=0,5, fotodegradado com laser de argônio em 488 (A) e 514nm (B) e em laser de corante bombeado pelo laser de argônio em 630nm (C) com tempos de irradiação de 0-120min, $I=50mW/cm^2$, (Dose de irradiação de 0-360J/cm ²).....	58
Figura 23: Variação na absorbância do Photogem [®] 40µg/mL em 369nm e 640nm em função do tempo de irradiação (0-120 min) com laser de argônio em 488 (A), 514nm (B) e laser de corante bombeado por laser de argônio em 630nm (C).....	59
Figura 24: Espectros de fluorescência para Photogem [®] 40µg/mL em PBS (pH=7,4) fotodegradado com laser de argônio em 488 e 514nm (A e B) e com laser de corante bombeado pelo laser de argônio em 630nm (C) com tempos de irradiação de 0-120min, $I=50mW/cm^2$, (Dose de irradiação de 0-360J/cm ²). $\lambda_{exc}=507nm$, c=0,5cm.....	64
Figura 25: Dependência da intensidade de fluorescência do Photogem [®] 40µg/mL em 672nm e do fotoproduto em 636nm formado após irradiação em 488 (A) e 514nm (B) por 120min em função da fluorescência do Photogem [®] em 611nm para cada tempo de irradiação.....	65
Figura 26: Nos gráficos A, B, e C observamos os espectros de absorção ótica de uma solução de Photogem [®] 20µg/mL em PBS, pH=7,4, c=0,5, fotodegradado com laser de argônio em 488 (A) e 514nm (B) e em laser de corante bombeado pelo laser de argônio em 630nm (C) com tempos de irradiação de 0-120min, $I=50mW/cm^2$, (Dose de irradiação de 0-360J/cm ²).....	66
Figura 27: Espectros de fluorescência para Photogem [®] 20µg/mL em PBS (pH=7,4) fotodegradado com laser de argônio em 488 e 514nm (A e B) e laser de corante bombeado pelo laser de argônio em 630nm (C) com tempos de irradiação de 0-120min, $I=50mW/cm^2$, (Dose de irradiação de 0-360J/cm ²). $\lambda_{exc}=507nm$, c=0,5cm.....	69
Figura 28: Dependência da intensidade de fluorescência do Photogem [®] 20µg/mL em 672nm e do fotoproduto em 636nm formado após irradiação em 488 (A) e 514nm (B) por 120min em função da fluorescência do Photogem [®] em 611nm para cada tempo de irradiação.....	70

Figura 29: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 351nm, com tempo de irradiação variando de 0-180min, I=150mW/cm ² (Dose de irradiação de 0-1620J/cm ²), c=0,5cm.....	71
Figura 30: Espectros de fluorescência do Photogem [®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 351nm, com tempo de irradiação variando de 0-180min, I=150mW/cm ² (Dose de irradiação de 0-1620J/cm ²). Excitação: λ=369nm (A) e λ=507nm (B), c=0,5cm.....	72
Figura 31: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem [®] 25µg/mL em 461 e 636nm formado após irradiação com LED em 630nm de 0-180min em função da fluorescência do Photogem [®] em 611 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: λ=369nm (A) e λ=507nm (B).....	73
Figura 32: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com tempo de irradiação variando de 0-180min, I=150mW/cm ² (Dose de irradiação de 0-1620J/cm ²) e c=0,5cm.....	74
Figura 33: Espectros de fluorescência do Photogem [®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com tempo de irradiação variando de 0-180min, I=150mW/cm ² (Dose de irradiação de 0-1620J/cm ²). Excitação: λ=369nm (A) e λ=507nm (B) e c=0,5cm.....	75
Figura 34: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem [®] 25µg/mL em 636nm formado após irradiação com LED em 630nm de 0-180min em função da fluorescência do Photogem [®] em 611 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: λ=369nm (A) e λ=507nm (B).....	75
Figura 35: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 50µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com potência de 1000mW, com tempos de irradiação de 0-150min, I=500mW/cm ² , Dose de irradiação de 0-450J/cm ² , c=0,2cm.....	78
Figura 36: Espectros de fluorescência do Photogem [®] 50µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com potência de 1000mW, com tempos de irradiação de 0-150min, I=500mW/cm ² , Dose de irradiação de 0-450J/cm ² . Excitação: λ=369nm (A) e 507nm (B), c=0,2cm.....	79
Figura 37: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem [®] 25µg/mL em 461 e 636nm formado após irradiação com LED em 630nm de 0-150min em função da fluorescência do Photogem [®] em 611 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: λ=369nm (A) e λ=507nm (B).....	80

Figura 38: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 25µg/mL em PBS. Irradiação cm laser em 514nm com P=1000mW, com tempos de irradiação de 0-150min, I= 500mW/cm ² , Dose de irradiação de 0-450J/cm ² , c=0,2cm.....	81
Figura 39: Espectros de fluorescência do Photogem [®] 25µg/mL em PBS. Irradiação cm laser em 514nm com potência de 1000mW, com tempos de irradiação de 0-150min, I= 500mW/cm ² , Dose de irradiação de 0-450J/cm ² . Excitação: λ=369nm (A) e 507nm (B) e c=0,5cm.....	82
Figura 40: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem [®] 25µg/mL em 636nm formado após irradiação com LED em 630nm de 0-150min em função da fluorescência do Photogem [®] em 611 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: λ=369nm (A) e λ=507nm (B).	83
Figura 41: A) Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 50µg/mL fotodegradado em PBS à temperatura ambiente, pH=7.4, com laser em 514nm, I=50mW/cm ² , t=20min, caminho ótico=0,2 cm. B) Variação da absorbância do Photogem [®] em 369nm em função do tempo de armazenamento após a degradação com laser.....	87
Figura 42: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 20µg/mL em PBS degradado com LED em 630nm por 360min, I=25mW/cm ² (Dose de irradiação de 0-540J/cm ²), c=0,2cm.....	89
Figura 43: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 20µg/mL degradado com LED em 630nm por 360min na presença de Triton X-100 (A) e Brij-35 (B). I=25mW/cm ² , Dose de irradiação variando de 0-540 J/cm ² , c=0,2cm.....	92
Figura 44: Variação na absorbância do Photogem [®] em 640nm e em 369nm em PBS (A) e em Triton X-100 (B) em função do tempo de irradiação com LED em 630nm.....	94
Figura 45: Eficiência de degradação das bandas de Soret (369, 400 e 410nm) e formação de fotoprodutos (bandas em 640 e 660nm) para Photogem [®] na presença e ausência de 1% Triton X-100 e Brij-35.....	97
Figura 46: Espectros de fluorescência do Photogem [®] 20µg/mL degradado em PBS (A) e em solução de Triton X-100 (B) com LED em 630nm por 360min, I=25mW/cm ² (Dose de irradiação de 0-540J/cm ²) e λ _{exc} =507nm e 503nm respectivamente, c=0,2cm.....	98
Figura 47: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem [®] 20µg/mL em 636 (PBS) e 663nm (Triton X-100) formado após irradiação com LED em 630nm de 0-360min em função da fluorescência do Photogem [®] em 611 e 622nm para cada tempo de irradiação. Os números à direita dos pontos são os tempos de irradiação em minutos.....	99

Figura 48: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 20µg/mL em DMSO degradado com laser em 514nm por 60min. $I=270\text{mW/cm}^2$, Dose de irradiação de 0-972 J/cm ² , $c=0,2\text{cm}$...	100
Figura 49: Espectros de fluorescência do Photogem [®] 20µg/mL em DMSO degradado com laser em 514nm por 60min. $I=270\text{mW/cm}^2$, Dose de irradiação de 0-972 J/cm ² . $\lambda_{\text{exc}}=369$ (A) e 507nm (B), $c=0,2\text{cm}$	101
Figura 50: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem [®] 20µg/mL em 649nm formado após irradiação com laser em 514nm de 0-60min em função da fluorescência do Photogem [®] em 624 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e $\lambda=507\text{nm}$ (B).....	102
Figura 51: Valores de IC ₅₀ do Photogem [®] não irradiado e irradiado com laser em 488, 514 e 630nm em função do tempo de irradiação. Intensidade de irradiação de 50mW/cm ² (Dose 0-360J/cm ²).....	106
Figura 52: Variação nos valores de IC ₅₀ do Photogem [®] e seus fotoprodutos irradiados previamente com laser em 488, 514 e 630nm por 2h (Dose de irradiação de 360J/cm ²) em função do tempo de incubação. (A) Células normais, (B) Células tumorais.....	109
Figura 53: Valores do IC ₅₀ do Photogem [®] irradiado em cultura de células não tumorais - VERO (A) e em cultura de células tumorais - HEp-2 (B) com LED em 630nm em função do tempo de irradiação. $I=13, 20$ e 25mW/cm^2	115
Figura 54: Valores do IC ₅₀ dos fotoprodutos do Photogem [®] obtidos por irradiação prévia em 514nm ($t= 120$ min, $D=360\text{J/cm}^2$) irradiados em cultura de células não tumorais (A) e em cultura de células tumorais (B) com LED em 630nm ($I=13, 20$ e 25mW/cm^2) em função do tempo de irradiação.....	117
Figura 55: Citotoxicidade no escuro e no claro para as células não tumorais (A) e tumorais em (B) do Photogem [®] e seus fotoprodutos obtidos em 488, 514 e 630nm com intensidade de 50mW/cm ² , $D=360\text{J/cm}^2$. A citotoxicidade no claro, irradiando-se Photogem [®] e seus fotoprodutos em cultura de células com laser em 630nm com intensidade de 25mW/cm ² por 20 min, $D=30\text{J/cm}^2$	120
Figura 56: Citotoxicidade no escuro e no claro para as células não tumorais (A) e tumorais em (B) do Photogem [®] e seus fotoprodutos obtidos em 630nm por 4 e 6h de irradiação com intensidade de 25mW/cm ² (Dose de 360-540J/cm ²). A citotoxicidade no claro foi obtida irradiando-se Photogem [®] e seus fotoprodutos em cultura de células com laser em 630nm com intensidade de 25mW/cm ² por 20 min, $D=30\text{J/cm}^2$	124

Figura 57: Citotoxicidade no escuro e no claro para as células não tumorais(A) e tumorais em (B) do Photogem [®] irradiado em cultura de células na presença e ausência se soro (3%) com laser em 630nm com intensidade de 25mW/cm ² por 20 min, D=30J/cm ²	126
Figura 58: Espectros de fluorescência no tecido normal e necrosado para Photogem [®] e Photogem [®] previamente degradado com laser em 630nm com dose de irradiação de 1500J/cm ² . Concentração utilizada: 5mg/mL, λ_{exc} =532nm.....	127
Figura 59: (A) Sistema de Diagnóstico. (B) Esquema de funcionamento do sistema.....	129
Figura 60: Espectros de absorção ótica do Photogem [®] 50µg/mL (concentração inicial de degradação = 5mg/mL), c=0,2cm. Photogem [®] 5mg/mL em PBS foi degradado com laser em 514 e 630nm com dose de irradiação de 1500J/cm ²	129
Figura 61: Espectros de fluorescência do Photogem [®] 5mg/mL (A) degradado em PBS e da solução diluída na concentração de 50µg/mL. Irradiação com laser em 514 e em 630nm com potência de dose de irradiação de 1500J/cm ² (I=500mW/cm ² , com tempo de 50min).....	130
Figura 62: Decaimento da intensidade de fluorescência em fígado não fotossensibilizado e sensibilizado em função da distância.....	131
Figura 63: A) Alteração hepática causada pelo Photogem [®] logo após a aplicação da TFD. B) Alteração hepática causada pelo Photogem [®] 30 horas após a iluminação.....	133
Figura 64: A) Transição entre tecido hepático normal e necrosado fotossensibilizado com Photogem [®]	134
Figura 65: Microscopia óptica (aumento de 40x). Transição entre tecido hepático normal e necrosado fotossensibilizado com Photogem [®] (A) [99] Photogem [®] degradado previamente em 514 (B) e 630nm (C). 1) Tecido necrosado. 2) Tecido normal não necrosado.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenças funcionais mais significativas entre as células não tumorais e as cancerosas em cultura.....	6
Tabela 2: FS utilizados em TFD.....	26
Tabela 3: Quadro resumo dos experimentos realizados.....	53
Tabela 4: Parâmetros para o “photobleaching” do Photogem [®] 40µg/mL (equação 4) e para a formação de fotoprodutos (equação 5) do Photogem [®] irradiado em 488, 514 e 630nm com dose de irradiação de 0-360J/cm ²	61
Tabela 5: Parâmetros para o “photobleaching” do Photogem [®] 20µg/mL (equação 4) e para a formação de fotoprodutos (equação 5) do Photogem [®] irradiado em 488, 514 e 630nm com dose de irradiação de 0-360J/cm ²	67
Tabela 6: Parâmetros relativos à absorbância para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{\max}$, A_{Soret}^{∞} ou A_{640}^0) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ), em porcentagem (%) para Photogem [®] 20 e 40µg/mL em PBS degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 50mW/cm ² com tempo variando de 0-120min.....	68
Tabela 7: Parâmetros relativos à absorção para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ) para Photogem [®]	76
Tabela 8: Parâmetros relativos à absorbância para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{\max}$, A_{Soret}^{∞} ou A_{640}^0) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ), em porcentagem (%) para Photogem [®] 25µg/mL em PBS degradado com laser em 351 e 514nm com intensidade de irradiação de 150mW/cm ² com tempo variando de 0-180min.....	77
Tabela 9: Parâmetros do Photogem [®] 50µg/mL para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos para a irradiação por (0-150min).....	78
Tabela 10: Parâmetros para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{\max}$, A_{Soret}^{∞} , A_{640}^0) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ), para Photogem [®] 25µg/mL em PBS degradado com laser em 514nm com Potência de 1000mW (Intensidade de 500mW/cm ²) com tempo variando de 0-150min.....	81

Tabela 11: Parâmetros relativos à absorbância para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{\max.}$ e A_{Soret}^{∞} ou A_{640}^0) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ), em porcentagem (%) para Photogem [®] 25 e 50µg/mL em PBS degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 500mW/cm ² com tempo variando de 0-150min.....	84
Tabela 12: Parâmetros relativos à absorbância para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{\max.}$ e A_{Soret}^{∞} ou A_{640}^0) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ), em porcentagem (%) para Photogem [®] 20 e 40 e 25 e 50µg/mL em PBS degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 50, 150 e 5000mW/cm ² com tempo variando de 0-180min.....	85
Tabela 13: Parâmetros para o rendimento quântico dos processos de degradação e formação de fotoprodutos ($\Delta A_{\max.}$, A_{Soret}^{∞} A_{640}^0) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ) para Photogem [®] 20µg/mL degradado com LED em 630nm por 360 min com dose de irradiação variando de 0-540J/cm ²	96
Tabela 14: Citotoxicidade no escuro do Photogem [®] irradiado com laser em 488; 514 e 630nm para as células não tumorais VERO, tempo de incubação=18h, (n=22).....	103
Tabela 15: Citotoxicidade no escuro do Photogem [®] irradiado com laser em 488, 514 e 630nm para a linhagem HEp-2, tempo de incubação=18h,(n=22).....	104
Tabela 16: Citotoxicidade no escuro do Photogem [®] para a linhagem celular VERO em função do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas...	107
Tabela 17: Citotoxicidade no escuro do Photogem [®] para a linhagem celular HEp-2 em função do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.....	108
Tabela 18: Efeito da luz no Índice de sobrevivência celular (I.S.) para as células não tumorais (VERO) variando a dose de irradiação ($D= J/cm^2$). Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.....	111
Tabela 19: Efeito da luz no Índice de sobrevivência celular (I.S.) para as células tumorais (HEp-2). Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.....	112
Tabela 20: Citotoxicidade do Photogem [®] irradiado após incubação em cultura celular com laser em 630nm e $I=13; 20$ e $25mW/cm^2$ para as células não tumorais (VERO) com tempos de irradiação de 7-60 min. Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.....	113

Tabela 21: Citotoxicidade do Photogem [®] irradiado com tempos de 7-60 min após incubação em cultura celular com laser em 630nm e I=13; 20 e 25mW/cm ² para as células tumorais (HEp-2) com tempos de irradiação de 7-60min. Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.....	114
Tabela 22: Citotoxicidade do Photogem [®] previamente irradiado por 120 min em 514nm D=360J/cm ² , após incubação em cultura celular com laser em 630nm e I=13; 20 e 25mW/cm ² para as células não tumorais(VERO), com tempos de irradiação de 7-60 min. Os experimentos foram realizados 10 vezes em triplicatas.....	116
Tabela 23: Citotoxicidade do Photogem [®] previamente irradiado por 120 min em 514nm D=360J/cm ² , após incubação em cultura celular com laser em 630nm e I=13; 20 e 25mW/cm ² para as células tumorais (HEp-2) com tempos de irradiação de 7-60min. Os experimentos foram realizados 10 vezes em triplicatas.....	116
Tabela 24: Citotoxicidade (IC ₅₀) no escuro e no claro do Photogem [®] e seus fotoprodutos (obtidos com irradiação prévia por 120 min com I=50mW/cm ² – Dose=360J/cm ² em 488, 514 e 630nm, incubados por 18h e irradiados com LED em 630nm (D=30J/cm ²), por 20 min com I=25mW/cm ² em células não tumorais células tumorais.....	119
Tabela 25: Citotoxicidade no escuro e no claro com LED em 630nm (D=30J/cm ²) do Photogem [®] e dos fotoprodutos do Photogem [®] obtidos em 514 e 630nm por 120 min (I=50mW/cm ² D=360J/cm ²) para a linhagem celular VERO em função do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados 10 vezes em triplicatas.....	121
Tabela 26: Citotoxicidade no escuro e no claro com LED em 630nm (D=30J/cm ²) do Photogem [®] e dos fotoprodutos obtidos do Photogem [®] em 488, 514 e 630nm por 120 min (I=50mW/cm ² D=360J/cm ²) para a linhagem celular HEp-2 em função do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados 10 vezes em triplicatas.....	122
Tabela 27: Valores de IC ₅₀ do Photogem [®] e seus fotoprodutos obtidos por irradiação prévia com LED em 630nm por 4 e 6hs com I=25mW/cm ² (D= 360 e 540Jcm ²), no escuro e no claro com LED em 630nm (D=30J/cm ²) para as células não tumorais– VERO e células tumorais - Hep-2, em função do tempo de incubação de 18hs, n=10.....	123
Tabela 28: Valores de IC ₅₀ do Photogem [®] no claro para as linhagem celulares normais (VERO) e tumorais (HEp-2) em relação `a presença ou ausência de soro ao meio de cultura, com tempo de incubação variando de 2hs a 18hs.....	125
Tabela 29: Análise da profundidade de necrose para Photogem [®] e Photogem [®] previamente degradado com laser em 514 e 630nm.....	136

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
DHE – do inglês, dihematoporphyrin ether/esther
DMEM – do inglês, Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxiribonucleico
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
FS – Fotossensibilizador
FSs – Fotossensibilizadores
HEp-2 – linhagem celular tumoral de laringe humana
HpD – do inglês, Hematoporphyrin Derivative
LDL – do inglês, Low Density Lipoprotein
LED - do inglês, light emitting diodes
MDR – do inglês, Multidrug Resistance
MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil tetrazólio
Npe6 – mono-aspartil-clorina-e₆
PBS – solução salina tamponada com fosfato
PDT – do inglês, Photodynamic Therapy
PDZ – Photodithazine
rpm – rotações por minuto
SFB – soro fetal bovino
TFD-Terapia Fotodinâmica
TNF – do inglês tumor necrosis factor
TRITON X-100 – t-octil-fenoxipolietoxi-etanol
Versene – solução de EDTA 0,02%

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica para induzir dano ao tecido tumoral e consiste na administração de uma droga fotossensível que pode ser seletivamente retida no tecido tumoral e que produz oxigênio singlete quando irradiada em comprimento de onda adequado na presença de oxigênio molecular. Fotossensibilizadores do tipo porfirinas podem ser degradados pela luz modificando a concentração do fotossensibilizador (FS) no tumor. Este processo chamado de fotodegradação caracteriza-se pela diminuição nas intensidades das bandas de absorbância e fluorescência e pode ser acompanhado pela formação de fotoprodutos. Neste estudo o FS usado foi Photogem[®], um derivado de hematoporfirina produzido na Rússia e que está sendo usado em TFD no Brasil. A fotodegradação do sensibilizador e formação de fotoprodutos foi monitorada pelas mudanças nas propriedades de fluorescência e absorbância, assim como pela formação do fotoproduto evidenciado pelo aparecimento de uma nova banda em torno de 640nm em PBS e 660nm em soluções de Triton X-100 e Brij-35. A fotodegradação do Photogem[®] e a formação dos fotoprodutos foram induzidas pela irradiação com laser e LED em diferentes concentrações, comprimentos de ondas de irradiação (351, 488, 514 e 630nm), em diferentes intervalos de tempo e intensidades de irradiação. A citotoxicidade do Photogem[®] e seus fotoprodutos em células tumorais (HEp-2) e células não tumorais(VERO) foram investigadas no escuro e no claro. Experimentos em animais foram realizados com o objetivo de verificar a profundidade de necrose causada por Photogem[®] e seus fotoprodutos. Os resultados sugerem que os fotoprodutos do Photogem[®] são menos citotóxicos tanto no claro como no escuro e esta citotoxicidade diminui com o aumento do tempo de irradiação prévia do Photogem[®]. Os fotoprodutos obtidos do Photogem[®] em 514nm precisam de 1 h de irradiação em ambas as linhagens celulares para ter a mesma citotoxicidade que Photogem[®] irradiado por 14 min em células tumorais e 25 min em células normais. Os resultados sugerem que diferentes processos ocorrem na degradação do FS quando em diferentes meios (PBS, surfactantes e solventes), em diferentes concentrações e condições de irradiação (comprimento de onda, potência, tempo). Em TFD, os sensibilizadores estão tipicamente presentes em altas concentrações nas células tumorais. 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 fotossensibilidade e fototoxicidade (pele), enquanto quantidade suficiente de fotossensibilizador pode persistir nas células tumorais para posterior fotodestruição, resultando em menor dano para o tecido normal. Assim a fotodegradação do fotossensibilizador é o elo fundamental da distribuição da

dose fotodinâmica nos fluidos biológicos, estando relacionado com a cinética de eliminação do fotossensibilizador do organismo. Para os dados obtidos *in vivo* para a profundidade de necrose em tecido de fígado de ratos do Photogem[®] e seus fotoprodutos obtidos pela degradação em 514nm e em 630nm, observou-se que na dose de irradiação de 150J/cm² em ambas as concentrações (1,5 and 2mg/Kg), a profundidade de necrose é maior para Photogem[®] seguida de Photogem[®] degradado previamente em 514 e 630nm. Na dose de irradiação de 200J/cm² e na concentração de 2mg/Kg não existe diferença na profundidade de necrose para Photogem[®] bem como para seus fotoprodutos, o que pode estar relacionado com a fototoxicidade dos fotoprodutos, que em altas concentrações e doses de irradiação, apresentam uma maior atividade fotodinâmica. Os resultados obtidos *in vivo* concordam com os obtidos *in vitro*, uma vez que nos experimentos citotóxicos, Photogem[®] irradiado mostrou-se menos tóxico do que Photogem[®] não irradiado e nos experimentos em animais observou-se uma menor profundidade de necrose para Photogem[®] irradiado. Estes resultados podem ser úteis para o estabelecimento da dosimetria para Photogem[®] em Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a technique for inducing tumor tissue damage following administration of a drug that can be selectively retained in malignant tissue and produce singlet oxygen when irradiated in adequate wavelengths in the presence of molecular oxygen. Photosensitizers of porphyrin type can be degraded by light (photobleaching), modifying the concentration ratio of the photosensitizer (PS) in the tumor vs. normal tissue. This process, usually called photobleaching, is characterized by a decrease in the absorption and fluorescence intensities. It has been shown that, during photobleaching, the formation of red-shifted absorbing photoproducts takes place. In this study the PS used was Photogem[®], a hematoporphyrin derivative produced in Russia and being used in PDT in Brazil. The sensitizer photobleaching and photoproduct formation was monitored by fluorescence and absorption properties changes as well as by the photoproducts formation evidenced by the appearance of a new absorption band around 640nm in PBS and in 660nm in Triton X-100 and Brij-35 solution. Photogem[®] photobleaching and photoproducts formation was induced by laser and LED irradiation in different concentrations, irradiation wavelengths (351, 488, 514 and 630nm), in different time intervals and intensities of irradiation. The cytotoxicity of Photogem[®] and its photoproducts in tumor (HEp-2) and non-tumor (VERO) cell lines were analyzed in the dark and in the light. Experiments in animals were performed in order to access the depth of necrosis caused by Photogem[®] and its photoproducts in rat liver tissue. The results suggest that the photoproducts of Photogem[®] are less cytotoxic than Photogem[®] either in the dark or in the light, and the cytotoxicity decreases with the previous irradiation time of Photogem[®]. The photoproducts of Photogem[®] obtained at 514nm need one-hour irradiation for both cell lines to have the same cytotoxicity of Photogem[®] irradiated for 14min in tumor cells and 25min in non-tumor cells. The results suggest that different processes occurs in the PS degradation when in different environments (PBS, surfactants and solvents), in different concentrations and irradiation conditions (wavelength, potency, time). In PDT, the sensitizers are typically present in high concentrations in tumor cells. At the same time, the degradation of photosensitizers in properly elevate rates during the illumination in PDT, can lead to a decrease in the concentrations of these photosensitizers in normal tissue, decreasing the photosensibility and phototoxicity (skin), while adequate amount of photosensitizer can be maintained in tumor cells for photodestruction, resulting in a small damage for normal tissue. Photodegradation of photosensitizers is the fundamental connection of photodynamic dose distribution in the biological fluids, being related with the kinetic of photosensitizer elimination in the organism. For the data obtained *in vivo* for depth of necrosis of Photogem[®]

and its photoproducts obtained by degradation in 514nm and in 630nm, it was observed that in the irradiation dose of $150\text{J}/\text{cm}^2$ in both concentrations (1,5 and $2\text{mg}/\text{Kg}$), the depth of necrosis is greater for Photogem[®] followed by Photogem[®] previously degraded in 514 and then in 630nm. In the dose of $200\text{J}/\text{cm}^2$ and in the concentration $2,0\text{mg}/\text{kg}$, there is no differences in the depth of necrosis for non-irradiated Photogem[®] as well as for its photoproducts, what can be correlated with the phototoxicity of the photoproducts, that in high concentrations and elevate irradiation doses, present a greater photodynamic activity. These results obtained *in vivo* are in agreement with the ones *in vitro*, since in the cytotoxic experiments the photoproducts are less cytotoxic than non irradiated Photogem[®] presenting in the animals a small depth of necrosis. These findings may be helpful for establishment of dosimetry for Photogem[®] in Photodynamic Therapy

I. INTRODUÇÃO

1.1 CRESCIMENTO, DIFERENCIAÇÃO CELULAR E O CÂNCER.

Nos organismos unicelulares, como bactérias, por exemplo, a seleção natural favorece aquelas células com maior eficiência no crescimento e divisão e a proliferação, de modo geral, é simplesmente limitada pela disponibilidade de nutrientes. Em contraste, nos organismos multicelulares, como os seres humanos, existem controles elaborados da proliferação dos tipos celulares individuais como forma de manter a integridade geral do organismo, tanto em termos do número de células individuais como também no que tange a sua organização espacial. Na verdade, nos adultos, apesar de um pleno suprimento de nutrientes, a grande maioria das células não se encontra em divisão, além do mais, o desequilíbrio no controle do crescimento pode levar ao desenvolvimento de tumores [1].

Todavia, sob certas circunstâncias, como o reparo tecidual e a senescência, ocorre crescimento e proliferação controlados. Assim, na medida em que as células morrem, seja por senescência seja como resultado de dano tecidual e, embora haja necessidade de reposição, a homeostasia celular é rigidamente regulada pela sobrevivência, proliferação e morte celular (apoptose) controlada como forma de assegurar que as células normais, diferentemente das células cancerosas (transformadas), cessem sua divisão pela inibição por contato com as células vizinhas, mantendo, desta forma, a integridade do organismo. Muito do que se sabe atualmente sobre o controle normal do crescimento e divisão celulares tem sua origem na pesquisa sobre o câncer: os estudos das alterações genéticas nas células cancerosas revelaram mutações em um grande número de genes envolvidos no controle da proliferação celular normal. Estes genes podem ser classificados como proliferativos ou antiproliferativos. Os genes proliferativos mutados são denominados oncogenes (genes causadores de câncer, em contrapartida aos proto-oncogenes de células normais) e são predominantemente transdutores de sinais que atuam promovendo crescimento e divisão

celulares normais, mas cuja regulação descontrolada leva à transformação celular. Os genes antiproliferativos ou genes supressores de tumores normalmente suprimem a proliferação celular: mutações que inativam ou levam a uma perda da expressão do gene supressor de tumor, portanto, também resultam em uma proliferação incontrolada [1].

1.1.1 CICLO CELULAR

As células se reproduzem pela duplicação de seus conteúdos e então se dividem em duas; este é um processo complexo e rigidamente controlado, denominado ciclo celular. O ciclo celular é dividido em várias etapas. A mitose (fase M) é o estágio de divisão celular que ocorre na maioria das células em aproximadamente em 1 hora. O restante do ciclo celular durante o qual ocorrem o crescimento celular e a síntese do ácido desoxirribonucléico (DNA) é conhecido como interfase. A replicação do DNA nuclear ocorre durante a fase de síntese (S) da interfase. O intervalo entre as fases M e S é denominado fase G1 e o intervalo entre as fases S e M é denominado fase G2. As fases G1 e G2 exigem tempo, não apenas para o crescimento celular, mas também para fornecer os pontos de verificação nos quais se dá a progressão controlada do ciclo celular e a incorporação de eventual dano ao DNA é impedida antes da divisão celular. A fase G1 é um período variável de tempo em que a célula sintetiza substâncias para sua sobrevivência, já a fase G2 é o período de intensa atividade onde a célula manufatura substâncias, proteínas principalmente, para o processo físico da divisão celular, na fase M. A célula pode sair do ciclo tanto no período G1 quanto no G2, entrando no período G0 (estado de latência ou repouso), permanecendo nesta fase até que receba os sinais apropriados que permitam a evolução ao longo do ciclo (Figura 1) [1, 2].

Figura 1: Ciclo celular esquemático de um mamífero [2]

As células na fase S do ciclo celular são susceptíveis a muitas drogas anticâncer, já que nesta fase as drogas atuam inibindo a síntese de DNA. Já quando as células estão nas fases de transição entre G_1 -S e ou na transição G_2 -M são sensíveis à radiação [2].

Anatomicamente todos os tumores apresentam dois componentes básicos: o parênquima constituído de células proliferativas (células que estão em uma fase ativa – G_1 , S, G_2 , M) e o estroma, tecido conjuntivo e vasos. Imediatamente após a transformação maligna, visto através da microscopia óptica, as células cancerosas e as suas células não tumorais de origem apresentam poucas diferenças visíveis. No entanto, com o crescimento tumoral, as células tumorais podem tornar-se cada vez mais alteradas apresentando diferenças estruturais e funcionais significativas [2].

1.1.2 CÂNCER

As células com mutações que rompem o controle da divisão celular dividem-se independentemente das necessidades reais do organismo e tornam-se aparentes como tumores ou neoplasias. Enquanto as células neoplásicas permanecerem como um tumor intacto, este é considerado benigno e pode ser removido cirurgicamente. Todavia, se novas mutações permitirem que estas células passem a invadir e colonizar outros tecidos, gerando

tumores ou metástases secundários disseminados, o tumor passa a ser considerado maligno e é classificado como câncer. Cada câncer é originário de uma única célula que sofreu algum tipo de mutação transmissível que permite o crescimento excessivo em relação às demais células; quando detectados precocemente, os tumores já contêm, caracteristicamente, um bilhão de células. Os cânceres são classificados de acordo com o tipo de tecido e de célula dos quais derivam: os tumores originários de células epiteliais são denominados carcinomas; aqueles oriundos do tecido conjuntivo ou muscular são denominados sarcomas e aqueles originários do tecido hemopoiético são denominados leucemias. Aproximadamente 90% dos cânceres humanos são carcinomas, dos quais os cinco mais comuns acometem os pulmões, o estômago, as mamas, o cólon/reto e o cérvix uterino. Uma vez que as mutações no DNA ocorrem com uma frequência de 10^6 por gene por divisão celular (até mesmo mais, na presença de mutagênicos) e aproximadamente 10^6 divisões celulares ocorrem no corpo humano ao longo da vida, cada gene humano tem uma probabilidade de sofrer mutação em aproximadamente 10^{10} ocasiões. Evidentemente, uma única mutação não é suficiente para transformar uma célula sadia em cancerosa; várias mutações raras têm que ocorrer simultaneamente, conforme demonstram os estudos epidemiológicos. Estes estudos indicam que, para qualquer determinado tipo de câncer, a incidência aumenta exponencialmente com a idade. Na realidade, estima-se que, em geral, são necessárias de 3 a 7 mutações independentes, com as leucemias exigindo um número menor de mutações, enquanto os demais cânceres exigem um número maior. A evolução das células não tumorais para tumorais pode ser visualizada na Figura 2 [3, 4].

Diferentemente das células normais, as células tumorais crescem rápido e desordenadamente, podendo invadir tecidos e órgãos adjacentes, espalhando-se para outras regiões do corpo através da corrente circulatória, dando origem a tumores secundários denominados metástases. Esta capacidade de formar metástases é uma das características que

faz do câncer uma doença considerada letal. As diferenças entre células não tumorais e tumorais podem ser visualizadas na Figura 2 [2, 5].

Figura 2:Esquema ilustrativo da evolução hipotética de células não tumorais para malignas A-D [3].

Existem muitas causas para o câncer, podendo ser classificadas em externas e internas ao organismo estando ambas relacionadas entre si. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente (agentes químicos, ambientais, radiação) e aos hábitos gerados pelo ambiente social e cultural (hábitos alimentares, hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas), enfim a agentes cancerígenos existentes. As causas internas estão relacionadas em sua totalidade à predisposição genética do indivíduo estando relacionadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas [4, 5]. Na Tabela 1 podemos visualizar as diferenças das células não tumorais e tumorais em cultura de células [2].

Tabela 1: Diferenças funcionais mais significativas entre as células não tumorais e as cancerosas em cultura [2].

Características	Célula normal	Célula maligna
Inibição contactual	Param de se dividir com o contanto	Crescem desgovernadamente
Fator de crescimento	Requerido	Não requer ou necessita reduzir
Coesividade	Crescimento celular por toda a superfície	Células crescem em suspensão ou aderidas
Motilidade	Não freqüente	Usual
Resposta para ativadores	Sensíveis a estímulo	Insensíveis a estímulo
Transplantabilidade	Rara	Usual
Duração em cultura	Curta	Longa

1.1.3 CÂNCER DE LARINGE

Dentre os tipos de câncer que atingem a região da cabeça e pescoço, o de laringe é um dos mais freqüentes, sendo o segundo tipo de câncer no sistema respiratório, em termos de incidência, após o câncer de pulmão [6-8]. Este tipo de câncer representa cerca de 25% dos tumores malignos que acometem esta área e 2% de todas as doenças malignas. Aproximadamente 2/3 desses tumores surgem na corda vocal verdadeira e 1/3 acomete a laringe supraglótica (ou seja, localizam-se acima das cordas vocais) [6, 8].

O desenvolvimento de câncer nas vias aerodigestivas superiores está nitidamente relacionado com a ingestão excessiva de álcool e o hábito de fumar. 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. Este é um câncer relativamente comum em homens e raro em mulheres[6, 8] . De acordo com a localização e estágio do câncer, ele pode ser tratado com radioterapia ou cirurgia. Em alguns casos, com o intuito de preservar a voz, a radioterapia pode ser selecionada primeiro, deixando a cirurgia como alternativa quando a radioterapia não for suficiente para controlar o tumor [5, 6].

1.2 TERAPIAS UTILIZADAS NO COMBATE AO CÂNCER

Os tratamentos convencionais do câncer ainda são cirurgia, radioterapia (braquiterapia), quimioterapia (incluindo hormonioterapia e imunoterapia) [4, 9-11]. As outras formas de tratamento, chamadas de tratamento complementar e alternativo existem há muitos séculos, mas apenas no ano 2.000 foi publicado um guia sobre o assunto pela Sociedade Americana do Câncer [11]. As terapias complementares servem como método de suporte e podem complementar o tratamento clássico, ajudando a promover o equilíbrio emocional e a reintegração psicossocial do paciente. Dentre essas terapias destacam-se a acupuntura, fisioterapia, fonoaudiologia, psicoterapia, musicoterapia entre outras [11]. As terapias alternativas não tem comprovação científica e, por isso, os médicos são proibidos pelo Conselho Federal de Medicina de utilizá-las para tratar o câncer [11].

Entre as terapias convencionais, todas apresentam efeitos benéficos no combate ao câncer, entretanto apresentam efeitos colaterais e psicológicos [4, 9-11].

A cirurgia, técnica que consiste na remoção do tumor, apesar de ser a técnica mais utilizada no tratamento do câncer, causa severas mutilações nos pacientes, principalmente no caso de tumores de mama, laringe e tumores de pele situados em regiões estéticas. 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 aprender a falar de uma nova maneira [4, 6] .

A quimioterapia baseia-se na utilização de compostos químicos tais como agentes alquilantes e antimetabólicos. 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 [4]. A farmacocinética dos agentes quimioterápicos do câncer pode ser complexa e a toxicidade é proporcional à exposição total à droga e não ao pico de concentração plasmática da droga. Primeiramente a droga deve penetrar nas células cancerosas individuais e então interagir com seu alvo molecular. Como esta interação é freqüentemente reversível, pelo menos inicialmente, há a necessidade de se manter a concentração citotóxica nesta fase. Além disto, o número de interações individuais entre uma droga e as moléculas-alvo necessárias para matar uma única célula pode ser enorme. Estima-se que para matar uma única célula seja necessário a ligação de um milhão de partículas de cisplatina ao DNA da célula em questão [3].

A terapia citotóxica do câncer baseia-se no princípio de que as drogas matam uma fração constante, não um número constante de células; e que as células podem ter um período distinto de vulnerabilidade às drogas citotóxicas. Desta forma, pode-se dizer que as drogas citotóxicas reduzem a evolução das células ao longo do ciclo celular e também não apresentam uma toxicidade seletiva para as células cancerosas, já que a citotoxicidade é proporcional à exposição total a droga [3].

Deve-se salientar que 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 tumorais [4]. Entretanto existem células não tumorais 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 não tumorais[12]. 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. Todas estas modalidades de tratamento não são seletivas, ou seja, agredem tanto as células tumorais como as células não tumorais[4, 9].

A radioterapia 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. Na radioterapia, o tecido neoplásico é cuidadosamente exposto à radiação ao mesmo tempo em que a exposição das células não tumorais é minimizada. O objetivo da radioterapia é a destruição das células neoplásicas antes que a radiação promova um dano muito extenso ao tecido normal. A radioterapia utiliza-se de uma fonte de radiação externa ao organismo ou proveniente de radioisótopos. Os radioisótopos são administrados aos pacientes e produzem radiação próxima ao local do tumor [5]. O iodo radioativo 131 é um radioisótopo utilizado em câncer da glândula tireóide. Outros exemplos são o cobalto 60 e o rádio 226. Apesar de vários efeitos benéficos que este tratamento proporciona, a radioterapia apresenta alguns efeitos colaterais, tais como náuseas e vômitos, pois as células da mucosa gástrica são particularmente sensíveis à radiação [4].

A imunoterapia baseia-se na possibilidade do sistema imunológico ser utilizado para destruir as células neoplásicas e sempre foi vista como uma possibilidade muito interessante. Nos últimos anos, a imunologia tem feito novas e impressionantes descobertas [10, 11]. O tratamento imunoterápico do câncer se baseia na ativação do sistema imune contra a célula maligna, produzindo alguns tipos de proteínas que passariam a ser reconhecidas pelas células de defesa do organismo, provocando a destruição das células do tumor. Existem várias formas de se estimular o organismo a atacar as células neoplásicas, uma destas formas é a inoculação de bactérias (por exemplo, a BCG) pouco ativas para produzir doença, mas ativas o suficiente para evocar uma severa reação inflamatória,

tornando as células de defesa mais agressivas [10, 11]. Há ainda outras propostas, como a produção de anticorpos monoclonais contra proteínas específicas encontradas nas membranas das células neoplásicas. Estes anticorpos ajudariam o sistema imune a reconhecer as células neoplásicas como estranhas. Poderiam também, carregar consigo toxinas que atingiriam apenas as células com aquela proteína, no caso, as células do câncer. A engenharia genética, que ainda está em estudo, baseia-se na produção de linfócitos retirados do próprio paciente e que levariam à destruição das células tumorais, tornando o tratamento mais específico [9, 10].

Há também a possibilidade das vacinas, onde se separam antígenos específicos da célula tumoral, e se reinjetam no paciente, que teria seu sistema imune ativado (como já é atualmente feito com vírus e bactérias) [10, 11]. Por enquanto, não há vacina que cure o câncer, nem que possa ser utilizada na prevenção ou no tratamento, no entanto há pesquisas sendo realizadas sobre uma vacina para prevenção do câncer do colo do útero, que deve atuar combatendo 70% das infecções pelo Papilomavírus humano (HPV) e trabalhos experimentais para o tratamento do melanoma, o mais agressivo câncer de pele [10, 11]. A terapia da antiangiogênese consiste na inibição da angiogênese, o que levaria as células tumorais à morte por falta de nutrientes, pois bloqueariam a produção de vasos sanguíneos, essenciais para levar o sangue com os nutrientes ao tumor [10, 11]. As células tumorais produzem substâncias que fazem os vasos sanguíneos crescerem, para aumentar o fluxo de sangue no local, levando oxigênio e nutrientes, deste modo às novas drogas seriam bloqueadoras dessas substâncias produzidas pelos tumores. Estes estudos ainda estão sendo feitos, mas a antiangiogênese promete tornar-se uma das grandes esperanças no combate ao câncer [10, 11].

A oncogenética é um dos maiores progressos na abordagem diagnóstica e terapêutica do câncer. As pesquisas genéticas procuram identificar as pessoas que têm maior

risco de desenvolver um tipo de câncer, possibilitando abordagem preventiva e de detecção precoce da doença [9-11]. Deve-se levar em conta que o câncer é consequência de um acúmulo de defeitos no DNA presente no núcleo da célula e, portanto o estudo das características bioquímicas e moleculares levaria a informações sobre o tipo de alteração do DNA de um tumor, ajudando a estabelecer o tratamento mais adequado [9-11]. As avaliações genéticas de susceptibilidade ao câncer devem ser feitas por equipe interdisciplinar (geneticista oncológico, oncologista clínico, cirurgiões, psicólogo e biólogos) em núcleos especializados. Os avanços em pesquisas na área de biologia molecular devem possibilitar a descoberta de novas drogas, cada vez mais eficazes e com menos efeitos colaterais para tratar o câncer [9, 11].

Diante dos graves efeitos colaterais e da eficiência limitada das terapias tradicionais, alternativas estão sendo constantemente propostas [4, 10, 11]. Dentre estas se destaca a Terapia Fotodinâmica (TFD), que pode atuar como coadjuvante em todas as outras terapias, sem apresentar efeito colateral [13].

1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD), do inglês, Photodynamic Therapy, ou PDT é uma nova e promissora modalidade de tratamento do câncer e caracteriza-se por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorre após a administração de compostos fotossensibilizantes que ficam retidos exclusivamente nos tecidos tumorais, seguido pela irradiação com luz visível [2, 14, 15].

Este tratamento, que se baseia nas propriedades benéficas da luz com o agente fotossensibilizador (FS), é conhecido e estudado desde o início do século passado, no entanto, teve seu impulso retomado como terapia para o câncer somente no início da década de 70 com os experimentos de Dougherty [15-23]. Nestes experimentos, foram analisadas as propriedades de um derivado de hematoporfirina (HpD) capaz de agir tanto como localizador

óptico quanto como um FS seletivo (produto químico sensível à luz) destrutivo de células tumorais [24].

A fototerapia e a fotoquimioterapia são formas de tratamento conhecidas desde a antiguidade para diversas patologias [24] e que se fundamentam na ação da luz de determinados comprimentos de onda sobre os componentes químicos do tecido biológico ou de microorganismos hospedados no tecido. A fototerapia tem suas raízes nos tempos pré-históricos, no entanto, foi redescoberta no início do século XIX pelo médico dinamarquês Niels Ryberg Finsen que demonstrou que a luz emitida pelo sol é altamente eficaz no tratamento de *lupus vulgaris*, uma doença endêmica de pele freqüentemente encontrada durante os meses de inverno em pacientes tuberculosos. Entretanto, a introdução de novos antibióticos no tratamento da tuberculose e a crescente preocupação da fotomedicina com o estudo dos efeitos nocivos da excessiva exposição à luz solar contribuíram para o desuso da fototerapia como disciplina científica, fazendo com que pesquisas sobre os efeitos benéficos da radiação luminosa recebessem pouca atenção pela óptica moderna [2, 24].

A técnica da TFD envolve a interação simultânea de um FS, luz proveniente de um laser e oxigênio molecular existente nas células. A droga injetada na corrente sanguínea percorre todo o corpo, sendo absorvida por todas as células, no entanto, as células saudáveis eliminam essa droga em um período de tempo que varia de 24 a 36 horas, enquanto as células cancerosas, que apresentam um metabolismo diferente, retêm esta droga por um tempo mais prolongado, em torno de 72 horas. Esperando-se 24 horas após a administração da droga, a substância fotossensível estará mais concentrada nas células cancerosas, estabelecendo uma diferenciação entre estas células e as demais. Essa substância fotossensível quando iluminada por uma luz laser de comprimento de onda específico é então excitada e, uma vez neste estado energético, provoca uma reação química com o oxigênio molecular, produzindo uma espécie de oxigênio (oxigênio singleto), altamente

reativo com os constituintes celulares e, portanto, bastante citotóxico. Como consequência disso, a célula cancerosa e o tecido tumoral como um todo é levado à necrose, eliminando a lesão cancerosa, e, posteriormente, permitindo a completa restauração do tecido (Figura 3 e 4) [5, 13, 24-26].

Figura 3: Efeito da irradiação da luz no fotossensibilizador dentro das células [27].

Figura 4: Terapia Fotodinâmica: a) Paciente com tumor recebendo diferentes fotossensibilizadores intravenoso; b) FS localizado no tumor após um certo tempo; c) tumor sendo irradiado por luz visível de λ adequado; d) desaparecimento do tumor [28].

A aplicação clínica terapêutica de FSs em TFD é resultado de uma atuação específica e controlada, tanto do fotossensibilizador, que age como um localizador óptico e com finalidade destrutiva seletiva das células tumorais, quanto da luz, utilizada para a sua excitação [5, 24].

A TFD é uma modalidade de tratamento que permite a completa restauração do tecido e pode ser repetida quantas vezes forem necessárias, sendo esta uma de suas maiores vantagens em relação aos incômodos das outras modalidades de tratamento [5]. No entanto, tratando-se de uma terapia que envolve um FS, devem-se tomar precauções quanto à exposição ao sol, já que a pele se torna altamente sensível à luz, sendo este o único efeito indesejado [5, 29-31].

Esta modalidade de tratamento tem sido utilizada com sucesso em casos de tumores onde a aplicação da luz é facilitada, ou seja, tumores externos como câncer de pele e tumores de mama e tumores em cavidades como pulmão, cavidade oral, bexiga, ovário e cólon que podem ser iluminados [32], sendo que neste caso a aplicação de luz pode ser feita através de endoscópio acoplado a fibras óticas [5].

A TFD é essencialmente uma terapia nova de diagnóstico e de tratamento dos pacientes com tumores malignos, no entanto a eficácia do tratamento é dependente do tipo de neoplasia e do FS utilizado [2, 19, 26, 33, 34].

Deve-se mencionar que a TFD é utilizada também em combinação com técnicas convencionais para recorrência de câncer de pele, cavidade oral, metástase intradérmica, recorrência de câncer de mama na parede do peito e metástase intradérmica de melanoma [19, 24, 33, 35-45]. Além disso, utiliza-se esta terapia na redução do volume do tumor antes de uma intervenção cirúrgica, bem como uma profilaxia após uma intervenção cirúrgica com uma pequena margem de segurança, apresentando bons resultados em ambos os casos [19, 24, 35-45]. Deste modo verifica-se que a TFD é efetiva para tratamento de carcinoma *in situ*, principalmente no tratamento de carcinoma baso celular de pele e em casos de metástase de pele originada de câncer de mama [19, 24, 33-45].

Esta técnica tem se mostrado promissora devido ao sucesso obtido no tratamento de vários tipos de câncer, ganhando terreno rapidamente com um avanço importante na cura ou na melhoria da qualidade de vida desses pacientes [46].

Além disto, a TFD pode ser útil em qualquer patologia que envolva tecidos de crescimento rápido, como é o caso das doenças cardiovasculares (tratamento de arteriosclerose), em doenças de pele (psoríase, queratose solar), no campo da oftalmologia (degeneração macular relacionada à idade), artrite reumatóide sistêmica, restenosis, micoses fungóides, infecções bacterianas, verrugas e AIDS [5, 14, 24].

Atualmente, a TFD 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 FSs [5]. No Brasil, de acordo com Bagnato [47], esta modalidade de tratamento vem sendo utilizada há cinco anos no Hospital do Câncer Amaral Carvalho (Jaú) e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) obtendo bons resultados [47].

Este projeto conta com o apoio do Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica, um dos dez Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID) criados no ano de 2000 pela FAPESP e do qual fazemos parte [46].

1.3.2. PROCESSOS FOTOQUÍMICOS ENVOLVIDOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA

O mecanismo de fotosensibilização consiste na interação da luz de comprimento de onda adequado com o FS e o oxigênio, resultando em espécies reativas que induzem a inviabilização das células. Quando estas moléculas são irradiadas com luz visível, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singlete (elétrons de spins emparelhados). Este elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou passar para o estado tripleto (spins paralelos), de menor energia, através de cruzamento

intersistema (ISC), processo não permitido de acordo com as regras espectroscópicas, que requer uma inversão de spins. No entanto a probabilidade que este processo ocorra é menor do que a dos processos permitidos. Entretanto, uma das propriedades desejáveis para um bom fotossensibilizador é uma alta eficiência para sofrer cruzamento intersistema. Como o tempo de vida do estado triplete é relativamente longo (10^{-3} a 10 segundos), o fotossensibilizador excitado pode interagir com moléculas vizinhas. Esta interação pode ocorrer através de dois principais mecanismos [2, 5, 24, 30, 31, 48].

Mecanismo tipo I ou via formação de radical: O fotossensibilizador no estado excitado pode agir abstraindo um átomo de hidrogênio (equação 1) de uma molécula do substrato biológico (fosfolipídios, colesterol, proteínas entre outros) [49] ou transferindo elétrons (equação 2), gerando íons radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental resultando em produtos oxidados responsáveis pela cadeia de radicais livres gerados (O_2^- , H_2O_2 ou $\cdot OH$) que provocam lesões celulares e a subsequente morte da célula. As equações 1 e 2 representam o FS no estado triplete como $^3S^*$, o substrato biológico como SB. [5]:

Mecanismo tipo II ou via formação de oxigênio singlete: O fotossensibilizador no estado triplete transfere energia ao oxigênio molecular no estado fundamental (triplete) produzindo oxigênio singlete. O FS volta ao estado fundamental. A equação 3 [5] abaixo representa o FS no estado triplete como $^3S^*$, o oxigênio molecular como 3O_2 , o FS no estado fundamental como S e o oxigênio singlete como 1O_2 :

1.3.3 CAMINHOS DA TFD PARA A DESTRUIÇÃO TUMORAL

Segundo dados descritos na literatura [2], existem dois caminhos principais para a destruição tumoral via TFD que são:

- **Destruição Indireta:** caminho iniciado pela destruição do sistema vascular (endotélio e outros componentes da parede vascular) e/ou matriz intercelular, seguido por hipóxia (e/ou anóxia) tecidual, que finalmente resulta na morte de células neoplásicas [2].
- **Destruição Direta:** Neste caminho, células tumorais morrem como consequência do mau funcionamento de, por exemplo, funções mitocondriais e de sistemas de biomembranas celulares [2].

1.3.4 PROPRIEDADES DE UM FOTOSSENSIBILIZADOR IDEAL

Quanto aos agentes fototerapêuticos ou FS, estes, assim denominados por apresentarem sensibilidade à luz, devem apresentar certas propriedades específicas para atuarem como um fotossensibilizador fototerápico, tais como:

- i. Ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico para permitir circulação e acúmulo seletivo nas células;
- ii. Apresentar seletividade quanto à retenção por células malignas após algumas horas da introdução da droga na corrente sangüínea. Isto se deve ao fato de que o tecido normal elimina a droga com maior facilidade do que o cancerígeno, pois este apresenta um maior número de receptores de lipoproteínas responsáveis pela captação do FS;
- iii. Ter habilidade para o transporte passivo ou ativo dentro das células e ter um alvo intracelular bem conhecido;
- iv. Possuir alto rendimento quântico (facilidade para absorver ou emitir fótons) nos estados triplete ou singlete;
- v. Não ser tóxico a níveis terapêuticos, com mínima morbidez para o indivíduo;

- vi. Ser metabolizado rapidamente, minimizando possíveis efeitos colaterais [5, 24, 50].

1.4 DISTRIBUIÇÃO PREFERENCIAL DOS FOTOSSENSIBILIZADORES

O mecanismo envolvido na distribuição preferencial dos sensibilizadores no tecido tumoral ainda não está completamente elucidado, no entanto sabe-se que diferenças existentes entre os tecidos tumoral e normal contribuem para esta distribuição seletiva. Dentre as propriedades que diferenciam o tecido tumoral do tecido normal pode-se destacar: [19]

- i. Grande número de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL): 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 membrana [5].
- ii. Presença de macrófagos: foi demonstrado que os macrófagos associados a tumores captam grande quantidade de hematoporfirina e Photofrin[®]. Evans et al mostraram que em suspensões de células tumorais os macrófagos podem ser facilmente identificados e quantificados e que o conteúdo de macrófagos em diferentes tumores experimentais varia de 4% a 56% do total da população de células. Os macrófagos seriam de origem do próprio hospedeiro, em sua maioria derivados dos monócitos da circulação sanguínea [5].
- iii. Baixos valores de pH do fluido intersticial: 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 freqüentemente menor do que o de tecidos normais. No tecido tumoral a microvasculatura está bastante alterada e o fluxo sanguíneo reduzido;

consequentemente, 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, 6,0 e 7,0 enquanto que o pH de tecidos normais está entre 7,2 e 7,4 [51]. 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 seletiva [5, 51].

- iv. Estrutura do estroma tumoral: caracterizada por um grande espaço intersticial, vasculatura interrompida, comprometimento da drenagem linfática, uma grande quantidade de colágeno novo e uma grande quantidade de lipídeos [32, 52]. Além disso, a membrana celular das células tumorais é mais hidrofóbica [5].
- v. Elevado coeficiente de absorção em comprimentos de onda maiores que 650nm, onde a penetração de luz através dos tecidos é facilitada [5].

1.5 FOTOSSENSIBILIZADORES

1.5.1 PORFIRINAS

As porfirinas compreendem uma classe muito importante de moléculas que estão presentes em muitos sistemas biológicos e têm sido amplamente utilizadas em TFD [53]. Como exemplo, podemos citar a Fe-porfirina (que corresponde a protoporfirina-IX), que constitui o sítio ativo de hemoproteínas responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio na hemoglobina e mioglobina, respectivamente [53].

As porfirinas e seus derivados desempenham papéis vitais no funcionamento de muitos sistemas bioquímicos como a fotossíntese, a transferência de elétrons na cadeia respiratória bem como o transporte e armazenamento de oxigênio. As porfirinas podem se ligar a metais formando diferentes complexos, como é o caso da formação do heme, quando esta se complexa com o átomo de Fe^{++} (Fe-porfirina) e formação da clorofila quando a

porfirina encontra-se coordenada com o magnésio (Mg-porfirina) [5]. Estas duas porfirinas, a proto-porfirina IX e a clorofila, são conhecidas como moléculas vitais, sendo responsáveis pela manutenção, em nível fisiológico, das principais formas de vida, tanto do mundo animal como do vegetal [5, 54].

As porfirinas são derivadas da porfina que contém 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 [5]. Devido a este tipo de sistema altamente conjugado, suas transições eletrônicas encontram-se na faixa do visível e ultravioleta próximo. A Figura 5 mostra a estrutura básica da porfirina. 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 [5].

Figura 5: Estrutura básica das porfirinas [5]

A molécula da hemoglobina é composta de quatro cadeias polipeptídicas (α_1 , β_1 , α_2 , β_2), unidas de forma não covalente, onde cada cadeia contém um grupo heme contendo um átomo de Fe^{++} . Pode-se dizer que na hemoglobina existe quatro complexos heme-ferro (Figura 6) [55].

Figura 6: Estrutura básica do heme [56].

1.5.2 FOTOSSENSIBILIZADORES DE PRIMEIRA GERAÇÃO

Os sensibilizadores mais utilizados em estudos clínicos em TFD tem sido os derivados de hematoporfirina (do inglês, hematoporphyrin derivative, ou HpD), que são considerados FSs de primeira geração, entre estes destacam-se: Photofrin[®] (de origem americana), Photosan[®] (de origem alemã) e Photogem[®] (de origem russa). Estes FSs consistem em uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirina unidas por ligações éter ou éster [5, 57]. Estes FSs são produzidos de acordo com a tecnologia original de desfibrilação do sangue de animais e de humanos, a partir de protoporfirina IX (HpIX) existente na circulação sanguínea [20, 58].

Estes HpD apresentam espectro de absorção eletrônica contendo cinco bandas de absorção, sendo uma banda intensa na região de 370nm, conhecida como banda de Soret e quatro de menor intensidade em comprimentos de onda maiores, conhecidas como bandas-Q. Apesar de eficientes em quase todos os tipos de tumores, estes FSs não são considerados ideais, uma vez que apresentam elevada retenção cutânea, causando um efeito colateral indesejável que consiste na fotossensibilização cutânea do paciente que deve se proteger da exposição à luz solar ou luz brilhante por um período de 4 a 8 semanas, que é o tempo de retenção do HpD na pele [5]. Outro fato importante é que a última banda de absorção destes

FSs encontra-se na faixa de 620-630nm com baixo coeficiente de extinção molar. Deve-se salientar que neste comprimento de onda a penetração de luz nos tecidos não é ideal [5]. Estes FSs apresentam-se como uma mistura complexa de vários constituintes que formam agregados em diferentes extensões e diferentes ambientes, o que resulta em alterações na eficácia terapêutica da droga [5].

Devido a todos os fatores mencionados acima, atualmente existe um grande número de estudos dedicados à obtenção de novos fármacos, tão eficientes quanto os FSs de primeira geração, com cinética de eliminação mais rápida e com absorção de luz em comprimentos de onda maiores [5].

Neste trabalho utilizou-se Photogem[®], preparado no Instituto de Alta Tecnologia Química em Moscou, Rússia, sendo aprovado para uso médico pelo Comitê de Farmacologia da Rússia desde 1999 [59]. Segundo alguns trabalhos, Photogem[®] possui características físicas, químicas e diagnósticas semelhantes ao Photofrin[®] relacionadas ao aspecto terapêutico [58, 60, 61]. A estrutura monomérica do Photogem[®] apresentada na Figura 7 tem a fórmula representada por $[C_{34}H_{38}N_4O_6]_n$ e o peso molecular variando de 598 a 2920. Nos radicais R_1 e R_2 ligam-se $CH(OH)CH_3$, $CH=CH_2$ ou a própria estrutura monomérica da porfirina e nos ligantes R_3 e R_4 ligam H ou a própria estrutura monomérica da porfirina podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros [58, 59].

Figura 7: Estrutura monomérica do Photogem[®] [59].

1.5.3 FOTOSSENSIBILIZADORES DE SEGUNDA GERAÇÃO

Estes FSs são compostos quimicamente puros, que absorvem luz em comprimentos de onda maiores ou iguais a 650nm e induzem pouca fotossensibilização cutânea.

A estrutura básica destes compostos é semelhante à das porfirinas. Esses FS são divididos em diferentes classes: a) ftalocianinas e naftalocianinas, b) clorinas e bacterioclorinas, c) purpurinas [5] Figura 8 e Tabela 2.

1.5.3.1 Ftalocianinas e Naftalocianinas

As ftalocianinas são azaporfirinas sintéticas constituídas de quatro núcleos benzoindólicos unidos por pontes de nitrogênio. Estes compostos absorvem na faixa de comprimento de onda de 675-700nm e podem ser ligados a uma variedade de metais, principalmente alumínio e zinco, responsável pelo aumento da sua fototoxicidade. São compostos insolúveis em água, sendo deste modo incorporadas em lipossomas. As ftalocianinas se acumulam na membrana plasmática, microssomos e mitocôndria. Esta classe de compostos apresenta uma intensa banda da absorção na região de 700nm (faixa em que o tecido é transparente à luz) [5]. As naftalocianinas apresentam uma intensa banda da absorção em 780nm Esta classe de fotossensibilizadores tem importância no tratamento de lesões em tecidos altamente pigmentados, como por exemplo, em casos de melanoma melanocítico, em que o tecido é transparente apenas à luz de comprimentos de onda maiores que 780nm [5].

1.5.3.2 Clorinas e Bacterioclorinas

São porfirinas hidrofílicas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região de λ de 650-800nm. Clorinas e bacterioclorinas estão presentes em produtos naturais (*Spirulina*, *Rhodobacter capsulatus*). De modo geral estes compostos apresentam duas importantes propriedades: um alto rendimento quântico de formação de oxigênio

singlete (0,70) e uma intensa absorção em λ altos de 650-680nm. Exemplos de clorinas são: Foscan[®], Photoditazine[®], Radachlorina[®] [5, 62].

Foscan[®] nome comercial do fotossensibilizador derivado de *m*-THPC (meso-tetrakis(m-hidroxifenil)), é produzido na Alemanha e apresenta nome genérico de Temoporfin [14]. É uma droga totalmente sintética análoga à meso-tetrafenilporfirina, um dos compostos modelos mais simples de porfirinas. Estudos demonstraram que a atividade fotodinâmica para TFD é mais acentuada com o *m*-THPC que com o Photofrin[®]. O *m*-THPC possui maior tempo de vida de estado triplete (portanto forma maior quantidade de ¹O₂), maior absorvidade molar ($\epsilon_{652} = 2,24 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), maior hidrofobicidade (levando a uma maior incorporação celular), maior seletividade e pode ser excitado em um comprimento de onda maior (652 nm). Contudo, a fotossensibilidade na pele, causada pelo *m*-THPC, é apenas ligeiramente menor que aquela provocada pelo Photofrin[®]. Devido à sua hidrofobicidade, o *m*-THPC é formulado em polietilenoglicol 400 (PEG): etanol: água, (3:2:5, v:v:v) para usos clínicos. O formulado de Foscan[®], um pré-dissolvido de *m*-THPC, usa propilenoglicol: etanol, (6:4, v:v) [14].

Radachlorina[®] (RADA-FARMA) e Photoditazine[®] (VETA-GRAND) [63] são derivados da clorina e₆ produzidos na Rússia. O Photoditazine[®] é produzido a partir da cianobactéria *Spirulina platensis* modificada através da adição de N-metil-D-glicosamina 0,5% como um agente solubilizante e estabilizante [5, 62]. O Radachlorin[®] é constituído de uma solução aquosa de três tipos de clorinas: clorina sódica e₆ (90-95%), clorina sódica p₆ (5-7%) e uma terceira clorina não revelada (1-5%). Em relação às outras clorinas, o Radachlorina[®] é o mais avançado tipo de clorina e₆ solúvel [62].

O Visudyne[™] é um derivado monoacídico da benzoporfirina (BPD-MA). O BPDMA apresenta alta absorção de luz em uma região próxima ao infravermelho, baixo rendimento de fotobranqueamento (boa fotoestabilidade) em torno de $2,7 \times 10^{-5}$ em tampão

fosfato e a alta formação de oxigênio singlete rendimento quântico de oxigênio singlete de 0,76, o que lhe confere boas qualidades fototerapêuticas [14]. Vários derivados de clorina têm sido estudados, dentre eles a mono-aspartil-clorina-e₆ (Npe₆ ou MACE), produzida no Japão que é uma clorina altamente solúvel em água que absorve em 654 nm ($\epsilon = 4,0 \times 10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). O rendimento quântico de formação do oxigênio singlete é de 0,77 e apresenta efetividade *in vitro* e *in vivo* com baixa fotossensibilidade na pele, provavelmente por causa da sua rápida eliminação do corpo [5, 14, 62, 64].

1.5.3.3 Purpurinas

São compostos hidrofóbicos administrados através de lipossomas, que apresentam um grupo pirrólico reduzido. Apresentam coloração púrpura, uma vez que a presença de um substituinte conjugado na posição *meso* da clorina altera a cor do pigmento anteriormente verde. Absorvem fortemente na faixa de 630-715 nm e apresentam rendimento quântico de formação de oxigênio singlete de 0,6-0,7. A etiopurpurina de estanho (SnEt₂) é o mais ativo dos compostos estudados [5].

1.5.4 ACIDO AMINOLEVULÍNICO (ALA)

O ácido 5-aminolevulínico (ALA) é o precursor metabólico da protoporfirina IX na rota biossintética do Heme. Este quando administrado de forma exógena, age como uma pró-droga, induzindo a formação de porfirina endógena (PPIX). A administração do ALA pode ser tópica, veiculado em cremes ou pomadas ou por meio da administração oral [5].

1.5.5 FOTOSSENSIBILIZADORES UTILIZADOS EM TFD

A Tabela 2 apresenta um resumo dos FSs utilizados em TFD.

Tabela 2: Fotossensibilizadores utilizados em TFD [14, 15, 62, 64-68]

Família	Drogas aprovadas (TFD)		$\lambda_{\text{Máximo}}$ (nm)	Data e País de aprovação	INDICAÇÕES	Coefficiente de Absorção Molar ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Porfirina	Derivado de HpD	Photofrin®	630	1995 USA	Câncer de pulmão, estômago, esôfago, bexiga, laringe, cavidade oral, pele.	1×10^4
		Photogem®		1999 Rússia		
		Photosan®		2002 Europa		
	Precursor da PplX:	Levulan®	633	1999 USA	Câncer de pele.	1×10^4
		Metvix®		2001 Europa		
Clorinas	Verteoporfina-derivado monoacídico da benzoporfirina (BPD-MA): Visudyne™		690	1999 USA	Degeneração macular da Retina.	$3,5 \times 10^4$
	m-THPC (Temoporfin): Foscan®		652	2001 Europa	Câncer de cabeça e pescoço.	$2,24 \times 10^4$
	clorina e ₆ :	Photoditazine®	662	1999 Rússia	Câncer de pele, cavidade oral, laringe, brônquios, esôfago, estômago, vulva.	$3,2 \times 10^4$
		Radaclorin®	662	2001 Rússia	Câncer de mama, lábios, melanoma, esôfago, estômago, reto, vulva, tireóide.	3×10^4
		Mono-Laspatil clorina e ₆ (Npe ₆ ou MACE)	654	Não aprovado	Câncer de pele, bexiga, pulmão e gastrointestinal.	$4,0 \times 10^4$
Bacterioclorina	Pheophorbite não aprovado		780	1999 Alemanha		$3,2 \times 10^4$
Ftalocianina	Ftalocianina Tetrasulfonada: Photosense®		675	1999 Rússia	Câncer de pele, bexiga, pulmão e gastrointestinal.	$1,1 \times 10^5$

A Figura 8 apresenta as estruturas destes FSs utilizados em TFD.

Figura 8 – Estruturas químicas dos FSs: (a) Photofrin[®]; (b) ftalocianina; (c) Foscan; (d) N-aspartilclorina e₆ MACE; (e) Radaclorina[®]; (f) purpurina; g) Visudyne[®] (derivado de benzoporfirina); h) Photoditazine[®]; i) ALA e Protoporfirina IX .

1.6 TRANSPORTE E LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DOS FS

Quanto ao transporte do HpD *in vivo* (Figura 9), podemos afirmar que a propriedade mais interessante da porfirina como droga anticâncer é a sua seletividade pelas células tumorais. Este fato é conhecido desde o início do século, contudo, o mecanismo pelo quais as porfirinas ligam-se e acumulam-se nos tumores ainda não está bem definido. As

lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (LDL), são eficientes transportadores de porfirinas hidrofóbicas no sangue e podem liberar estes FSs para o tecido através de receptores específicos, uma vez que as células neoplásicas apresentam maior quantidade de receptores LDL do que as células não tumorais [1, 5, 48].

A localização do FS *in vivo* é bastante complexa e dependente de vários fatores. Em condições de hipóxia crônica, quando ocorre um desbalanceamento na produção e consumo de prótons com excessiva produção de ácido dentro das células. Estes resultados podem influenciar no processo de retenção e seletividade via TFD [2, 48].

Em relação à retenção dos FSs em células e tecidos, sabe-se que os compartimentos vasculares e intersticiais do tumor apresentam maior permeabilidade vascular do que os tecidos normais. [2]. A localização do FS no tecido tumoral é um importante fator que afeta os mecanismos que levam à destruição do tumor [69]. A captura do FS pelo tumor depende fortemente do mecanismo de transporte no sangue [70]. A administração do FS via endovenosa faz com que os FSs se liguem aos componentes do sangue sendo distribuído em diferentes locais do organismo [69]. Na literatura verifica-se que os FSs hidrofílicos são largamente transportados pelas albuminas e globulinas e acumula-se preferencialmente no estroma dos tumores [69]. Os FSs hidrofóbicos ou anfifílicos são ligados a lipoproteínas, que promovem a internalização da droga nas células através da endocitose [69].

Na TFD os sítios de danos às células e tecidos estão intimamente relacionados à localização do fotossensibilizador, uma vez que a migração do oxigênio singlete do local onde foi formado é limitada, no entanto, o pior dano, é aquele causado às membranas, em decorrência da peroxidação lipídica, que inclui a membrana plasmática, mitocondrial, lisossomal, do retículo endoplasmático e nuclear. As alterações causadas na permeabilidade da membrana são causadas principalmente pela peroxidação do colesterol e outros

fosfolípídeos insaturados. Dentre as organelas celulares, as mitocôndrias também têm sido descritas como um dos principais alvos de dano celular induzido por fotossensibilização [5]. Na Figura 9 visualiza-se o transporte e a localização celular dos FSs.

Figura 9: Representação esquemática do sistema de transporte e localização dos FS e os principais alvos fotodinâmicos dos tumores *in vivo* [2, 5].

1.7 INTERAÇÃO DA LUZ COM O TECIDO

A Interação da luz com o tecido é uma função complexa de propriedades óticas do tecido, uma vez que a absorção e o espalhamento da luz são dependentes do comprimento de onda [41]. Isto se deve ao fato que os tecidos normais contêm muitas substâncias que absorvem ou refletem radiação eletromagnética como as proteínas e o DNA que absorvem na faixa do ultravioleta (200-350nm), a melanina (absorve em comprimentos de onda pequenos), a hemoglobina, que absorve na região do verde-amarelo do espectro visível e a água na região do infravermelho [5].

Deste modo, os tecidos são relativamente transparentes na faixa do espectro eletromagnético de 600-800nm. Esta faixa de comprimentos de onda é conhecida como “janela terapêutica” e pode ser utilizada na terapia fotodinâmica. A Figura 10 representa o decréscimo na intensidade da luz (fluência) do tecido exposto a um feixe de luz plano de diferentes comprimentos de onda em função da penetração. Podemos deste modo verificar que a luz de comprimento de onda mais longo penetra melhor do que luz de comprimento de

onda mais curto, principalmente porque na região entre 600 e 700 nm não há competição dos cromóforos endógenos e a profundidade de penetração no tecido é de 1 a 5 cm. A melhor penetração tecidual é obtida com os lasers de corante [5].

Figura 10: Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração de luz de diferentes comprimentos de onda [2, 5].

1.8 FOTODEGRADAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES

A maior parte dos FSs utilizados em TFD sofre degradação pela luz [71-77]. Esta degradação pela luz é um tema que vem preocupando os cientistas há décadas. Os primeiros estudos realizados com corantes no início do século XVIII apontaram a luz do sol como responsável pelo desaparecimento gradual de certos corantes em produtos têxteis. Entretanto, no final do século XVIII, iniciaram-se discussões sobre os mecanismos químicos envolvidos na fotodegradação dos corantes sugerindo deste modo que estes processos poderiam ser oxidativos ou redutivos. Outros estudos mostraram que a luz solar, a umidade e a quantidade de oxigênio têm um grande efeito na degradação de corantes têxteis. Desde então, houve progresso no entendimento do mecanismo da fotodegradação dos corantes [71].

O interesse na fotodegradação dos corantes e pigmentos em muitos campos evoluiu através dos anos com os avanços tecnológicos e científicos. Atualmente essas propriedades são relevantes em uma variedade de campos, entre eles estão incluídas as aplicações terapêuticas envolvendo corantes ou outras substâncias fotossensíveis. 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 luz [71].

Na literatura existem vários termos que são empregados referentes a degradação dos corantes e pigmentos sobre irradiação. Os mais frequentemente usados são “*photofading*” e “*photobleaching*” [71-73]. 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 FS e pode ocorrer *in vitro*, *in vivo*, nos fluidos celulares do corpo, células e tecidos [71, 74, 76, 77].

No entanto, a diminuição da absorbância e intensidade de fluorescência não ocorrem necessariamente em paralelo [72]. “Photobleaching” das porfirinas e análogos mais comumente utilizados em TFD pode ocorrer por processo de foto-oxidação ou foto-redução, sendo o de foto-oxidação o mais comum [71-73].

Segundo Bonett [71, 72] existem dois tipos irreversíveis de fotodegradação que levam a mudanças fotoquímicas em cromóforos:

I. Fotomodificação: quando a diminuição na intensidade de absorção e emissão de fluorescência ocorre em alguns comprimentos de onda, mas o cromóforo é retido em uma forma modificada como mostra a reação 1, ocorre a diminuição da intensidade dos picos de absorção do espectro original e o surgimento de uma nova banda de absorção.

Em casos de algumas porfirinas ocorre a formação de fotoprodutos com absorção no vermelho [74]. A fotomodificação redutiva é encontrada em fotoreações de hematoporfirina, onde é evidenciado a formação de clorinas [71, 72].

II. Fotoclareamento verdadeiro: quando as mudanças químicas são profundas e resulta em fragmentos pequenos que não tem mais uma absorção apreciável na região do visível como mostra a reação 2 . A amostra torna-se essencialmente incolor.

Este fragmento tem comumente sido identificado como da foto-oxidação de bilirrubinas (que ocorre em um dos caminhos da fototerapia neonatal), provém de um exemplo onde as estruturas dos produtos pouco coloridos são conhecidos. Deste modo pode se afirmar que quando ocorre fotomodificação, concomitantemente ocorre o fotoclareamento, sendo que o caminho para a fotomodificação ou fotoclareamento pode ser muito variado. [71, 72]. Fotoadição e fotociclicização podem ser acompanhadas pela perda de cromóforos e processos com transferência de elétrons que podem levar à formação de bandas amplas deslocadas para o vermelho [71].

Em TFD, a maioria dos estudos de fotodegradação mostra a necessidade do oxigênio, sendo um processo oxidativo e envolvendo oxigênio siglete ou radical de espécies reativas de oxigênio. Em solução fica evidente a obtenção de oxigênio singlete e fotoquimicamente o oxigênio singlete é um reagente valioso em síntese química. Em sistemas vivos existe uma grande dificuldade em estabelecer a natureza do mediador, alguns estudos indicam que a fotodegradação do Photofrin® e Protoporfirina IX são intermediados via oxigênio singlete [71].

Deve-se salientar que os FSs derivados de hematoporfirinas geralmente são iluminados com laser no vermelho em 630nm, na faixa do espectro eletromagnético em que os tecidos são relativamente transparentes à luz [5].

Quanto à fotoestabilidade, os FSs 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 iluminação [76]. A fotodegradação dos FSs utilizados em TFD pode apresentar vantagens e desvantagens, visto que a destruição do tumor pode não ser completa caso o FS sofra rápida fotodegradação durante a iluminação, o que leva à diminuição da concentração do FS no tumor [71, 74, 76]. Esta alta taxa de fotodegradação pode ser corrigida pela diminuição da dose de luz, seguida de múltiplas sessões de irradiação, levando as células tumorais à necrose [78].

De acordo com a formação dos fotoprodutos em decorrência da fotodegradação, o FS 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, fotoprodutos [76, 78]. 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 um bom entendimento do efeito causado por esta degradação [79].

A TFD é um processo que mostra complexas interações entre a intensidade de luz ou fluência (W/cm^2), dose de irradiação (J/cm^2), concentração do FS e oxigênio [80]. Baixa intensidade de luz causa mais dano fotodinâmico do que alta, uma vez que em alta fluência a quantidade do dano atinge um platô e o fracionamento de luz parece aumentar a quantidade de dano causado pela fluência administrada [80]. A quantidade de oxigênio diminui em altas fluências e em altos tempos de irradiação [80]. A degradação das porfirinas requer oxigênio, indicando deste modo que a taxa de degradação pode diminuir com o aumento da taxa de fluência, mas isso é pouco ou nada pronunciado [80]. A concentração do FS também depende da concentração do oxigênio [80]. O efeito da TFD é geralmente aceito como sendo proporcional ao produto da concentração do FS e dose de iluminação [74]

O mecanismo de degradação é diferente para as porfirinas em solução e em sistemas biológicos. As moléculas de porfirinas excitadas são degradadas pela luz do laser bem como pelo seus próprios fotoprodutos formados [81].

Em TFD, os sensibilizadores apresentam uma capacidade de acumulação seletiva em tecidos tumorais e permanecem por mais tempo nessas células do que nas células não tumorais[2, 24]. Desta forma, a fotodegradação dos FSs em taxas apropriadas durante a iluminação em TFD, pode vir a diminuir a concentração destes FSs nos tecidos normais, levando a uma diminuição da fototoxicidade, enquanto quantidade suficiente de FS pode persistir nas células tumorais para posterior fotodestruição, resultando em menor dano para o tecido normal [78, 82]. Deste modo, a fotodegradação dos FSs é o elo fundamental da distribuição da dose fotodinâmica nos fluidos biológicos, estando relacionada com a cinética de eliminação do FS do organismo [76], promovendo a diminuição da fotossensibilidade da pele, o principal efeito colateral em pacientes tratados em TFD [78, 83, 84].

1.8.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO NOS PROCESSOS DE FOTODEGRADAÇÃO E FORMAÇÃO DE FOTOPRODUTOS

É bem descrito na literatura que porfirinas em solução aquosa consistem de uma mistura de monômeros e agregados e que o grau de agregação depende da concentração e do pH [77, 85, 86]. Rotomskis et al observaram que soluções aquosas de Hp (Hematoporfirinas) e HpD (Derivados de Hematoporfirinas) apresentam banda de Soret com máximo de absorção em torno de 370nm (atribuída aos agregados) e em 395nm (atribuída às espécies monoméricas). Em concentrações altas, Hp e HpD ($1 \times 10^{-4} \text{M} = 100 \mu\text{M}$) apresentam máximo de absorção em torno de 370nm e em soluções diluídas ($\leq 1 \times 10^{-8} \text{M} = 0,01 \mu\text{M}$) em 395nm [85].

1.8.3.1 EFEITO DA AGREGAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES EM TFD

1.8.3.1 Efeito da agregação em TFD

Há muitos anos a pesquisa em TFD ressalta o papel da agregação da hematoporfirina e seus derivados, uma vez que os agregados aparecem como espécie ativa no efeito fotodinâmico. Isto se deve ao fato de que eles são provavelmente os principais localizadores tumorais [85].

De acordo com a literatura Hp e HpD em solução são constituídos de uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros e grandes agregados em equilíbrio. Isso porque em solução aquosa, as porfirinas tendem a se auto-associar e criar agregados [87]. Os agregados, ou seja, oligômeros e dímeros são os maiores responsáveis pelo efeito fotodinâmico, uma vez que são os melhores localizadores tumorais [77, 87-90].

A agregação dos FSs usados em TFD tem demonstrado um papel decisivo para o estudo da atividade fotodinâmica destes compostos [91], uma vez que está relacionada às propriedades físico-químicas e ao comportamento fotofísico das porfirinas [54].

Em particular, a formação do agregado altera os espectros de absorção e emissão [54, 92], rendimento quântico, tempo de vida do estado singlete e triplete, bem como a produção de oxigênio singlete molecular [54, 92], solubilidade em água e outras características.

A auto-associação destas moléculas sensíveis a luz pode ser causada por diferentes razões, entre elas destaca-se a interação entre o FS e moléculas do solvente (auto-agregação em solução aquosa) [91], bem como a interação de porfirinas com estruturas biológicas [54]. Devido a estas implicações, torna-se importante estudar a agregação referente à interação de estruturas biológicas com porfirinas [54, 92].

Moléculas de FS que possuem regiões hidrofóbicas em sua estrutura, tendem a se isolar em contato com moléculas de água e se auto associar a fim de minimizar a energia livre do sistema [91].

Os FS em sua forma agregada são pouco ativos devido à sua baixa geração de oxigênio singlete, o que torna a agregação não favorável para a aplicação em TFD [54, 91, 92]. Entretanto, as espécies agregadas dos FSs derivados de hematoporfirina são conhecidas por serem essenciais para o tratamento do tumor, ao contrário das espécies monoméricas [91]. Deste modo pode-se dizer que deve existir um equilíbrio da proporção de monômeros/agregados na solução do FS a tal ponto que não interfira nos processos de distribuição da droga e consequentemente não comprometa a atividade anti-tumoral.

Devido a estes problemas de administração e incorporação da droga nas células, FSs anfífilicos, que são solúveis em água e em ambientes lipofílicos, tem tendência a se auto-associar em soluções aquosas, exibindo uma atividade fotodinâmica muito maior do que os FSs puramente hidrofílicos (solúveis em água) e lipofílicos (solúveis em gordura) [91].

Os agregados de FSs anfífilicos podem ser monomerizados pelas membranas celulares, uma vez que as membranas consistem principalmente de fosfolipídios e representam o meio lipofílico. Pode-se dizer que, dependendo do estado da agregação do FS, as espécies agregadas podem ser monomerizadas em diferentes extensões, e pode ocorrer tanto no plasma como dentro das membranas celulares, facilitando desta forma a incorporação da droga nas células promovendo seu efeito anti tumoral [91].

A atividade fotodinâmica dos FSs anfífilicos e lipofílicos em células tumorais não estão correlacionadas com o aumento da lipofilicidade, no entanto existe um mínimo necessário de átomos de carbono para que o composto apresente uma lipofilicidade ideal para o transporte e difusão na membrana celular, desencadeando sua atividade tumoral [91].

Por outro lado, modificação na estrutura molecular dos FSs tem uma forte influência na atividade fotodinâmica, sugerindo que a agregação pode ter um papel importante para entender a relação estrutura-atividade dos FSs [91].

O conhecimento sobre a relação entre a agregação e a atividade fotodinâmica pode facilitar o desenvolvimento de drogas e poderá contribuir significativamente para aumentar a eficiência em TFD. Desde que os tipos de agregados moleculares de cada FS podem ser diferenciados de outras moléculas por suas características espectroscópicas, métodos espectroscópicos são os mais apropriados para estas investigações [91].

Devido à estrutura molecular dos FSs tetrapirrólicos, estes tendem a se auto - associar para formar dímeros ou grandes agregados. Este fenômeno é direcionado pelas forças de interações entre as moléculas. Em geral quatro tipos diferentes de interações moleculares podem ser distinguidos: dipolo-dipolo (eletrostática), dipolo induzido – dipolo (indução), dipolo induzido – dipolo induzido – (força de dispersão de London) e uma pequena força de repulsão (repulsão de Pauli). Todas estas forças são referidas como interações de Van der Waals [91]. Pode-se resumir que o processo de agregação quando os FS são dissolvidos em solução aquosa pode ser direcionado por dois tipos de forças: interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas com as moléculas do solvente [91].

As propriedades espectrais típicas intrínsecas dos agregados do FS com respeito aos monômeros são: deslocamento e alargamento da banda para o vermelho (agregado J) e para o azul (agregado H), tempo relativamente curto do estado excitado singlete (S_1), baixo rendimento quântico de fluorescência, levando a uma insignificante geração de oxigênio singlete [91].

As porfirinas são um típico exemplo de cromóforos que apresentam grande tendência em formar diferentes tipos de agregados com propriedades espectroscópicas diferentes. A formação de agregados de porfirinas em solução aquosa pode ser afetada pela

sua estrutura e pelos seus respectivos substituintes, força iônica, temperatura, pH e pela presença de surfactantes [54, 92].

As porfirinas podem ser encontradas na forma de monômeros, dímeros e oligômeros [54, 92]. Agregados moleculares podem formar estruturas altamente organizadas que são classificadas de acordo com a orientação do dipolo de transição induzido do monômero constituinte. Na literatura é descrito que derivados de hematoporfirina (anel tetrapirrólico) apresentam dois tipos de agregados formados em solução aquosa: agregado-J e agregado-H. Os agregados-J (lado-a-lado) apresentam os agregados “tipo linear” e os agregados-H (face a face) apresentam os agregados “tipo sanduíche” (Figura 11) [54, 91].

Os momentos de dipolo de transição dos monômeros agrupados em agregados-H são perpendiculares à linha que os conecta pelos seus centros (arranjo tipo face-a-face), produzindo um deslocamento para o azul no espectro de absorção no UV/VIS, onde a banda de Soret é deslocada para o azul e as bandas Q mudam significativamente para o vermelho em torno de 10nm ($100\text{-}300\text{ cm}^{-1}$) [54, 77, 86].

Em contraste com o anterior, os momentos de dipolo de transição dos monômeros agrupados em agregados-J são paralelos à linha que os conecta pelo centro (arranjo do tipo lado-a-lado), produzindo um leve deslocamento da banda de Soret para o vermelho como também da posição da última banda Q, que muda significativamente para o vermelho (1-10nm) [54, 77, 86, 91].

De acordo com a literatura, Photosan[®] derivado de HpD, similar ao Photofrin[®] e Photogem[®] apresenta agregados tipo “sanduíche” ligados covalentemente (tipo “sanduíche” e tipo “linear” juntos), sendo deste modo considerados fotoestáveis [86]. No entanto Hp não contém agregado tipo “sanduíche” ligado covalentemente, mas apresenta agregado tipo “linear” ligado covalentemente, apresentando-se, portanto menos fotoestável [86].

Figura 11: Tipos de agregados formados pelos FS derivados de hematoporfirina [91].

1.8.3.2 Efeito da agregação nos processos de fototransformação dos FS

Uma vez que a agregação tem influência nos processos de fototransformação dos FSs, é importante analisar o efeito da agregação na formação dos fotoprodutos estáveis, estes que podem vir a desempenhar um papel importante em TFD, uma vez que estes apresentam absorbância na região espectral do vermelho onde ocorre alta penetração da luz no tecido [74, 86].

Em soluções aquosas, porfirinas existem como uma mistura de monômeros e agregados com um grau de agregação dependente da concentração e pH e estas formas apresentam diferentes comportamentos frente à iluminação (fotoestabilidade) [77]. A incorporação de porfirinas dentro das micelas induz à desagregação [86]. Micelas são definidas como agregados coloidais, estáveis termodinamicamente, espontaneamente formados quando se atinge uma determinada concentração de anfílico em solução (concentração micelar crítica – CMC). A CMC é um parâmetro característico para cada tipo de surfactante e define o balanço de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Geralmente, anfílicos com longas cadeias de hidrocarbonetos possuem uma CMC baixa (da ordem de mM) [54, 92]. É muito importante saber se a solução preparada do FS com surfactante está acima ou abaixo da CMC, uma vez que acima da CMC o surfactante em solução aquosa existe como uma microemulsão enquanto abaixo da CMC as micelas podem se precipitar em grandes agregados [93]. A CMC depende fortemente da lipofilicidade do surfactante bem como da sua concentração e temperatura do sistema [93]. Moléculas anfílicas incluem

sabões, detergentes e os fosfolipídios que dão a estrutura básica para as membranas biológicas [54, 92]. A formação de micelas em solução aquosa depende da presença de forças de repulsão entre as cabeças polares anfífilas dos surfactantes que podem ser neutros, catiônicos, aniônicos ou zwitteriônicos e da associação entre as caudas hidrofóbicas (cadeia de hidrocarbonetos insolúveis em água) bem como de seu tamanho, que são responsáveis pela formação de micelas e da CMC [54, 92].

O estudo de surfactantes tentando mimetizar a membrana biológica tem sido muito utilizado como modelo para os estudos de agregação de diferentes tipos de FSs [54, 86, 92]. Os surfactantes, também conhecidos como tensoativos ou anfífilos solúveis, quando adicionados em solução, migram para a interface, diminuindo a tensão superficial da solução quando comparada com a tensão superficial do solvente puro pela auto-agregação [54, 92].

A iluminação das porfirinas em solução aquosa resulta em dois processos, a fotodestruição (caracterizada pela diminuição das bandas espectrais) e a formação de fotoprodutos (aparecimento de uma nova banda).

A formação de fotoprodutos, segundo Rotomskis et al [85, 86], é dependente do estado de agregação e, além disso, é mais eficiente quando o FS é iluminado com laser de argônio em comparação com irradiação com luz branca [77]. A formação dos fotoprodutos é preferencialmente influenciada pelas espécies agregadas em solução aquosa, lembrando que existe um equilíbrio em solução aquosa das espécies monoméricas e espécies agregadas [77, 86]. O esquema das possíveis fototransformações dos FSs do tipo Hp e HpD podem ser visualizados na Figura 12 [77].

Figura 12: Esquema das possíveis fototransformações de Hp e HpD [74, 77].

De acordo com a Figura 12, podemos visualizar os processos de degradação e formação dos fotoprodutos [77]. De acordo com a literatura [94] o “photobleaching” pode ser decorrente da destruição do FS “via luz” através da interação com fótons durante a iluminação gerando fotoprodutos que também atuam degradando a própria molécula do FS, como também mediado pela formação do oxigênio singleto. O “photobleaching” “via oxigênio singleto” ocorre quando o FS transfere a energia recebida “via luz” através da iluminação para o oxigênio molecular dos tecidos formando oxigênio singleto, como também, através da auto-oxidação das espécies monoméricas da molécula do FS que quando excitadas sob iluminação geram oxigênio singleto. Esta auto-oxidação das espécies monoméricas juntamente com a destruição do anel pirrólico são capazes de gerar produtos no ultravioleta [49, 71, 74, 75, 77, 94]. Pode-se dizer de acordo com a literatura que o mecanismo de degradação “via luz” é independente da concentração inicial do FS, no

entanto a degradação “via oxigênio singlete” é inversamente proporcional a concentração inicial do FS [94].

Na Figura 13, Rotomskis et al observaram que a fotodestruição das porfirinas induz modificações no macrociclo originando diferentes tipos de fotoprodutos que foram separados por cromatografia e identificados por espectroscopia ótica [71, 75]. Foram encontrados três tipos de fotoprodutos formados após irradiação com laser: fotoprodutos no vermelho em 640nm (fotoproduto tipo clorina) e em 660nm (fotoproduto tipo bacterioclorina), fotoprodutos tipo mono e di pirróis que absorvem no ultravioleta (240-320nm), no entanto sem ter influência em TFD já que não absorvem luz vermelha usada no tratamento, bem como produtos intermediários tipo bilirrubina em 545nm, formados durante o estágio intermediário da fotodestruição [71, 75]. Pode-se dizer que a degradação de Hp e HpD leva à formação de fotoproduto tipo clorina com absorbância em 640nm, formado predominantemente a partir dos agregados de Hp e HpD por foto-redução e foto-oxidação em ambiente anaeróbico (sem presença de oxigênio)[71, 74, 75].

Figura 13: Esquema dos possíveis fotoprodutos das porfirinas em soluções aquosas [71, 75].

Segundo a literatura e observado na Figura 13, pode-se dizer que as porfirinas podem atuar como agentes redutores ou agentes oxidantes, dependendo das condições do ambiente. A reação de foto-redução acontece pela adição de prótons em condições anaeróbicas. A formação de grandes agregados ou então micelas em altas concentrações de FS (Hp ou HpD) cria essencialmente condições anaeróbicas, desde que é muito difícil a penetração do oxigênio dentro dos agregados por difusão. Deste modo a foto-oxidação de agregados de porfirinas é dificultada, uma vez que a penetração de oxigênio é inibida, pode-se dizer que no caso dos agregados, moléculas do FS podem atuar como oxidantes das moléculas adjacentes, este processo é provavelmente catalizado pela interação comum dos grupos hidroxila periféricos e o anel pirrólico excitado [71, 77].

De acordo com as características espectroscópicas descritas anteriormente para os tipos de agregados “sanduíche” ou “linear”, pode-se dizer que em decorrência da degradação, a banda de Soret muda significativamente, sugerindo que a formação de fotoprodutos em 640nm é condicionada pelo tipo “sanduíche” [86]. Esta conclusão é suportada pelo fato de que em soluções micelares de DMHp onde o tipo “sanduíche” é destruído, a formação de fotoprodutos em 640nm é inibida [86]. Deste modo, pode-se concluir que a fototransformação das porfirinas é altamente dependente do tipo de agregado [75, 77, 86].

A formação do fotoproduto com máximo de absorção em 640nm é condicionada pelo tipo “sanduíche” [86]. Já a presença de estruturas lineares ligadas covalentemente em solução determina a formação de fotoprodutos com máximo de absorção em 660nm [86].

I. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

1. Avaliar a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizador Photogem[®] através de estudos espectroscópicos, *in vitro* e *in vivo*, estabelecendo-se parâmetros para sua utilização clínica no Brasil.
2. Induzir a fotodegradação do Photogem[®] por irradiação com laser nas seguintes linhas: vermelho ($\lambda=630\text{nm}$), verde ($\lambda=514\text{nm}$), azul ($\lambda=488\text{nm}$) e ultravioleta (351nm);
3. Acompanhar a fotodegradação através da análise dos espectros de absorção óptica e emissão de fluorescência;
4. Investigar o efeito da concentração, estado de agregação, comprimento de onda de irradiação, tempo e intensidade de irradiação sobre a degradação e formação de fotoprodutos do Photogem[®];
5. Verificar a citotoxicidade e a fotocitotoxicidade do Photogem[®] não irradiado e previamente irradiado em 488, 514 e 630nm em células não tumorais (VERO) e tumorais (HEp-2);
6. Verificar a citotoxicidade e fotocitotoxicidade do Photogem[®] e seus fotoprodutos em função do tempo de incubação, da presença ou ausência de soro e intensidades de irradiação 13, 20 e 25mW/cm²;
7. Investigar a necrose em tecidos normais de fígado de rato fotossensibilizados pós TFD com administração do Photogem[®] fotodegradado ou não.
8. Contribuir para o estabelecimento da Dosimetria em Terapia Fotodinâmica para Photogem através de um controle rígido da dose de luz administrada (intensidade de luz e tempo de irradiação), tentando minimizar as desvantagens da degradação do FS na TFD buscando compreender melhor os processos envolvidos na transformação do FS sob iluminação.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 FOTOSSENSIBILIZADOR

Photogem[®] foi obtido da Academia de Alta tecnologia de Química de Moscow (Rússia), através de importação pelo laboratório de Biofotônica do Grupo de Ótica sob supervisão do Prof. D.Vanderlei Salvador Bagnato do Instituto de Física de São Carlos-USP. Foram preparadas soluções estoque 5mg-mL⁻¹ do FS Photogem[®] em salina tamponada com fosfato (PBS) pH=7.4 e estocadas a 4⁰C.

3.2 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizados dois tipos de linhagens: células tumorais de laringe humana (HEp-2, ATCC-CCL-23) e células não tumorais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) chamadas (VERO, ATCC-CRL-1587D).

3.3 CULTIVO CELULAR

3.3.1 SUBCULTIVO

As células foram cultivadas em frascos de propileno (Costar) em meio Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) da SIGMA para células VERO e meio Basal medium Eagle (EAGLE) da SIGMA para células HEp-2, com 10% de soro fetal bovino (SFB) da Cultilab e os antibióticos ampicilina e estreptomicina (SIGMA). Todas as manipulações com as células foram realizadas em fluxo laminar.

O subcultivo das células foi feito a cada três dias removendo-se o meio de cultura por aspiração seguido de adição da solução de Tripsina com 0,03% de EDTA. Após um período de cinco minutos, necessário para rompimento das ligações entre as células, transfere-se o conteúdo de células para um tubo cônico e centrifuga-se a 1000rpm durante 40

segundos, descartando-se o sobrenadante para posteriormente ressuspender as células em meio de cultura [5].

Após homogeneização das células em meio de cultura, retira-se uma alíquota para a contagem do número de células. As células são contadas em hemocitômetro (Câmara de Neubauer) e distribuídas em frascos de cultura ou placas apropriadas para os ensaios citotóxicos conforme o número de células desejadas [5].

3.3.3 CONTAGEM DAS CÉLULAS

Para a determinação da viabilidade celular utilizou-se o método da contagem em câmara de Neubauer do teste de exclusão do corante. O “trypan blue” é um corante que é incorporado seletivamente pelas células mortas nas qual a integridade da membrana celular é danificada (rompida). Para a contagem celular, utiliza-se um tubo Eppendorf com 0,1mL de suspensão de células, 0,4mL de PBS como diluente e 0,5mL de solução 0,4% de “trypan blue”. Após a homogeneização da solução, conta-se o número de células, multiplicando-se o valor encontrado por 10 (fator de diluição) e por 10^4 (fator de correção da câmara de Neubauer), obtendo-se desta forma a concentração de células por mL de suspensão[5].

Para a determinação da viabilidade, calcula-se separadamente o número de células vivas e mortas, levando-se em conta que as células vivas apresentam-se incolores ao microscópio, enquanto que as células mortas apresentam uma coloração violeta devido à incorporação do corante. Calcula-se a viabilidade celular (%) através da fórmula abaixo [5].

$$\% \text{Viabilidade} = \frac{\text{Número de células não coradas} \times 100}{\text{Número total de células}}$$

Número total de células

3.3.4 ESTOCAGEM DAS CÉLULAS

O congelamento é importante para a preservação das células instáveis em cultura, como também para a manutenção de um estoque de células que pode vir a ser utilizado por longos períodos e também em casos de uma eventual contaminação. Desta forma utiliza-se a técnica da criopreservação, que consiste na estocagem de células a temperaturas muito baixas de modo a inibir qualquer atividade enzimática. Os crioprotetores são substâncias utilizadas para prevenir danos às células durante o processo de congelamento, devido principalmente ao crescimento de cristais de gelo e às trocas osmóticas. O crioprotetor utilizado neste trabalho foi o dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% [5].

3.3.5 CONGELAMENTO DE CÉLULAS

Quando não estão em uso, as células são congeladas como procedimento de rotina. Para o congelamento, remove-se as células do frasco de cultura, como descrito acima para então preparar a suspensão na concentração de $1-2 \times 10^6$ células/mL em meio DMEM contendo 10% de SFB e 10% de DMSO. A seguir as células são aliqüotadas em pequenos volumes em frascos criogênicos apropriados e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) até o momento da sua utilização [5].

3.3.6 DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

O descongelamento das células é feito em casos em que necessita-se de células para o cultivo e posterior ensaios citotóxicos. Para o descongelamento, retira-se os frascos com células do tambor de criogenia com nitrogênio líquido, faz-se a homogeneização de seu conteúdo que é transferido para um frasco de cultura contendo meio DMEM com 10% de SBF. As células são então cultivadas a 37°C e 5% CO_2 e após cerca de 8 horas o meio é trocado para remover o DMSO [5].

3.4 SISTEMA DE IRRADIAÇÃO

Na irradiação do Photogem[®] em solução utilizou-se o laser de íon argônio - modelo Coherent Innova 100 nos seguintes comprimentos de ondas: 351nm (ultravioleta), 488nm (azul); 514nm (verde) e o laser de corante bombeado pelo laser de argônio - modelo Coherent Innova 100 em 630nm (vermelho). Nos experimentos citotóxicos e na irradiação do Photogem[®] em solução de PBS, 1% de Triton X-100 e Brij-35 utilizou-se um dispositivo a base de LED (diodo emissor de luz) em 630nm $\pm$ 10nm (vermelho). Para os experimentos em animais utilizou-se o laser de diodo em 630nm, com doses de irradiação de 150 e 200J/cm².

Nos experimentos realizados, a intensidade de irradiação do laser variou de 0 a 500mW/cm² e do LED de 0 - 25mW/cm². A intensidade de irradiação foi ajustada de modo a se obter a densidade energética desejada em cada experimento. A luz foi transmitida ao alvo por meio de uma fibra ótica de 600 μ m de diâmetro mantida a 30 cm de distância do alvo de modo irradiar o mais uniformemente possível uma área de aproximadamente 4,0 cm de diâmetro. A intensidade de luz incidente foi medida antes do início de cada irradiação utilizando-se um medidor de potência. Na irradiação com LED, estabeleceu-se uma distância ideal de 5,0cm com intensidade de 25mw/cm² (irradiação uniforme) para a irradiação em solução e em placa de cultura celular de 96 poços. O sistema de irradiação está ilustrado na Figura 14.

Figura 14: Esquema ilustrativo dos sistemas de irradiação utilizados nos experimentos em solução, citotóxicos e em animais. A: Laser de íon argônio e Laser de corante bombeado pelo laser de argônio, B) Laser de diodo em 630nm. C) Dispositivo a base de LED.

3.6 TRATAMENTO FOTODINÂMICO

3.6.1 IRRADIAÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR

Soluções de Photogem[®] em diferentes concentrações foram irradiadas com laser, em diferentes tempos e em diferentes comprimentos de onda com diferentes intensidades de luz. Solução de Photogem[®] 20 μ g/mL foi irradiado cm LED em 630nm por 360min com intensidade de 25mW/cm². O procedimento de irradiação está ilustrado na Figura 15.

Figura 15: Esquema ilustrativo do procedimento de irradiação do fotossensibilizador Photogem[®] com laser de íon argônio em 514nm.

3.6.2 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DO PHOTOGEM[®]

A metodologia empregada no presente trabalho constituiu-se da análise dos espectros de absorção e de fluorescência para Photogem[®] antes e depois de irradiado com laser.

3.6.2.1 Medida de Absorção Ótica

As medidas foram efetuadas no espectrofotômetro UV-1601PC Shimadzu, utilizando-se Photogem[®] em concentrações variando de 0-100µg/mL e 20µg/mL quando na presença de 1% Triton X-100 ou de Brij-35. Utilizou-se para as medidas, cubeta de quartzo (quatro faces polidas) com 0,2 ou 0,5cm de caminho ótico. Os espectros foram monitorados na faixa de 200-700nm.

3.6.2.2 Medida de Fluorescência

As medidas foram efetuadas no espectrofluorímetro HITACHI F-4500. Parâmetros: a) Ganho da fotomultiplicadora: 950W, b) Fenda de excitação e emissão: 5.0, c) Velocidade de varredura: 240nm/min, d) Excitação em 369 e 507nm , e) Emissão de 379-700 e 517 - 700nm.

3.6.3 EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDADE

3.6.3.1 Estocagem do fotossensibilizador

Solução de Photogem[®] previamente irradiado ou não é filtrado e armazenado em frascos estéreis a -18 °C para posterior utilização.

3.6.3.2 Ensaio de viabilidade celular para as células epiteliais - VERO e HEp-2

3.6.3.2.1 Método colorimétrico do MTT [95, 96]

Para os experimentos citotóxicos foram plaqueadas 1×10^5 células/mL em meio de cultura em placas de 96 poços incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 h, removeu-se o meio por aspiração e lavou-se a monocamada de células com PBS. Preparou-se a solução do FS de 0- 25,0 µg/mL em meio adequado sem vermelho de fenol com 3% de SFB utilizando-se solução estoque de Photogem[®] 40µg/mL em PBS previamente irradiado em tempos determinados, com laser em diferentes comprimentos de onda. As células foram incubadas com concentração do Photogem[®] de 0- 25,0 µg/mL em triplicata em estufa de cultura (37° C, 5% de CO₂) por intervalos de tempo de 2, 6, 18 e 24h [97]. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se meio de cultura específico para cada linhagem celular suplementado com 10% de soro. Para os experimentos fotocitotóxicos as células foram irradiadas com LED em 630nm, com diferentes intensidades de luz e tempos de irradiação. Após a irradiação as células foram mantidas em estufa de cultura por 48h. Esse intervalo é considerado ideal para o encerramento de ensaios de sobrevivência após tratamento fotodinâmico, já que tempos de incubação menores podem não permitir que as células se recuperem totalmente do tratamento a que foram submetidas e intervalos maiores podem acarretar um aumento muito grande no número de células [5]. Após esse período de recuperação as células foram tratadas com MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio). Este método de contagem de células baseia-se na redução do MTT, um composto amarelo que é reduzido a um produto chamado formazan, de coloração violeta que

absorve em 570nm. A redução é feita pelas desidrogenases mitocondriais presentes somente nas células vivas. Após 3 h de incubação, o meio com MTT é retirado e 50µL de etanol puro são adicionados. Após diluição completa, adiciona-se 150µL de PBS com isopropanol na proporção 1:1. A absorbância de cada poço da placa é lida em leitor de Elisa modelo Benchmark (BIO-RAD) com filtro em 550nm. Os resultados são apresentados por meio de gráficos da sobrevivência celular (%) em função da concentração do FS. Para obter o valor de IC₅₀ (concentração inibitória média), que mede a concentração da droga capaz de matar 50% da população de células, utiliza-se o programa CalcuSyn [98]. Na Figura 16 é apresentado o sistema de irradiação em cultura de células contendo o FS.

Figura 16: Esquema ilustrativo do procedimento de irradiação com LED em 630nm do fotossensibilizador Photogem[®] em cultura celular.

3.6.4 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS

3.6.4.1 Animais

Utilizou-se para os experimentos, ratos machos, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto FMRP-USP. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em um Alojamento para animais, com quatro filtros para entrada de ar e um exaustor para saída de ar, montado no Instituto de Física de São Carlos-USP, no laboratório de laser em Odontologia e Medicina. O alojamento dos animais foi em gaiolas coletivas (5 animais/gaiola) de polietileno, com tampas metálicas e assoalho forrado com maravalha e receberam água

filtrada e ração comercial específica para roedores Primor[®]. A temperatura foi mantida entre 23 a 25⁰C.

Os experimentos foram realizados com 40 animais, divididos em 8 grupos de 5 animais para Photogem[®] previamente irradiados com laser em 514 e 630nm, com dose de irradiação de 1500 J/cm². Podemos visualizar na tabela 3 os experimentos que foram realizados.

Tabela 3: Quadro resumo dos experimentos realizados.

Grupos	$\lambda_{\text{degradação}}$ prévia do FS	Photogem [®] (mg/Kg)	Dose de irradiação (J/cm ²)
1	514nm	1,5	150
2			200
3		2,0	150
4			200
5	630nm	1,5	150
6			200
7		2,0	150
8			200

3.6.4.2 Determinação da profundidade de necrose

Para a realização dos experimentos os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas, tendo livre acesso à água. Em seguida foram pesados e anestesiados por injeção intramuscular com solução estéril de cloridato de Ketamina a 5% (Vetanarcol[®] - Konig) na dose de 0.08ml/100g de peso corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *xilazina* 2g (Coopazine[®] - Coopers) na dose de 0,04ml/100g [99]. Após este período realizou-se uma incisão mediana no abdômen do rato para posterior exposição do lobo direito do fígado (retirado da cavidade abdominal e isolado com gaze de algodão embebida em soro fisiológico) [99].

O FS não irradiado e previamente irradiado com laser nas concentrações desejadas (mg/Kg de peso corpóreo) foi administrado por injeção endovenosa na veia caudal lateral esquerda do animal [99]. Após 30minutos da administração da droga (tempo de maior acúmulo do FS no fígado), irradiou-se o fígado dos animais com laser de diodo em 630nm

[100]. A área do fígado irradiada de 1.0 x 1.0cm foi estabelecida através da confecção de uma máscara de papel alumínio envolta por gaze com um orifício de 1.0 x 1.0cm, evitando-se desta forma a iluminação das demais áreas. Após a iluminação, os animais foram suturados e mantidos no alojamento do laboratório por 30h (tempo necessário para que não ocorra regeneração). Após este tempo o lobo direito do fígado foi retirado da cavidade abdominal e a área necrosada cortada em fatias de aproximadamente 1mm de espessura. Os animais foram mortos por excesso de anestésico [99]. As fatias foram colocadas em frascos plásticos contendo uma solução de formaldeído a 40% (Formol - Merck®) e levados ao Departamento de Patologia de Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP para preparação das lâminas histológicas [99]. Para verificar modificações ocorridas nos tecidos saudáveis, variaram-se parâmetros como: concentração do fotossensibilizador utilizada, dose de irradiação (intensidade potência e tempo de irradiação).

Na Figura 17 verificamos a detecção do FS no fígado e a irradiação do fígado respectivamente.

Figura 17: Esquema ilustrativo da detecção do FS no fígado por espectroscopia de fluorescência e a irradiação do fígado respectivamente, com laser de diodo em 630nm.

IV. RESULTADOS e DISCUSSÕES

4.1 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DO PHOTOGEM®

4.1.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO ÓTICA

Photogem®, assim como outros FSs derivados de hematoporfirinas apresenta uma banda característica (Banda de Soret) com máximo de absorção em $\lambda=369\text{nm}$ e quatro bandas Q, com máximos em 507, 540, 570 e 620nm, respectivamente (Figura 18).

Figura 18: Espectro de absorção ótica do Photogem® na concentração 50µg/ml, em PBS, pH 7,4 e c=0,2cm.

4.1.1.2 Espectro de absorção ótica em função da concentração

Para investigar a ocorrência de agregação, obteve-se os espectros óticos de diferentes concentrações de Photogem® (1,25-100µg/mL) em PBS (Figura 19).

Figura 19: Espectros de absorção ótica do Photogem® em PBS em concentrações variando de 1,25-100µg/mL em pH 7,4, $c=0,2\text{cm}$.

A partir dos valores de absorbância na Banda de Soret para Photogem®, obteve-se o gráfico apresentado na Figura 20 em função da concentração do FS.

Figura 20: Absorbância do Photogem® em PBS na banda de Soret (369nm) em função da concentração de Photogem®.

Analisando-se o gráfico acima, pode se observar que a absorbância do Photogem® em PBS apresenta-se linear na faixa da concentração estudada, estando de acordo com a Lei de Lambert-Beer, o que sugere que até a concentração de 100µg/mL não ocorre a formação de agregados.

4.1.2 ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA

Photogem[®] quando excitado em 369, 507, 540, 570nm apresenta duas bandas de emissão características: uma em 611nm, de maior intensidade e outra em 672nm, de menor intensidade como apresentado na Figura 21. Deve-se ressaltar que a hemoglobina não interfere nas medidas de fluorescência uma vez apresenta banda de emissão de fluorescência em 580nm, diferente de Photogem com bandas em 611 e 672nm. Os experimentos de fluorescência foram feitos excitando-se o Photogem[®] em 507nm (banda Q), cuidando para que a absorbância da solução fosse menor do que 0,1 para evitar o efeito filtro.

Figura 21: Espectro de emissão de uma solução de Photogem[®] 50µg/mL em PBS, pH 7,4, c=0,2cm, λ_{exc} =507nm.

4.2 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN[®]

4.2.1 EFEITO DO $\lambda_{IRRADIAÇÃO}$ NA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN[®]

4.2.1.1 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogem[®] 40µg/mL em diferentes λ irradiação

Como pode ser observado na Figura 22, quando Photogem[®] é irradiado em 488, 514 e 630nm com intensidade de 50mW/cm², observa-se a diminuição da banda de Soret em 369nm e a diminuição das bandas Q (507, 540, 570, 620nm), seguido do aparecimento de uma nova banda em 640nm, sugerindo transformações químicas levando à formação de fotoprodutos. No entanto observa-se que o decaimento da banda de Soret e bandas Q é muito

mais pronunciado quando Photogem[®] é irradiado em 488 e 514nm, provavelmente devido ao fato de que a absorbância do PG é maior nestes comprimentos de onda do que em 630nm. Outro fato interessante é que, com a irradiação do Photogem[®] nesses três comprimentos de onda, as duas bandas Q de comprimento de onda menores aumentam a sua absorbância e deslocam-se para o azul e as outras duas deslocam para o vermelho, o que, segundo a literatura, indica desagregação [85].

Figura 22: Espectros de absorção ótica de uma solução de Photogem[®] 40µg/mL em PBS, pH=7,4, c=0,5, fotodegradado com laser de argônio em 488 (A) e 514nm (B) e em laser de corante bombeado pelo laser de argônio em 630nm (C) com tempos de irradiação de 0-120min, I= 50mW/cm², (Dose de irradiação de 0-360J/cm²).

De acordo com a literatura, juntamente com a fotodegradação da droga durante a TFD, os FS podem ser fotoquimicamente convertidos a novas espécies chamadas de “fotoprodutos”, processos que podem ser evidenciados pela diminuição da intensidade de absorção do fotossensibilizador durante a iluminação (fotodegradação), acompanhada do

aparecimento de uma nova banda de absorção e no espectro de fluorescência no vermelho devido aos fotoprodutos [71-77, 101].

Os fotoprodutos, com banda espectral no vermelho apresentam atividade fotodinâmica, no entanto menor que HpD [71, 102]. Deste modo deve se considerar esta formação de fotoprodutos como um dos fatores que influenciam a escolha da melhor dose de iluminação em TFD [71, 74, 87].

A Figura 23 apresenta as variações de absorção na banda de Soret (369 nm) e na banda de formação de fotoprodutos (640 nm) para Photogem[®], em função do tempo de irradiação em 488 (A), 514 (B) e 630 nm (C).

Figura 23: Variação na absorbância do Photogem[®] 40µg/mL em 369nm e 640nm em função do tempo de irradiação (0-120 min) com laser de argônio em 488 (A), 514nm (B) e laser de corante bombeado por laser de argônio em 630nm (C).

A Figura 23A mostra que durante os 120 min de irradiação em 488nm nem a fotodegradação nem a formação de fotoprodutos se completaram, o que não ocorreu quando

Photogem[®] é irradiado em 514nm (23B) e 630nm (23C). Pode-se observar na figura 23B que a formação de fotoprodutos atinge saturação em tempos de irradiação menores que 120 min quando Photogem[®] é irradiado em 514nm, enquanto que o “photobleaching” continua quando monitorado em 369 nm. Um resultado similar foi descrito para hematoporfirina (Hp) e derivado de hematoporfirina (HpD) irradiados em 514nm na mesma intensidade de irradiação [77]. Na figura 23C o inverso ocorre, o “photobleaching” induzido por irradiação em 630nm é completo durante o tempo experimental empregado enquanto que a formação de fotoprodutos monitorada em 640 nm continua. Estes resultados sugerem que o mecanismo de degradação e formação de fotoprodutos pode ser diferente quando Photogem[®] é irradiado em 488, 514 e 630nm.

Considerando uma cinética de primeira ordem para o “photobleaching” do Photogem[®], os dados da Figura 23 foram ajustados de acordo com equação 4 [103],

$$A_{Soret}(t) = \Delta A_{Soret, \max} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Photobleaching}}\right) + A_{Soret}^{\infty} \quad (\text{equação 4})$$

onde $\tau_{Photobleaching}$ é a constante de tempo para a reação de primeira ordem, $\Delta A_{Soret, \max}^{\infty}$ é a máxima variação diminuição na absorbância da banda de Soret em 369 nm ($A_{Soret}^0 - A_{Soret}^{\infty}$) do Photogem[®] e A_{Soret}^{∞} é a absorbância no mesmo comprimento de onda no tempo infinito e A_{Soret}^0 é a absorbância inicial. Os dados da formação de fotoprodutos monitorados em 640nm foram ajustados de acordo com a equação 5 [103],

$$A_{640}(t) = \Delta A_{640, \max} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_{Photoproduct}}\right)\right) + A_{640}^0 \quad (\text{equação 5})$$

onde $\tau_{Photoproduct}$ é a constante de tempo para a formação de fotoprodutos, $\Delta A_{640, \max}$ é a máxima variação da absorbância em 640nm e A_{640}^0 é a absorbância inicial no mesmo comprimento de onda. Os parâmetros resultantes para ambos os ajustes estão representados na Tabela 4. De

acordo com os valores de τ obtidos, pode-se deduzir que as reações de degradação do Photogem[®] e de formação de fotoprodutos ocorrem por diferentes rotas quando Photogem[®] é irradiado em 488, 514 e 630 nm confirmando a suposição anteriormente descrita. A constante de tempo para o “photobleaching” induzido do Photogem[®] irradiado em 630 nm é 2,8 vezes menor (32 min) que quando Photogem[®] é irradiado em 514 nm (89 min) e 3,8 vezes para Photogem[®] irradiado em 488nm (123 min). Porém, a constante de tempo da formação de fotoprodutos quando Photogem[®] é irradiado em 630 nm é 3,4 vezes maior (146 min) do que quando Photogem[®] é irradiado em 514 nm (43 min) e 1,4 vezes menor do que Photogem[®] irradiado em 488nm (207 min).

Tabela 4: Parâmetros para o “photobleaching” do Photogem[®] 40µg/mL (equação 4) e para a formação de fotoprodutos (equação 5) do Photogem[®] irradiado em 488, 514 e 630nm com dose de irradiação de 0-360J/cm².

Irradiação (nm)	Processo	τ, min.	$\Delta A_{\text{max.}}$	$A_{\text{Soret}}^{\infty}$ ou A_{640}^0	$\Delta A_{120\text{máximo}}$
488	Fotodegradação	123±23	0,520±0,160	0,890±0,170	0,326±0,160
	Formação de fotoprodutos	207±33	0,036±0,002	0,014±0,002	0,015±0,002
514	Fotodegradação	89±17	0,691±0,100	0,719±0,113	0,511±0,100
	Formação de fotoprodutos	43±8	0,023±0,002	0,014±0,002	0,022±0,002
630	Fotodegradação	32±10	0,146±0,02	1,231±0,02	0,143±0,02
	Formação de fotoprodutos	146±42	0,010±0,002	0,013±0,002	0,006±0,002

Assim, utilizando-se estes modelos cinéticos, podemos mostrar numericamente que, de acordo com os valores das constantes de tempo: a) a fotodegradação do Photogem[®] irradiado em 514 nm (89 min) é duas vezes mais lenta (metade da velocidade) que a taxa de formação de fotoprodutos (43 min), b) a fotodegradação do Photogem[®] irradiado em 488nm (123 min) é cerca de 1,7 vezes mais rápida que a formação de fotoprodutos (207 min), c) a fotodegradação do Photogem[®] irradiado em 630nm (32 min) é cerca de 4,6 vezes mais rápida que a formação de fotoprodutos (146 min). Deste modo pode-se observar que a formação de

fotoprodutos é mais rápida em 514nm, seguida de 630nm e de 488nm. Photogem[®] irradiado em 488nm apresenta a maior constante de tempo para a fotodegradação e formação de fotoprodutos, no entanto, apresenta uma menor degradação e maior formação de fotoprodutos em 640nm (Tabela 4). Na literatura é descrito que a formação de fotoprodutos quando Hp é irradiada em 514 nm é quatro vezes maior que a taxa de “photobleaching” [77]. Esta diferença podem ser devido ao fato de Hp possuir uma composição diferente comparada com Photogem[®]: em torno de 95% de monômeros em Hp contra 14% no Photogem[®] [58]. Considerando o fato de que o efeito terapêutico destas drogas é determinado pelo conteúdo de oligômeros e dímeros [71, 104], Photogem[®] deve levar a uma maior formação de fotoprodutos, desde que a TFD bem como o “photobleaching” depende da eficiência do corante atingir o estado tripleto [71, 103, 105, 106]. De acordo com Rotomskis, R. et al [77], a formação de fotoprodutos que absorvem em 640nm está diretamente relacionada com o estado de agregação das porfirinas, isto é, com o conteúdo de frações oligoméricas ativas disponível. Dessa forma, Hp deve ter menor formação de fotoprodutos do que Photogem[®], o que explicaria a constante obtida nesse trabalho.

De acordo com o modelo matemático proposto pode se dizer que a degradação depende da diminuição da $\Delta A_{Soret, max}^{\infty}$, isto implica em um alto valor da constante de tempo, o que significa uma baixa taxa de photobleaching estimada.

Então, usando os dados da Tabela 4 e Figura 23A e 23B, 120 min de irradiação em 488 e 514nm promove respectivamente cerca de 63% e 70% da degradação total possível ($\Delta A_{Soret, max.}$) do Photogem[®] e 42%, e 99%, respectivamente, para a formação de fotoprodutos ($\Delta A_{640, max.}$), enquanto para irradiação em 630 nm a degradação é de 97% da possível degradação total ($\Delta A_{Soret, max.}$) e a formação de fotoprodutos é de 60%. Porém, enquanto 120 min de irradiação em 630 nm correspondem a uma diminuição da absorbância na banda de Soret de 10%, irradiação em 488 e 514 nm corresponde a 23% e 35% respectivamente.

Uma possível explicação para a eficiência mais alta da irradiação em 488 e 514 nm conduzindo à degradação comparada a 630 nm pode ser obtida pela análise da Figura 22, desde que os valores de A_{488} e A_{514} do Photogem[®] são 2,7 e 3,7 vezes a A_{630} , respectivamente, isto é, a quantidade de luz absorvida é mais alta em 488 e 514 nm supondo que em ambos os comprimentos de onda de irradiação o estado excitado alcançado será o mesmo.

Tem sido descrito que as mudanças espectrais podem ocorrer devido a modificação fotoinduzida das porfirinas com ou sem a quebra do macrociclo da porfirina [71]. Reações fotoquímicas que envolvem fotomodificações do macrociclo da porfirina sem ruptura foram associadas com a diminuição da absorbância na banda de Soret e com o aparecimento de uma nova banda em 640 nm [71-73, 75-77]. Também é descrito que a quebra do macrociclo implica no aparecimento de uma banda de absorção na região do UV [71].

Neste trabalho não foi observado banda de absorção na região do UV após a irradiação. Assim, os resultados obtidos sugerem que exposição do Photogem[®] à luz em 488, 514 e 630 nm não ocasionou produtos no UV decorrentes tanto da fotooxidação das espécies monoméricas do FS, como também pela ruptura do anel, mas pela formação de produtos do tipo clorina [71] em todos os comprimentos de onda mas em maior proporção para irradiação em 488 e 514 nm (3,6 vezes para 488nm e 4,7 vezes para 514nm de acordo com absorbância na banda de Soret, (Tabela 4). Além disso, a quantidade de fotoprodutos formados (A_{640} , Figura 23) em 120 min foi 2,8 e 4,1 vezes maior, respectivamente em 488 e 514 nm comparado com 630 nm.

A análise espectroscópica por fluorescência foi realizada para Photogem[®] 40µg/mL em PBS degradado com laser em 488, 514 e 630nm à temperatura ambiente, com intensidade de 50mW/cm² e tempo de irradiação variando de 0-120min (Figura 24). Deve-se enfatizar que a fluorescência dita normalizada nos gráficos apresentados na Figura 24 e nas

outras que serão apresentadas posteriormente, trata-se da fluorescência corrigida pelo valor da absorbância do comprimento de onda de excitação da fluorescência (369 ou 507nm).

Figura 24: Espectros de fluorescência para Photogem® 40µg/mL em PBS (pH=7,4) fotodegradado com laser de argônio em 488 e 514nm (A e B) e com laser de corante bombeado pelo laser de argônio em 630nm (C) com tempos de irradiação de 0-120min, $I=50\text{mW/cm}^2$, (Dose de irradiação de 0-360J/cm²). $\lambda_{\text{exc}}=507\text{nm}$, $c=0,5\text{cm}$.

O espectro de fluorescência do Photogem® é caracterizado por apresentar uma intensa banda de emissão de fluorescência em 611 nm e uma emissão fraca em 672nm. Conforme aumenta-se o tempo de irradiação, ocorre a formação de uma banda em 636nm e a diminuição nas intensidades das bandas originais do Photogem® (611 e 672nm) principalmente quando este é irradiado com laser em 488 e 514nm. Importante destacar que a

irradiação em 630nm leva a uma fraca diminuição das bandas de emissão, não ocorrendo o aparecimento da banda em 636nm.

Entretanto, observa-se que o crescimento da emissão em 636 nm não corresponde diretamente à diminuição da fluorescência em 611 nm (Figura 25). O aumento de emissão em 636 nm ocorre até 120 minutos de irradiação para degradação em 488 (A) e 514nm (B). Já a irradiação em 630 nm promove uma menor degradação. Neste caso, 120 minutos de iluminação não foram suficientes para produzir os produtos caracterizados pela banda de emissão em 636 nm (Figura 24C). Enquanto em 630 nm foi observado 17% de decréscimo na banda de fluorescência do Photogem[®] em 611nm, a irradiação em 488 e 514 nm promoveu 30% e 60% de diminuição, respectivamente. Na Figura 25 pode-se observar melhor os fatos mencionados acima

Figura 25: Dependência da intensidade de fluorescência do Photogem[®] 40µg/mL em 672nm e do fotoproduto em 636nm formado após irradiação em 488 (A) e 514nm (B) por 120min em função da fluorescência do Photogem[®] em 611nm para cada tempo de irradiação. Os números à direita dos pontos são os tempos de irradiação em minutos.

4.2.1.2 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogem[®] 20µg/mL em diferentes λ irradiação

Como pode ser observado na Figura 26, assim como na Figura 22 Photogem[®] 20µg/mL é irradiado em 488, 514 e 630nm com intensidade de 50mW/cm² e observa-se a

diminuição da banda de Soret em 369nm e a diminuição das bandas Q (507, 540, 570, 620nm), seguido do aparecimento de uma nova banda em 640nm. O decaimento da banda de Soret e bandas Q também é muito mais pronunciado quando Photogem[®] é irradiado em 488 e 514nm do que em 630nm.

Figura 26: Nos gráficos A, B, e C observamos os espectros de absorção ótica de uma solução de Photogem[®] 20µg/mL em PBS, pH=7,4, c=0,5, fotodegradado com laser de argônio em 488 (A) e 514nm (B) e em laser de corante bombeado pelo laser de argônio em 630nm (C) com tempos de irradiação de 0-120min, $I = 50\text{mW/cm}^2$, (Dose de irradiação de 0-360J/cm²).

De acordo com a cinética de primeira ordem para o “photobleaching” (equação 4) e para a formação de fotoprodutos (equação 5), utilizadas anteriormente para Photogem[®] 40µg/mL, realizou-se o ajuste cinético para Photogem[®] 20µg/mL (Tabela 5).

Tabela 5: Parâmetros para o “photobleaching” do Photogem[®] 20µg/mL (equação 4) e para a formação de fotoprodutos (equação 5) do Photogem[®] irradiado em 488, 514 e 630nm com dose de irradiação de 0-360J/cm².

Irradiação (nm)	Processo	τ , min.	$\Delta A_{\max.}$	A_{Soret}^{∞} ou A_{640}^0
488	Fotodegradação	33±7	0,13±0,07	0,62±0,18
	Formação de fotoprodutos	30±3	0,009±0,002	0,008±0,003
514	Fotodegradação	38±10	0,18±0,11	0,57±0,12
	Formação de fotoprodutos	24±8	0,006±0,003	0,008±0,002
630	Fotodegradação	27±5	0,07±0,07	0,62±0,02
	Formação de fotoprodutos	32±12	0,003±0,001	0,008±0,001

De acordo com a Tabela 5 as constantes de tempo de fotodegradação e formação de fotoprodutos do Photogem[®] são praticamente as mesmas quando Photogem[®] é irradiado em 488, 514 e 630nm. Isto é com a diminuição da concentração do FS, os processos de degradação e formação de fotoprodutos tornam-se mais rápidos.

Pode-se observar que a degradação é maior em 514nm (24%) seguida de 488nm (17%) e 630nm (9%). Deve se ressaltar que a irradiação de Photogem[®] em 630nm em ambas as concentrações provocou uma degradação máxima de 10%. A formação de fotoprodutos maior em 488nm (53%) seguida de 514nm (43%) e 630nm (27%).

Para a análise do efeito da concentração nos processos de degradação e formação de fotoprodutos, a tabela 6 resume os resultados para Photogem[®] 20 e 40 µg/mL degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 50mW/cm².

Tabela 6: Parâmetros relativos à absorbância para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{120\text{máx}}/\Delta A_{\text{máx}} \times 100$) em porcentagem (%) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ) para Photogem[®] 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ em PBS degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 50mW/cm² com tempo variando de 0-120min.

Irradiação (nm)	Processo	Concentração utilizada			
		20 $\mu\text{g/mL}$		40 $\mu\text{g/mL}$	
		τ , min.	$\frac{\Delta A_{120\text{máx}}}{\Delta A_{\text{máx}}} \times 100$	τ , min.	$\frac{\Delta A_{120\text{máx}}}{\Delta A_{\text{máx}}} \times 100$
488	Fotodegradação	33 $\pm$ 7	17%	123 $\pm$ 23	23%
	Formação de fotoprodutos	30 $\pm$ 3	46%	207 $\pm$ 33	50%
514	Fotodegradação	38 $\pm$ 10	22%	89 $\pm$ 17	35%
	Formação de fotoprodutos	24 $\pm$ 8	42%	43 $\pm$ 8	58%
630	Fotodegradação	27 $\pm$ 5	9%	32 $\pm$ 10	11%
	Formação de fotoprodutos	32 $\pm$ 12	29%	146 $\pm$ 42	31%

De acordo com a Tabela 6 pode-se observar que tanto as constantes de tempo como a eficiência de degradação e formação de fotoprodutos é maior com o aumento da concentração de Photogem[®] de 20 para 40 $\mu\text{g/mL}$. Pode-se dizer que em menores concentrações, os processos são mais rápidos. Em ambas as concentrações, a degradação e formação de fotoprodutos é maior em 514 seguida de 488 e 630nm. De acordo com estes resultados pode-se dizer que o aumento da concentração proporciona maiores diferenças nas constantes de tempo e eficiência de degradação e formação de fotoprodutos.

Como observado anteriormente os mecanismos envolvidos no processo de degradação quando Photogem[®] é irradiado em 514 e 630nm são diferentes, comparando-se Photogem[®] 20 $\mu\text{g/mL}$ em ambos os comprimentos de onda de irradiação, observou-se que os processos de degradação tornam-se mais lentos para a degradação em 514nm enquanto que a formação do fotoproduto são mais rápidos em 630nm, apesar de que as constantes dos processos de degradação e formação dos fotoprodutos apresentarem-se invertidas em relação

a concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, a eficiência de degradação e formação dos fotoprodutos é maior em 514nm.

A análise espectroscópica por fluorescência foi realizada para Photogem[®] 20 $\mu\text{g/mL}$ em PBS degradado com laser em 488, 514 e 630nm à temperatura ambiente, com intensidade de 50mW/cm² e tempo de irradiação variando de 0-120min (Figura 27).

Figura 27: Espectros de fluorescência para Photogem[®] 20 $\mu\text{g/mL}$ em PBS (pH=7,4) fotodegradado com laser de argônio em 488 e 514nm (A e B) e laser de corante bombeado pelo laser de argônio em 630nm (C) com tempos de irradiação de 0-120min, $I = 50\text{mW/cm}^2$, (Dose de irradiação de 0-360J/cm²). $\lambda_{\text{exc}}=507\text{nm}$, $c=0,5\text{cm}$.

Assim como para Photogem[®] 40µg/mL, Photogem[®] 20µg/mL apresentou uma maior degradação em 514 seguida de 488 e 630nm. A formação do fotoproduto em 636nm apenas aparece para a irradiação em 488 e 514nm.

Observa-se que o crescimento da emissão em 636 nm corresponde diretamente à diminuição da fluorescência em 611 nm (Figura 28). O aumento de emissão em 636 nm foi observado até os 120 minutos de irradiação para a degradação em 488 (A) e 514nm (B), para a degradação em 630 nm 120 minutos de iluminação não foram suficientes para produzir os produtos caracterizados pela banda de emissão em 636 nm. Enquanto em 630 nm foi observado 20% de decréscimo na banda de fluorescência do Photogem[®] em 611nm, a irradiação em 488 e 514 nm promoveu 28% e 35% respectivamente. Deve se ressaltar que a irradiação de Photogem[®] em menores concentrações diminuiu a degradação da banda em 611nm em 488 e 514nm e aumentou em 630nm, o que pode estar relacionado às diferenças no mecanismo de degradação quando a irradiação ocorre no vermelho. Na Figura 28 observamos melhor os fatos mencionados.

Figura 28: Dependência da intensidade de fluorescência do Photogem[®] 20µg/mL em 672nm e do fotoproduto em 636nm formado após irradiação em 488 (A) e 514nm (B) por 120min em função da fluorescência do Photogem[®] em 611nm para cada tempo de irradiação. Os números à direita dos pontos são os tempos de irradiação em minutos.

Comparando-se a dependência da intensidade de irradiação para Photogem[®] de 20µg/mL para 40, pode-se dizer que em 488 e 514nm o crescimento da emissão da banda do

fotoproduto correlacionou-se com a degradação da banda do FS em 611nm até 90min, degradando-se a partir de então. Nota-se que com o aumento da concentração ocorrem 3 processos visualizados somente na espectroscopia de fluorescência, a degradação do FS e formação do fotoproduto bem como a própria degradação do fotoproduto formado. Em baixa concentração observa-se que a formação da banda em 636nm esta correlacionada com a degradação da banda em 611nm, isto é quanto maior a degradação maior a quantidade de fotoprodutos formado, no entanto este tempo de irradiação foi insuficiente para ocorrer uma maior degradação e formação de fotoprodutos. Pode-se dizer que a eficiência de degradação e formação de fotoprodutos esta correlacionada com a concentração do FS, bem como com a intensidade, tempo e comprimento de onda de irradiação.

Já para Photogem degradado no vermelho em ambas as concentrações, a formação do fotoproduto é insignificante.

4.2.2 ESTUDO DA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEM[®] NO UV-VIS

4.2.2.1 Propriedades espectrais do Photogem[®] degradado no ultravioleta

4.2.2.1.1 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogem[®]

Figura 29: Espectros de absorção ótica do Photogem[®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 351nm, com tempo de irradiação variando de 0-180min, $I=150\text{mW}/\text{cm}^2$ (Dose de irradiação de 0-1620J/cm²), $c=0,5\text{cm}$.

Pode-se observar na Figura 29 que a degradação do Photogem[®] com laser no ultra violeta (351nm) causa a degradação da banda de Soret em 369nm bem com a formação de fotoprodutos em 640nm até 100min, que degrada-se após este tempo.

Figura 30: Espectros de fluorescência do Photogem[®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 351nm, com tempo de irradiação variando de 0-180min, $I=150\text{mW/cm}^2$ (Dose de irradiação de 0-1620J/cm²). Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e $\lambda=507\text{nm}$ (B), $c=0,5\text{cm}$.

Na Figura 30 verifica-se as diferenças espectrais por fluorescência quando Photogem[®] é excitado em 369 (A) e em 507nm (B). Com a excitação em 369nm, pode-se observar a degradação das bandas características do Photogem[®] em 611 e 672nm, bem como o aparecimento da banda relativa ao fotoproduto em 636nm além de uma outra banda em 461nm. Com a excitação em 507nm (varredura de 517-700nm), observa-se apenas as duas bandas do Photogem[®] e a do fotoproduto em 636nm. A banda em 461nm aparece apenas com a irradiação no ultra violeta e em altas doses de irradiação.

Figura 31: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem[®] 25µg/mL em 461 e 636nm formado após irradiação com LED em 630nm de 0-180min em função da fluorescência do Photogem[®] em 611 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e $\lambda=507\text{nm}$ (B). Os números à direita dos pontos representam os tempos de irradiação (minutos).

Na Figura 31A observa-se que a formação do fotoproduto em 636nm cruza com a formação do fotoproduto em 461nm no tempo de 150 min, o que indica que neste tempo a formação é igual para ambos os fotoprodutos e a partir de então começa a formar apenas o fotoproduto em 461nm. Na Figura 31B observa-se a formação do fotoproduto até 100 min e depois sua posterior degradação. Estes resultados sugerem a fotodegradação dos fotoprodutos a um outro composto com rendimento quântico menor. Tanto na Figura 31A e 31B, verificamos que o crescimento da emissão em 636 nm não corresponde diretamente à diminuição da fluorescência em 611nm, uma vez que a banda em 636nm aumenta até 100 min para os dois comprimentos de onda de excitação. No entanto, quanto maior a degradação na banda em 611nm maior a formação da banda em 461nm. Observa-se que ocorre um decréscimo na banda em 611nm de 51% em ambas as excitações.

4.2.2.2 Propriedades espectrais do Photogem[®] degradado no verde (514nm)

4.2.2.2.1 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogem[®]

Figura 32: Espectros de absorção ótica do Photogem[®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com tempo de irradiação variando de 0-180min, $I=150\text{mW/cm}^2$ (Dose de irradiação de 0-1620J/cm²) e $c=0,5\text{cm}$.

Observa-se na Figura 32 que Photogem[®] submetido à degradação com laser em 514nm, leva à degradação da banda de Soret em 369nm bem com à formação de fotoprodutos em 640nm. É fácil observar que a banda em 640nm (fotoproducto) parece aumentar mais do que quando Photogem[®] é degradado em 351nm.

A Figura 33 apresenta a análise por fluorescência do Photogem[®] fotodegradado em 514nm com excitação em 369nm (A) e excitação em 507nm (B).

Figura 33: Espectros de fluorescência do Photogem[®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com tempo de irradiação variando de 0-180min, $I=150\text{mW}/\text{cm}^2$ (Dose de irradiação de 0-1620J/cm²). Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e $\lambda=507\text{nm}$ (B) e $c=0,5\text{cm}$.

Na Figura 33 verifica-se que o espectro de fluorescência do Photogem[®] é semelhante quando excitado em 369 (A) e em 507nm (B). Ocorre a degradação das bandas do Photogem[®] em 611 e 672nm bem como o aparecimento de uma banda em 636nm (fotoproducto), não ocorrendo a formação da banda em 461nm como foi observado quando irradiado no UV.

Figura 34: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproducto do Photogem[®] 25µg/mL em 636nm formado após irradiação com LED em 630nm de 0-180min em função da fluorescência do Photogem[®] em 611 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e $\lambda=507\text{nm}$ (B). Os números à direita dos pontos são os tempos de irradiação em minutos.

Na Figura 34A e B observa-se que a formação do fotoproduto em 636nm aumenta até 20 min e depois parece ocorrer sua posterior degradação. Observa-se que o decréscimo na banda em 611nm é de 84 e de 87%.

Tanto na Figura 34A e 34B, verifica-se que o aumento da emissão em 636 nm não corresponde diretamente à diminuição da fluorescência em 611nm, uma vez que a banda em 636nm aumenta até 20 min para os dois comprimentos de onda de excitação e a degradação ocorre durante o tempo todo do experimento.

O ajuste cinético da absorbância na banda de Soret (369nm) e na banda de formação do fotoproduto (640nm) foi realizado em função do tempo de degradação para Photogem[®] irradiado em 351 e 514nm. Os valores obtidos estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros relativos à absorção para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ) para Photogem[®].

. Irradiação (nm)	Processo	τ , min	$\Delta A_{\max.}$	A_{Soret}^{∞} ou A_{640}^0
351	Fotodegradação 369nm	112±28	0,710±0,106	0,14±0,08
	Formação de fotoprodutos 640nm	31±6	0,006±0,0003	0,008±0,0001
	Degradação dos fotoprodutos 640nm	22±2	0,0040±0,0001	0,011±0,001
514	Fotodegradação 369nm	65±3	0,53±0,07	0,31±0,07
	Formação de fotoprodutos 640nm	10,000±0,001	0,018±0,001	0,012±0,001
	Degradação dos fotoprodutos 640nm	107±21	0,0140±0,0030	0,010±0,003

Para a análise do efeito do comprimento de onda de irradiação nos processos de degradação e formação de fotoprodutos, a tabela 8 resume os resultados para Photogem[®] 25µg/mL degradado com laser em 351 e 514nm com intensidade de irradiação de 150mW/cm².

Tabela 8: Parâmetros relativos à absorbância para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{18\text{máx}} / A_{\text{máx}} \times 100$) em porcentagem (%) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ) para Photogem[®] 25 $\mu\text{g/mL}$ em PBS degradado com laser em 351 e 514nm com intensidade de irradiação de 150mW/cm² com tempo variando de 0-180min.

Processos envolvidos	Intensidade de irradiação : 150mW/cm ²			
	25 $\mu\text{g/mL}$			
	Laser em 351nm		Laser em 514nm	
	τ , min	$\frac{\Delta A_{180\text{máx}}}{\Delta A_{\text{máx}}} \times 100$	τ , min	$\frac{\Delta A_{18\text{máx}}}{\Delta A_{\text{máx}}} \times 100$
Degradação 369nm	112	68%	65	64%
Formação dos fotoprodutos 640nm	31	41%	10	65%
Degradação dos fotoprodutos 640nm	22	26%	107	47%

De acordo com esta tabela a degradação da banda em 369nm para Photogem[®] irradiado em 351 é aproximadamente a mesma no entanto mais lenta do que em 514nm. Em relação à formação de fotoprodutos, ela é maior e mais rápida para PG irradiado em 514nm, e a degradação do fotoproduto formado apesar de maior neste comprimento de onda, apresenta um processo mais lento.

Esta rápida formação do fotoproduto em 636nm com laser em 514nm ($\tau=10\text{min}$) deve-se ao fato de que neste comprimento de onda de irradiação ocorre somente a formação de fotoprodutos no visível (fotoprodutos tipo clorina em 640nm), no entanto com a irradiação em 351nm (maior degradação) ocorre além da formação destes fotoprodutos, a formação dos fotoprodutos no ultra violeta, que podem ser originados da desagregação do FS como também da possível quebra do macrociclo da porfirina, o que enfatiza o fato da mais lenta e menor formação de fotoprodutos com a irradiação no ultravioleta.

4.2.3 EFEITO DA POTÊNCIA ELEVADA NA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN[®]

4.2.3.1 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogem[®] 50µg/mL degradado em 514nm

Figura 35: Espectros de absorção ótica do Photogem[®] 50µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com potência de 1000mW, com tempos de irradiação de 0-150min, $I=500\text{mW/cm}^2$, Dose de irradiação de 0-450J/cm², $c=0,2\text{cm}$.

Pode-se observar na Figura 35 que a degradação com laser em 514nm do Photogem[®] em potência elevada (1000mW), leva a diminuição da banda de Soret em 369nm, bem com a formação do fotoproduto (0-20min) e sua posterior degradação em 640nm.

O ajuste cinético da absorbância na banda de Soret e na banda de formação do fotoproduto foi realizado em função do tempo de degradação. Os valores encontrados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros do Photogem[®] 50µg/mL para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos para a irradiação por (0-150min).

Irradiação (nm)	Processo	τ , min	ΔA_{max}	$A_{\text{Soret}}^{\infty}$ ou A_{640}^0
514	Fotodegradação 369nm	32±10	0,60±0,04	0,40±0,04
	Formação de fotoprodutos 640nm	8,000±0,001	0,001±0,0001	0,007±0,001
	Degradação de fotoprodutos 640nm	75±16	0,005±0,0004	0,014±0,0004

Na tabela 9, verifica-se que o tempo de degradação na banda de Soret em 369nm para Photogem[®] é de 60% para 150 min.

A irradiação em altas doses de luz diminui a quantidade de oxigênio em solução fato importante uma vez que participa dos processos de degradação como também de formação dos fotoprodutos [71, 77]. O tempo de formação dos fotoprodutos é rápido (14%), no entanto forma-se mais fotoproduto no tempo infinito. A degradação do fotoproduto é mais lenta em tono de 26%.

A Figura 36 apresenta o espectro de fluorescência do Photogem[®] excitado em 369nm, onde observa-se que ocorre o decaimento das bandas em 611 e 672nm bem como a formação do fotoproduto em 636nm 0-20min e sua posterior degradação. A formação do fotoproduto em 461nm ocorre de 0-150min.

Figura 36: Espectros de fluorescência do Photogem[®] 50µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com potência de 1000mW, com tempos de irradiação de 0-150min, $I=500\text{mW}/\text{cm}^2$, Dose de irradiação de 0-450J/cm². Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e 507nm (B), $c=0,2\text{cm}$.

As Figuras 36A e B apresentam os espectros de fluorescência de Photogem[®] excitado em 369nm e 507nm respectivamente, onde observa-se que ocorre o decaimento da banda em 611 e 672nm bem como a formação do fotoproduto em 636nm e sua posterior degradação e a formação de outro fotoproduto na Figura 36A com banda em 461nm (0-

150min). Juntamente com a banda em 461nm, observa-se uma banda em 422nm que tende a se juntar a banda em 461nm com o tempo de irradiação.

Figura 37: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem[®] 25µg/mL em 461 e 636nm formado após irradiação com LED em 630nm de 0-150min em função da fluorescência do Photogem[®] em 611 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e $\lambda=507\text{nm}$ (B). Os números à direita dos pontos são os tempos de irradiação em minutos.

Na Figura 37A e B, verifica-se que o crescimento da emissão em 636 nm não corresponde diretamente à diminuição da fluorescência em 611nm, uma vez que a banda em 636nm aumenta até 20 min de irradiação, começando a se degradar a partir de então. A formação do fotoproduto em 461nm observada na Figura 37A ocorre no tempo de irradiação (150 min) e corresponde à diminuição da banda em 611nm. O que significa que com a degradação aumenta a formação do fotoproduto em 461nm. Observa-se que ocorre um decréscimo na banda em 611nm de 45% (Figura 37A) e 50% (Figura 37B).

4.2.3.2 Espectro de absorção ótica e de Fluorescência do Photogem[®] 25µg/mL

A análise espectroscópica por absorção ótica foi realizada com Photogem[®] 25µg/mL fotodegradado em PBS, com laser em 514nm, com potência de 1000mW, com tempo variando de 0 a 150min (Figura 38).

Figura 38: Espectros de absorção ótica do Photogem[®] 25µg/mL em PBS. Irradiação em laser em 514nm com P=1000mW, com tempos de irradiação de 0-150min, I= 500mW/cm², Dose de irradiação de 0-450J/cm², c=0,2cm.

Pode-se observar na Figura 38 que quando Photogem[®] 25µg/mL é irradiado com laser em 514nm em potência elevada (1000mW), ocorre a degradação da banda de Soret, bem como a formação do fotoproduto e sua posterior degradação em 640nm.

O ajuste cinético da absorbância na banda de Soret e na banda de formação do fotoproduto foi realizado em função do tempo de degradação. Os valores encontrados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Parâmetros para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{\text{max.}}$, $A_{\text{Soret}}^{\infty}$, A_{640}^0) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ), para Photogem[®] 25µg/mL em PBS degradado com laser em 514nm com Potência de 1000mW (Intensidade de 500mW/cm²) com tempo variando de 0-150min.

Irradiação (nm)	Processo	τ , min	$\Delta A_{\text{max.}}$	$A_{\text{Soret}}^{\infty}$ ou A_{640}^0
514	Fotodegradação 369nm	62±16	0,36±0,03	0,11±0,03
	Formação de fotoprodutos 640nm	8,000±0,001	0,001±0,0001	0,002 ±0,001
	Degradação de fotoprodutos 640nm	136±34	0,009±0,001	0,004±0,001

A eficiência de degradação da banda de Soret em 369nm para Photogem[®] 25µg/mL é de 77% e a formação de fotoproduto e degradação do fotoproduto é de 33 e 58%.

A degradação do fotoproduto é mais lenta que a sua própria formação. A degradação do Photogem[®] é maior e mais rápida do que a degradação do fotoproduto formado.

Figura 39: Espectros de fluorescência do Photogem[®] 25µg/mL em PBS. Irradiação cm laser em 514nm com potência de 1000mW, com tempos de irradiação de 0-150min, $I=500\text{mW/cm}^2$, Dose de irradiação de 0-450J/cm². Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e 507nm (B) e $c=0,5\text{cm}$.

A Figura 39A apresenta o espectro de fluorescência de Photogem[®] excitado em 369nm, onde observa-se que ocorre o decaimento da banda em 611 e 672nm bem como a formação e degradação da banda em 636nm. A formação de um fotoproduto em 461nm ocorre de 0-150min. A banda em 422nm observada anteriormente na Figura 36A, aparece mais nítida na Figura 39A, e tende a se juntar a banda em 461nm com o tempo de irradiação. A Figura 39B apresenta o espectro de fluorescência de Photogem[®] excitado em 507nm, onde observamos que ocorre o decaimento da banda em 611 e 672nm bem como a formação do fotoproduto em 636nm e sua posterior degradação.

A banda do fotoproduto em 461nm (Figura 39A) somente observada quando Photogem[®] é submetido a altas potências de irradiação, apresentou um aumento na sua formação com a degradação da banda em 611nm, no entanto o crescimento desta banda foi maior para Photogem[®] irradiado na concentração 25µg/mL do que na concentração de 50µg/mL (Figura 36A). Este comportamento deve-se ao fato que soluções menos concentradas, apresentam no equilíbrio agregado/monômero uma maior quantidade de

espécies monoméricas que, sob o efeito de alta intensidade de luz, podem vir a degradar com maior facilidade o anel tetrapirrólico da porfirina [71, 74, 76, 77]. Acredita-se que este fotoproduto em 461nm apareça em decorrência da quebra do anel porfírico, uma vez que somente aparece quando a solução do Photogem[®] é irradiado em comprimentos de onda de maior energia (laser no ultravioleta) e irradiação em elevadas potências.

Figura 40: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem[®] 25µg/mL em 636nm formado após irradiação com LED em 630nm de 0-150min em função da fluorescência do Photogem[®] em 611 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: $\lambda=369\text{nm}$ (A) e $\lambda=507\text{nm}$ (B). Os números à direita dos pontos são os tempos de irradiação em minutos.

Observa-se na Figura 40A e B que ocorre a formação do fotoproduto em 636nm ate 20 min de irradiação, começando a se degradar a partir de então. A formação do fotoproduto em 461nm só é observada com excitação em 369nm (Figura 39A) e ocorre durante o tempo de irradiação (0-150 min). O aumento da banda de emissão do fotoproduto em 461nm corresponde à degradação da banda em 611nm. Observa-se que ocorre um decréscimo na banda em 611nm de 73% (Figura 39A) e 86% (Figura 39B).

De acordo com a Figura 40A, no tempo de 60 min a degradação da banda do fotoproduto em 636nm corresponde à mesma emissão da banda do fotoproduto em 461nm, o que é um indicativo que neste tempo a proporção dos 2 fotoprodutos é a mesma. No entanto o

aumento do tempo de irradiação (60-150 min) leva a uma maior degradação do fotoproduto em 636nm e ao aumento da banda do fotoproduto em 461nm.

Para a análise do efeito da concentração nos processos de degradação e formação de fotoprodutos, a tabela 11 resume os resultados para Photogem[®] 25 e 50 µg/mL degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 500mW/cm².

Tabela 11: Parâmetros relativos à absorbância para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{150\text{máx}} / \Delta A_{\text{máx}} \times 100$) em porcentagem (%) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ) para Photogem[®] 25 e 50µg/mL em PBS degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 500mW/cm² com tempo variando de 0-150min.

Irradiação (nm)	Processo	Concentração utilizada			
		25µg/mL		50µg/ mL	
		τ , min.	$\frac{\Delta A_{150\text{máx}}}{\Delta A_{\text{máx}}} \times 100$	τ , min.	$\frac{\Delta A_{150\text{máx}}}{\Delta A_{\text{máx}}} \times 100$
514	Fotodegradação	86	63%	32	60%
	Formação de fotoprodutos	8	70%	8	55%
	Degradação dos fotoprodutos	136	45%	75	22%

De acordo com a tabela 11 pode-se observar que a constante de tempo de degradação do Photogem[®] diminui com o aumento da concentração indicando que o processo de degradação é mais rápido. Para a eficiência de degradação do FS e do seu fotoproduto, pode-se dizer que é maior em menores concentrações. Em relação a constante de formação do fotoproduto, esta é a mesma em ambas as concentrações, no entanto a eficiência de formação do fotoproduto é maior em menores concentrações do FS. Ao contrário da tabela 6, em que em baixas concentrações os processos são mais rápidos, na tabela 11 verificamos que em altas doses de irradiação, os processos são mais rápidos em altas concentrações.

Para a análise do efeito da concentração e intensidade de irradiação nos processos de degradação e formação de fotoprodutos, a tabela 12 resume os resultados da tabela 6, 8 e 11.

Tabela 12: Parâmetros relativos à absorbância para a eficiência de degradação e de formação de fotoprodutos ($\Delta A_{\text{reação máx}} / \Delta A_{\text{máx}}$) em porcentagem (%) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ) para Photogem[®] 20 e 40 e 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ em PBS degradado com laser em 514nm com intensidade de irradiação de 50, 150 e 5000 mW/cm^2 com tempo variando de 0-120min.

Variação de 0 a 120min.										
Processos envolvidos	Intensidade de irradiação									
	50mW/cm ²				150mW/cm ²		500mW/cm ²			
	Tempo de irradiação variando de 120, 150 e 180 min									
	20µg/mL		40µg/mL		25µg/mL		25µg/mL		50µg/mL	
	τ, min	% _{120min}	τ, min	% _{120min}	τ, min	% _{180min}	τ, min	% _{150min}	τ, min	% _{150min}
Degradação 369nm	38	22%	89	35%	65	64%	86	63%	32	60%
Formação dos fotoprodutos 640nm	24	42%	43	58%	10	65%	8	70%	8	55%
Degradação dos fotoprodutos 640nm	Não ocorre				107	47%	136	45%	75	22%

Comparando soluções de PG 20 e 25 $\mu\text{g/mL}$ na intensidade de irradiação de 50 para 500 mW/cm^2 , nota-se que a eficiência de degradação aumenta e o processo torna-se mais lento, já a eficiência de formação de fotoprodutos é maior e o processo torna-se mais rápido. Observa-se que na intensidade de irradiação de 500 mW/cm^2 ocorre a degradação do fotoproduto não observada em menor intensidade de irradiação. Em relação a PG nas concentrações de 20 e 25 $\mu\text{g/mL}$, observa-se que na intensidade de irradiação de 150 mW/cm^2 , PG apresenta-se em um processo de transição entre uma baixa e alta intensidade de irradiação, uma vez que apresenta uma maior eficiência de degradação tornando-se um processo mais lento (comportamento similar em altas intensidades de irradiação), no entanto apresenta uma maior eficiência de formação dos fotoprodutos (comportamento similar em baixas intensidades de irradiação), sendo que o tempo é aproximadamente equivalente em altas potências.

Para PG nas concentrações de 40 e 50µg/mL na intensidade de irradiação de 50 para 500mW/cm², verifica-se o aumento da eficiência de degradação e o processo torna-se mais rápido), já a eficiência de formação de fotoprodutos é praticamente a mesma e o processo torna-se mais rápido. Na intensidade de 500mW/cm² ocorre a degradação do fotoproduto não observada em menor intensidade de irradiação.

Soluções de PG em maiores concentrações irradiadas em baixa intensidade de luz, apresentam processos de degradação e formação de fotoprodutos mais lentos, no entanto a eficiência de ambos os processos aumenta. Já em maiores concentrações irradiadas em alta intensidade de luz, os processos de degradação (FS e do fotoproduto formado) tornam-se mais rápidos, no entanto a eficiência dos processos de degradação diminuem. Já a constante de tempo de formação do fotoproduto é a mesma em ambas as concentrações, no entanto a eficiência de formação diminui. Deste modo pode-se afirmar que o fator concentração e intensidade de irradiação estão ligados diretamente aos processos de degradação e formação de fotoprodutos que ocorrem na molécula.

4.2.4 ESTUDO DA ESTABILIDADE DO PHOTOGEM[®] APÓS DEGRADAÇÃO INDUZIDA.

Para verificar se ocorrem alterações espectroscópicas com o tempo de armazenamento do Photogem[®] fotodegradado, acompanhou-se a cada mês ao longo de 6 meses os espectros de absorção do Photogem[®] na concentração de 50µg/mL em PBS. Durante este tempo, como visualizado na Figura 41, a solução não apresentou mudanças em suas propriedades óticas tendo um decréscimo de 7% no valor de absorbância na Banda de Soret.

Figura 41: A) Espectros de absorção ótica do Photogem® 50µg/mL fotodegradado em PBS à temperatura ambiente, pH=7.4, com laser em 514nm, $I=50\text{mW/cm}^2$, $t=20\text{min}$, caminho ótico=0,2 cm. **B)** Variação da absorbância do Photogem® em 369nm em função do tempo de armazenamento após a degradação com laser.

Desta forma pode-se concluir que a solução de Photogem® fotodegradada é estável mesmo após 6 meses de armazenamento já que $\Delta A_{369\text{nm}}$ é da ordem de 3%, sendo que esta porcentagem não deve ser considerada como variação já que este valor está dentro da faixa do erro experimental (0,02-0,05) do aparelho de absorção ótica utilizado.

4.2.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO DE PHOTOGEN® NA FOTODEGRADAÇÃO

É bem descrito na literatura que derivados de hematoporfirina em solução aquosa existem como uma mistura de monômeros e agregados [71, 77, 86, 89]. Os derivados de hematoporfirina apresentam banda de Soret com máximo de absorção em torno de 370nm (banda atribuída aos agregados) e banda de absorção com máximo em torno de 395nm (banda atribuída às espécies monoméricas). Em concentrações altas, os derivados de hematoporfirinas apresentam máximo em 370nm e em soluções diluídas em 395nm [85].

De acordo com a Figura 19 e 20, Photogem® na menor concentração usada

não apresentou deslocamento da banda de Soret de 370 para 395nm.

De acordo com Rotomskis et al [86], a formação de fotoprodutos para Hp e HpD é seguida pela degradação da banda de Soret em 370nm e o aparecimento de uma banda de absorção degradada com máximo de absorção em 395nm, refletindo o desaparecimento dos agregados em solução. No entanto de acordo com os experimentos de degradação para Photogem[®] em PBS, o deslocamento da banda de Soret em decorrência da degradação não foi observado.

Pode-se dizer que Photogem[®] no intervalo de concentrações utilizado (1,25-100µg/mL), apresenta predomínio de espécies agregadas. As espécies monoméricas quando submetidas à iluminação, apresentam uma fotoestabilidade diferente das espécies agregadas [86]. Isto é um indicativo que as diferenças entre os derivados de hematoporfirina consistem nas proporções existentes de monômeros e agregados e sua fotoestabilidade está relacionada com a capacidade do composto sofrer fotomodificações e deste modo provocar o desequilíbrio na proporção entre monômeros e agregados [105]. Assim, a posição da banda de Soret parece depender da concentração de porfirina [85].

A taxa de degradação é significativamente dependente da concentração da porfirina nas células uma vez que a molécula de FS é predominantemente degradada pelos seus oxigênios (singlete) gerados [97].

A eficiência de formação de fotoprodutos está relacionada a esta proporção de espécies agregadas em solução, que quando elevada ou diminuída, pode vir a influenciar a fotodegradação e possível formação de fotoprodutos [75].

4.2.6 EFEITO DO MEIO NA FOTODEGRADAÇÃO DO PHOTOGEN[®]

4.2.6.1 Espectro de absorção ótica

A Agregação de porfirinas pode ser facilmente estudada por espectroscopia de absorção no UV-Vis acompanhando-se o deslocamento da banda de Soret de 400 (monômeros) para 370nm (agregados), ou por espectroscopia de fluorescência através do aumento da intensidade na banda de emissão dos monômeros com emissão máxima em torno de 625nm [93].

A análise espectroscópica por absorção ótica (Figura 42) foi realizada para Photogem[®] 20µg/mL em PBS (pH 7,4) degradado em temperatura ambiente com LED em 630nm por tempo de irradiação variando de 0-360min, $I=25\text{mW}/\text{cm}^2$.

Figura 42: Espectros de absorção ótica do Photogem[®] 20µg/mL em PBS degradado com LED em 630nm por 360min, $I=25\text{mW}/\text{cm}^2$ (Dose de irradiação de 0-540J/cm²), $c=0,2\text{cm}$.

Na Figura 42 verifica-se a degradação na banda de Soret em 369nm e nas bandas Q, bem como o deslocamento da última banda Q para o vermelho devido à formação de uma nova banda em 640nm (banda do fotoproduto). Observa-se também para Photogem[®], uma banda de absorção no ultravioleta (214nm), que aumenta com a irradiação, o que pode ser um indício da formação da banda característica de fotoprodutos mono e di pirróis. Outro

fato interessante é que, com a irradiação do Photogem[®], todas as bandas Q aumentam a absorbância, sendo que as bandas de comprimentos de onda menores deslocam-se para o azul e as outras duas deslocam para o vermelho, o que pode sugerir desagregação [85].

De acordo com os valores obtidos através do ajuste cinético das equações 4 e 5 para Photogem[®] 20µg/mL irradiado em 630nm (Figura 42), pode-se dizer que os processos de degradação e formação dos fotoprodutos tornam-se mais lentos. Em relação à eficiência de degradação e formação de fotoprodutos esta aumenta em torno de 2 vezes.

Em solução aquosa, as porfirinas existem como uma mistura em equilíbrio de espécies monoméricas e agregadas. Espécies monoméricas e agregadas possuem diferentes fotoestabilidade frente à iluminação [76, 77]. Deste modo a degradação do FS (com conseqüente diminuição das bandas de Soret e Q), reflete o desaparecimento de agregados de porfirinas, promovendo a desagregação da molécula, levando assim a um predomínio de espécies monoméricas. [71, 76, 77, 85, 86]. Espécies monoméricas de porfirinas excitadas pela luz podem gerar oxigênio singlete que induz subseqüentes reações fotoquímicas levando à auto-oxidação da porfirina seguida pela destruição do macrociclo (anel tetrapirrólico), bem como a formação de fotoprodutos no ultravioleta ($\lambda=240-320\text{nm}$) e tipo bilirrubina ($\lambda=545\text{nm}$), espécies intermediárias no processo de degradação. As espécies agregadas sob o efeito da luz são capazes de gerar fotoprodutos no vermelho tipo clorina ($\lambda=640\text{nm}$) e tipo bacterioclorina ($\lambda=660\text{nm}$) [71, 76, 77, 86].

Rotomskis et al [85, 86], verificaram que a formação do fotoproduto (640nm) para Hp e HpD é seguida pela degradação da banda de Soret em 370nm e do aparecimento de uma banda de absorção com máximo em 395nm (banda de Soret deslocada para o vermelho) devido ao predomínio de espécies monoméricas, refletindo o desaparecimento dos agregados em solução [71, 85, 86]. A banda de absorção em 395nm está ligada às mudanças no equilíbrio agregado-monômero bem como à banda de absorção do fotoproduto [85, 86].

No entanto este deslocamento (370-395nm) só é visualizado quando ocorrer um predomínio das espécies monoméricas do FS, ocorrendo desta forma um desequilíbrio nas proporções agregado-monômero, favorecendo a desagregação da molécula [85, 86].

A fim de investigar o efeito do meio na degradação do PG, os experimentos foram realizados também na presença dos surfactantes neutros Triton X-100 e Brij-35 como modelos simples de membrana com a finalidade de compreender melhor o tipo da interação de HpD com as membranas celulares, podendo determinar o tipo de agregado que o PG apresenta em diferentes meios. Foram analisadas as propriedades espectroscópicas do FS em micelas de Triton X-100 e Brij-35 tentando obter subsídios importantes para a compreensão da interação das porfirinas com a membrana biológica, correlacionando com sua atividade fotodinâmica [54, 92].

Segundo a literatura, a incorporação das porfirinas em micelas muda seu estado de agregação [86]; a adição de Triton X-100 reduz a formação do fotoproduto em 640nm para Dimetoxihematoporfirina (DMHp). No caso de soluções micelares de Hp e Photosan[®] (análogo de HpD) quando iluminadas, uma banda de absorção adicional é observada em 660nm [86]. Este fotoproduto tem sido observado com banda de absorção em 660nm e emissão em 660-670nm para Hp e HpD, bem como para Photofrin[®] II em cultura de células exposta à luz [97]. Na Figura 43 estão apresentados os espectros do Photogem[®] fotodegradado na presença de 1% de Triton X-100 (A) e em Brij-35 (B) nas mesmas condições.

Figura 43: Espectros de absorção ótica do Photogem® 20µg/mL degradado com LED em 630nm por 360min na presença de Triton X-100 (A) e Brij-35 (B). $I=25\text{mW/cm}^2$, Dose de irradiação variando de 0-540 J/cm^2 , $c=0,2\text{cm}$.

A presença de Triton X -100 e Brij-35 causa um deslocamento da banda de Soret de 369 para 400nm e 410, respectivamente (banda característica de monômeros) [71, 85, 86]. Este mesmo deslocamento foi observado por Rotomskis et al [85, 86] para Hp, HpD e Photosan® na presença de etanol e surfactantes.

Com a irradiação em 630nm, observa-se que ocorre a degradação da banda de Soret e bandas Q, como também a formação de uma banda em 640nm, tipo clorina (visualizada em solução de PBS), e de uma outra banda adicional em 660nm (tipo bacterioclorina), esta que surge em decorrência da modificação no estado de agregação da porfirina na presença dos dois tipos de detergentes mencionados acima [71, 74-77, 86].

Observa-se que a banda correspondente ao fotoproduto em 660nm na solução do FS em Triton X-100 irradiada por 360 min é visualmente maior e mais definida do que em solução de Brij-35. Esta possível diferença pode ser devido ao fato de que, na concentração usada (14mM), Triton X-100 está acima de sua CMC (0,24mM) 58 vezes e Brij-35, na concentração usada (5mM), está acima de sua CMC (0,09mM) 55 vezes. De acordo com estes valores pode-se dizer que ambas as soluções de surfactantes apresentam-se como uma microemulsão com predomínio de espécies desagregadas, evidenciadas pelo aparecimento da banda em 400 e 410nm respectivamente. Verifica-se, portanto que Brij-35 no tempo de irradiação apresentou uma menor eficiência de degradação e formação dos fotoprodutos em 640 e 660nm do que Triton X-100.

Importante mencionar que Triton X-100 apresenta absorvância no ultravioleta, interferindo, portanto nas medidas espectroscópicas. Já em solução de Brij-35 pode-se observar a degradação das bandas no ultravioleta em 224 e 280nm (não visualizadas em PBS), sem a interferência deste surfactante.

Segundo Rotomskis et al [77], a formação de grandes agregados ocorre em altas concentrações de porfirinas que criam condições anaeróbicas, dificultando a penetração do oxigênio que tem papel importante nos processos de degradação e formação de fotoprodutos (Figura 12), uma vez que a foto-oxidação dos Hp e HpD pelo oxigênio nos agregados é inibida [77]. No entanto de acordo com este mesmo autor, não houve evidências na correlação entre a eficiência da formação de fotoprodutos e o estado de agregação das porfirinas. Além disso, o estado de agregação resulta em mudanças na formação de um novo fotoproduto em 660nm [86]. Estas informações corroboram com os resultados obtidos uma vez que a formação dos fotoprodutos para Photogem[®] ocorre na presença de surfactantes.

Segundo alguns autores, estes fotoprodutos são gerados por tipos específicos de agregados. No caso do fotoproduto em 640nm, este estaria limitado à presença do

agregado tipo “sanduíche” (agregado H) e o fotoproduto em 660nm estaria limitado à presença do agregado tipo “linear ligado covalentemente” (agregado J) [71, 75-77, 85, 86]. Pode-se dizer que, dependendo do meio, estes fotossensibilizadores podem apresentar diferentes estados de agregação.

Segundo Streckyte et al [86] o derivado de hematoporfirina Photosan[®] apresenta agregado com estrutura conformacional tipo “sanduíche” e tipo “linear”. Deste modo Photogem[®] e Photofrin[®] derivados de hematoporfirina similares ao Photosan[®], por apresentarem características espectroscópicas semelhantes, podem vir a apresentar o mesmo tipo de agregado. No caso de Photogem[®], de acordo com os resultados espectroscópicos obtidos nas Figuras 42 e 43, pode se dizer que apresenta agregado tanto do tipo “sanduíche” quanto do tipo “linear”.

A partir dos resultados obtidos, pode-se dizer que a banda de absorção do Photogem[®] em ~395nm tende a aparecer quando o FS estiver em soluções diluídas (0,5µg/mL, c=1,0cm) e na presença de surfactantes (Figura 43).

Para melhor visualização dos processos de degradação e formação dos fotoprodutos, traçaram-se as seguintes curvas cinéticas para o Photogem[®] (Figura 44).

Figura 44: Variação na absorbância do Photogem[®] em 640nm e em 369nm em PBS (A) e em Triton X-100 (B) em função do tempo de irradiação com LED em 630nm.

De acordo com os ajustes cinéticos pode-se dizer que a fotoquímica dos derivados de hematoporfirina pode ser monitorada pela normalização da decomposição e formação de fotoprodutos. Este fenômeno depende da absorção de fótons pelas moléculas do corante durante um intervalo de tempo (Equação 6).

$$\begin{aligned} \text{Absorção fóton} &\propto I_{\lambda} \times t_{\text{irradiação}} \times \varepsilon_{\lambda} \times c(t) \times \ell = \\ &= I_{\lambda} \times t_{\text{irradiação}} \times A_{\lambda}(t) \end{aligned} \quad (\text{equação 6})$$

onde I_{λ} é a intensidade de luz num dado comprimento de onda de irradiação (λ nm), $t_{\text{irradiação}}$ é o tempo de irradiação, ε_{λ} é o coeficiente de absorção do corante no comprimento de onda de irradiação, $c(t)$ é a concentração do corante, ℓ é a espessura do caminho ótico que a luz atravessa e $A_{\lambda}(t)$ é a absorbância resultante do corante. De acordo com o ajuste já realizado anteriormente (equação 4), o monitoramento da decomposição do corante pode ser realizado pela normalização da absorbância na Banda de Soret (equação 7): Assumindo uma cinética de primeira ordem:

$$\Delta A_{\text{Soret, Normalizado}} = \frac{\Delta A_{\text{Soret}}(t)}{I_{\lambda} \times A_{\lambda}(t) \times t_{\text{iluminação}}} = \Delta A_{\text{max, Soret, Normalizado}} \left(1 - \exp - \frac{t}{\tau_{\text{dec}}} \right) \quad (\text{equação 7})$$

onde, ΔA_{Soret} é a variação na absorção da banda de Soret com a iluminação, $\Delta A_{\text{max, Soret}}$ é a variação da absorbância extrapolada para o tempo infinito e τ_{dec} é a constante de tempo de decomposição do corante. A formação de fotoprodutos (equação 5) pode ser monitorada pela taxa de aumento da banda de absorção apropriada normalizada (Equação 8). Assumindo uma cinética de primeira ordem:

$$A_{\text{Produto, normalizado}} = \frac{A_{\text{Produto}}}{I_{\lambda} \times A_{\lambda} \times t_{\text{iluminação}}} = \Delta A_{\text{max, Produto, normalizado}} \left(1 - \exp - \frac{t}{\tau_{\text{Produto}}} \right) \quad (\text{equação 8})$$

onde, A_{Produto} é a absorbância da banda do fotoproduto, $\Delta A_{\text{max, Produto}}$ é a variação máxima do A_{Produto} estimada no tempo infinito e τ_{Produto} é a constante de tempo de formação do fotoproduto.

A normalização das equações 4 e 5, resultando nas equações 7 e 8 foram realizadas com o objetivo de avaliar o rendimento quântico da degradação e da formação dos fotoprodutos.

A tabela 13 apresenta os valores encontrados para as constantes de tempo e eficiência de degradação e formação do fotoproduto para Photogem[®] 20µg/mL degradado em PBS, Triton X-100 e Brij-35, respectivamente.

Tabela 13: Parâmetros para o rendimento quântico indireto dos processos de degradação e formação de fotoprodutos (ΔA_{max} , $A_{\text{Soret}}^{\infty}$, A_{640}^0) e para o tempo de degradação e formação de fotoprodutos (τ) para Photogem[®] 20µg/mL degradado com LED em 630nm por 360 min com dose de irradiação variando de 0-540J/cm².

Tipo de solução	$\lambda_{\text{da banda}}$ (nm)	Delta A_{λ}/A_{630}	τ (min)
Solução de PBS	369	8,70±1,50	139±8
	640	0,56±0,07	145±9
Solução 1%Triton X-100	400	14,30±1,00	147±16
	640	0,40±0,11	120±7
	660	0,80±0,07	127±10
Solução 0,05mM Brij-35	410	4,60±0,60	164±26
	640	0,24±0,02	155±25
	660	0,15±0,02	141±22

De acordo com a tabela 13 verifica-se que a degradação é maior em Triton X-100 seguida de PBS e Brij-35. Quanto à formação do fotoproduto em 640nm, ela é maior na ausência de surfactante, já a formação do fotoproduto em 660nm, ocorre apenas na presença de surfactante e é maior em solução de Triton X-100. Em relação as constante de tempo (degradação e formação dos fotoprodutos), pode-se dizer que não apresentam muitas

diferenças na presença e ausência de surfactante, uma vez que esta dentro da faixa de erro. Os resultados podem ser visualizados na Figura 45.

Figura 45: Eficiência de degradação das bandas de Soret (369, 400 e 410nm) e formação de fotoprodutos (bandas em 640 e 660nm) para Photogem[®] na presença e ausência de 1%Triton X-100 e Brij-35.

De acordo com a Figura 45, podemos dizer que a eficiência de degradação é maior para solução de Triton X-100 comparado com PBS (1,6vezes) e Brij-35 (3 vezes). No processo de formação do fotoproduto em 640nm, a presença do surfactante diminui cerca de 1,4 e 2,3 vezes respectivamente para de Triton X-100 e Brij-35, no entanto a presença de surfactante induz a formação de um novo tipo de fotoproduto com banda em 660nm (fotoproduto tipo bacterioclorina), o que pode sugerir que ocorre uma competição entre os dois tipos de fotoprodutos formados na presença do surfactante. Com estes resultados pode-se dizer que Photogem[®] apresenta comportamento diferente em função do meio, que afeta os processos de degradação e formação dos fotoprodutos.

4.2.6.2 Espectro de Fluorescência

A análise espectroscópica por fluorescência foi realizada para solução de Photogem[®] em PBS (Figura 46A) e em solução de Triton X-100 (Figura 46B).

Figura 46: Espectros de fluorescência do Photogem[®] 20µg/mL degradado em PBS (A) e em solução de Triton X-100 (B) com LED em 630nm por 360min, $I=25\text{mW/cm}^2$ (Dose de irradiação de 0-540J/cm²) e $\lambda_{\text{exc}}=507\text{nm}$ e 503nm respectivamente, $c=0,2\text{cm}$.

Na Figura 46A, verifica-se que ocorre a degradação das bandas de fluorescência características do Photogem[®] em PBS (611 e 672nm), bem como a formação do fotoproduto (636nm). Na presença de surfactante as bandas são deslocadas para o vermelho (622 e 689nm) e a banda do fotoproduto para 663nm. Na literatura é descrito o mesmo comportamento para Photofrin[®] e Photosan[®] [93]. A fluorescência do Photogem[®] aumenta cerca de 4 vezes na presença de surfactante, sugerindo que ocorre a desagregação do FS que afeta o equilíbrio agregado/monômero favorecendo as espécies monoméricas.

Deve-se ressaltar que o surfactante mimetiza a membrana celular o que confirma que os agregados de FSs anfífilos, no caso Photogem[®], são monomerizados pelas membranas celulares, constituídas principalmente de fosfolípidios que representam o meio lipofílico [91].

De acordo com a Figura 47A, observa-se que o crescimento da emissão de fluorescência do PG em PBS em 636 nm (fotoprodutos) não corresponde diretamente à diminuição da fluorescência em 611 nm (decréscimo na banda em 611nm de 40%), uma vez que o aumento de emissão em 636 nm foi observado até 180 minutos e então a intensidade dessa banda começou a diminuir com a irradiação. Já para Photogem[®] na presença de surfactante (Figura 47B), observa-se que o crescimento da emissão em 663 nm corresponde

diretamente à diminuição da fluorescência em 622 nm (decréscimo na banda em 611nm de 25%), sendo que o aumento da emissão em 636 nm foi observado até 360 minutos. Pode-se afirmar que a presença de surfactante neste caso diminuiu o processo de degradação, no entanto aumentou a formação do fotoproduto em 663nm.

Figura 47: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem[®] 20µg/mL em 636 (PBS) e 663nm (Triton X-100) formado após irradiação com LED em 630nm de 0-360min em função da fluorescência do Photogem[®] em 611 e 622nm para cada tempo de irradiação. Os números à direita dos pontos são os tempos de irradiação em minutos.

Na Figura 47A observa-se que a formação do fotoproduto na ausência de surfactante ocorre até 180 min, no entanto na presença de surfactante verifica-se que a formação do fotoproduto ocorre no tempo de irradiação (360 min). Outro fato interessante é que houve a degradação na banda do fotoproduto para Photogem[®] degradado em PBS, o que não aconteceu na presença do surfactante. Pode-se dizer que o surfactante influencia muito a desagregação do composto fotossensível influenciando na formação e estabilidade do fotoproduto.

Segundo outros autores [93, 107] o deslocamento da banda de Soret de 370 para 400nm ocorre em soluções de surfactantes (Triton X-100), etanol, como também em

soluções de DMSO (Dimetil sulfóxido) para Photofrin[®] e Photosan[®]. A Figura 48 apresenta o espectro do Photogem[®] fotodegradado em DMSO (Dimetil sulfóxido).

Figura 48: Espectros de absorção ótica do Photogem[®] 20µg/mL em DMSO degradado com laser em 514nm por 60min. $I=270\text{mW/cm}^2$, Dose de irradiação de 0-972 J/cm², $c=0,2\text{cm}$.

Photogem[®] em solução de DMSO apresentou o mesmo comportamento do que quando na presença de surfactante. A banda de Soret deslocou-se para o vermelho de 370 para 400nm, bem como as bandas Q (as duas de menores comprimentos de onda para o azul e as outras duas de comprimentos de onda maiores para o vermelho). Com a fotodegradação ocorre a formação do fotoproduto em 645nm, deslocado 5nm para o vermelho em solução de DMSO quando comparado às bandas em PBS e em solução de surfactantes. No entanto Photogem[®] em DMSO não apresentou banda em 660nm como em solução de surfactantes. Este deslocamento pode ser explicado pela alta solubilidade do Photogem[®] em DMSO [59] favorecendo a formação da banda na faixa do vermelho (645nm), no entanto sem ocasionar a formação da banda em 660nm (presença de surfactantes).

A análise espectroscópica por fluorescência foi realizada para uma solução de Photogem[®] 20µg/mL em DMSO degradado com laser em 514nm por 60min (Figura 49).

Figura 49: Espectros de fluorescência do Photogem[®] 20µg/mL em DMSO degradado com laser em 514nm por 60min. $I=270\text{mW/cm}^2$, Dose de irradiação de 0-972 J/cm². $\lambda_{\text{exc}}=369$ (A) e 507nm (B), $c=0,2\text{cm}$.

De acordo com a Figura 49A e B ocorre a degradação das bandas de fluorescência características do Photogem[®] em DMSO em 624 e 686nm, bem como a formação do fotoproduto em 649nm (A e B) e em 440nm (A). Deve-se salientar que a banda em 440nm apresenta 2 bandas adjacentes em 414 e 461nm que com o tempo de irradiação tende a formar a banda em 440nm. Comparando-se a Photogem[®] 20µg/mL em Triton X-100 (Figura 46B) com PG em DMSO, observa-se que a fluorescência do PG na presença de surfactante é maior do que em DMSO 1,6 vezes, indicando que a desagregação é maior na presença de Triton X-100. Esta diferença do equilíbrio agregado/monômero para PG na presença de surfactante e DMSO pode explicar o fato de PG em DMSO apresentar o deslocamento da banda de Soret de 370 para 400nm, no entanto apresentar a banda do fotoproduto em 645nm como também não apresentar a banda em 660nm.

Verifica-se que as bandas de fluorescência do Photogem[®] deslocaram-se para o vermelho, quando comparado com Photogem[®] em PBS (611, 672 e 636nm) no entanto com a degradação, a banda em 624nm desloca-se para o azul (622nm), banda característica para Photogem[®] em solução de surfactante. A banda correspondente ao fotoproduto em 636nm em

PBS desloca-se para o vermelho na presença de DMSO (649nm), já para a solução de surfactante para 663nm. Na Figura 50 observa-se melhor o comportamento descrito acima.

Figura 50: Dependência da intensidade de fluorescência do fotoproduto do Photogem[®] 20 μ g/mL em 649nm formado após irradiação com laser em 514nm de 0-60min em função da fluorescência do Photogem[®] em 624 nm para cada tempo de irradiação. Excitação: $\lambda=369$ nm (A) e $\lambda=507$ nm (B). Os números à direita dos pontos são os tempos de irradiação em minutos.

De acordo com a Figura 50A, a diminuição da banda de fluorescência do Photogem[®] em 624nm (decréscimo de 29%) corresponde ao crescimento da emissão do fotoproduto em 440 e 649nm. Na Figura 50B observamos somente o crescimento da banda do fotoproduto em 649nm que corresponde à diminuição da banda do PG em 624nm (decréscimo de 21%). Comparando o decréscimo da banda em 624nm para PG em DMSO com o decréscimo em 622 para Triton X-100 em uma dose de irradiação 2 vezes menor, verifica-se que o decréscimo é de 25% na presença de surfactante e 21% em DMSO. Isto indica que a degradação em DMSO é aproximadamente a mesma quando irradiado em uma dose 2 vezes maior, o que nos leva a concluir que os processos de degradação para PG em DMSO são prejudicados.

RESULTADOS CITOTÓXICOS

4.3 ESTUDOS CITOTÓXICOS NO ESCURO DO PHOTOGEN[®]

Foram realizados experimentos citotóxicos no escuro com Photogem[®] na concentração 40µg/mL previamente irradiado em três comprimentos de onda: 488, 514 e 630nm, em diferentes tempos e intensidades de irradiação. Os experimentos foram realizados tanto em células não tumorais (VERO) quanto em células tumorais (HEp-2). As concentrações de Photogem[®] utilizadas para o ensaio citotóxico variaram de 0–25µg/mL.

4.3.1 CITOTOXICIDADE NO ESCURO DO PHOTOGEN[®] E SEUS FOTOPRODUTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE IRRADIAÇÃO PRÉVIA.

A Tabela 14 e 15 apresenta os resultados dos ensaios citotóxicos em células não tumorais VERO para o Photogem[®] cuja fotodegradação foi induzida em três comprimentos de onda com intensidade de irradiação de 50mW/cm². Os valores de concentração inibitória média (IC₅₀) são inversamente proporcionais à citotoxicidade, ou seja, quanto maior o valor de IC₅₀, menor é a citotoxicidade.

Tabela 14: Citotoxicidade no escuro do Photogem[®] irradiado com laser em 488; 514 e 630nm para as células não tumorais VERO, tempo de incubação=18h, (n=22).

t irradiação (minutos)	Dose (J/cm ²)	λ irradiação		
		488nm (azul)	514nm (verde)	630nm (vermelho)
		IC ₅₀ (µg/mL) ± DP		
0	0	5,7 ± 0,6	5,7 ± 0,6	5,7 ± 0,6
10	30	5,8 ± 0,3	6,0 ± 0,7	6,2 ± 0,1
20	60	6,0 ± 0,3	6,2 ± 0,3	6,5 ± 0,1
30	90	6,0 ± 0,3	6,6 ± 0,5	6,9 ± 0,8
40	120	7,0 ± 0,5	8,4 ± 0,6	8,9 ± 0,5
60	180	8,4 ± 1,1	8,5 ± 0,9	9,4 ± 0,3
90	270	8,9 ± 0,3	11,4 ± 0,4	12,1 ± 0,6
120	360	10,6 ± 0,5	12,4 ± 0,5	16,4 ± 0,7

Pode-se observar que os três comprimentos de onda em que o Photogem[®] foi previamente irradiado causaram efeito similar, ou seja, diminuição da sua citotoxicidade no

escuro em células não tumorais já que os valores de IC_{50} aumentam com o aumento do tempo de irradiação, isto é com a dose de luz. Pode-se concluir que a irradiação no vermelho causa uma diminuição maior na citotoxicidade (2,8x) enquanto que este valor é de 2,2x no verde e 1,9x no azul. Estes valores correspondem em porcentagem a uma diminuição na citotoxicidade de 65, 54 e 46%. De acordo com o teste estatístico One - WAY ANOVA do software Origin 7.0, os valores encontrados para o IC_{50} do Photogem irradiado em 488nm (PGI_{irr488}), Photogem irradiado em 514nm (PGI_{irr514}) e Photogem irradiado em 630nm (PGI_{irr630}) apresentam – se diferentes com nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$).

De acordo com os dados da Tabela 4 e 5, ocorre maior formação de fotoprodutos com irradiação em 488nm seguida de 514nm e de 630nm. A tabela acima sugere que os fotoprodutos em 488nm também são mais tóxicos, provavelmente devido a sua presença em maior quantidade já que eles são espectroscopicamente similares, ou seja, absorvem em 640nm, provavelmente tipo clorina.

A Tabela 15 apresenta os valores de IC_{50} em células tumorais para o Photogem[®] cuja fotodegradação foi induzida por irradiação em três comprimentos de onda por com intensidade de irradiação de 50mW/cm².

Tabela 15: Citotoxicidade no escuro do Photogem[®] irradiado com laser em 488, 514 e 630nm para a linhagem HEp-2, tempo de incubação=18h,(n=22).

t irradiação (minutos)	Dose (J/cm ²)	$\lambda_{irradiação}$		
		488nm (azul)	514nm (verde)	630nm (vermelho)
		$IC_{50} (\mu g/mL) \pm DP$		
0	0	2,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1
10	30	3,1 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,2
20	60	3,2 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,1	4,7 $\pm$ 0,2
30	90	3,7 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,3
40	120	4,3 $\pm$ 0,4	4,6 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,5
60	180	4,5 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,5
90	270	6,3 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 0,6
120	360	7,0 $\pm$ 0,5	7,8 $\pm$ 0,60	9,6 $\pm$ 0,6

Observa-se o mesmo comportamento para as células tumorais, ou seja, os fotoprodutos do Photogem[®] obtido pela irradiação no vermelho são menos tóxicos que os

obtidos em 488 e 514nm. Conforme aumenta o tempo de irradiação, a porcentagem de diminuição da citotoxicidade é de 64,68 e 74%, respectivamente para os fotoprodutos obtidos pela irradiação em 488, 514 e 630nm. De acordo com o teste estatístico One - Way ANOVA do software Origin 7.0, os valores encontrados para o IC_{50} do PGI_{irr488} , PGI_{irr514} e PGI_{irr630} apresentam – se diferentes com nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$). Nota-se que a Razão $IC_{50} \text{ Fotoprodutos } / \text{Photogem}$ é maior no vermelho, diminuindo em comprimentos de onda de irradiação menores (verde e azul). No entanto esta razão é maior para as células tumorais, o que é um indicativo que os fotoprodutos, menos tóxicos do que Photogem[®] são mais tóxicos nas células tumorais. Isto sugere um maior efeito do FS e do fotoproduto formado nas células tumorais, produzindo, portanto um menor dano ao tecido normal durante a Terapia Fotodinâmica.

Além do tempo de irradiação, a dose de luz deve ser controlada uma vez que o fotossensibilizador em altas doses de luz pode vir a ser degradado parcialmente ou totalmente e causando deste modo uma menor citotoxicidade [76]. Por outro lado, condições que levem a uma baixa degradação dificulta o processo de eliminação do FS, aumentando a sensibilidade cutânea dos pacientes [83].

A Figura 51 apresenta a dependência dos valores de IC_{50} em células não tumorais e tumorais em função do tempo de irradiação da solução do Photogem, ou seja, da fotodegradação induzida.

Figura 51: Valores de IC₅₀ do Photogem[®] não irradiado e irradiado com laser em 488, 514 e 630nm em função do tempo de irradiação. Intensidade de irradiação de 50mW/cm² (Dose 0-360J/cm²).

Pode-se dizer que os fotoprodutos obtidos por irradiação nos três comprimentos de onda apresentaram o mesmo comportamento em células não tumorais e tumorais, com o aumento do tempo de irradiação, o IC₅₀ aumentou. Este fato é descrito na literatura somente para HpD e para a clorina *m*THPC [108, 109]. Isto significa que os fotoprodutos são menos citotóxicos que a droga original para ambas as células, no entanto os valores de IC₅₀ são menores para as células tumorais, o que é um indicativo que os fotoprodutos são mais tóxicos em células tumorais. Esta menor citotoxicidade em células não tumorais já foi observada em outros estudos em nosso laboratório [110]. Os baixos valores do IC₅₀ para Photogem[®] degradado previamente podem ser explicados pela quantidade de fotoprodutos formados em 488, 514 e 630nm, com o tempo de irradiação.

Pelas tabelas 4 e 5 Photogem[®] degradado em 630nm apresenta maior proporção de droga original não degradada, uma vez que os fotoprodutos obtidos com a irradiação não são isolados e sim fazem parte de uma mistura de Photogem[®] não degradado e seus fotoprodutos formados. Pode-se dizer que apesar de uma maior proporção de droga original, uma vez que sofre uma pequena degradação, e pequena quantidade de fotoproduto formado, a citotoxicidade do Photogem[®] fotodegradado em 630nm é decorrente dos

fotoprodutos, uma vez que se a citotoxicidade do Photogem[®] prevalecesse a citotoxicidade encontrada para os fotoprodutos deveria ser maior.

Pode-se concluir que o “photobleaching” em uma taxa apropriada durante a iluminação em TFD pode levar a um aumento no IC₅₀ do FS em tecidos normais, causando uma diminuição da citotoxicidade da droga administrada. Vantagens da fotodegradação são usadas em situações terapêuticas. O dano causado em tecido normal pela Terapia pode ser provavelmente mantido em nível tolerável, controlando-se a fluência e a dose do medicamento a fim de evitar uma alta degradação que levaria a uma pequena destruição do tumor [71, 78, 97].

4.3.2 CITOTOXICIDADE NO ESCURO DO PHOTOGEM[®] E SEUS FOTOPRODUTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO.

As Tabelas 16 e 17 apresentam os valores de IC₅₀ para o Photogem[®] e de seus fotoprodutos obtidos por irradiação previa em 488, 514 e 630nm por 120 min com intensidade de irradiação de 50mW/cm² (Dose de irradiação= 360J/cm²), em células não tumorais e tumorais respectivamente.

Tabela 16: Citotoxicidade no escuro do Photogem[®] para a linhagem celular VERO em função do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.

Fotossensibilizador		$\lambda_{\text{irradiação}}$	2 h	6h	18 h	24h
			IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ DP			
Photogem®	Não irradiado	-----	20,8 $\pm$ 0,4	16 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,6	4,3 $\pm$ 0,5
	Irradiado por 2h	488nm	58,9 $\pm$ 0,4	45,2 $\pm$ 0,4	10,6 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 0,4
		514nm	65,4 $\pm$ 0,5	53 $\pm$ 0,5	12,4 $\pm$ 0,5	9,4 $\pm$ 0,5
		630nm	74,2 $\pm$ 0,4	65,8 $\pm$ 0,6	16,4 $\pm$ 0,7	12,6 $\pm$ 0,5

Tabela 17: Citotoxicidade no escuro do Photogem[®] para a linhagem celular HEP-2 em função do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.

Fotossensibilizador		$\lambda_{\text{irradiação}}$	2 h	6h	18 h	24h
			IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ DP			
Photogem [®]	Não irradiado	-----	12,8 $\pm$ 0,6	9,9 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,4
	Irradiado por 2h	488nm	52,3 $\pm$ 0,2	41,1 $\pm$ 0,6	7,0 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,3
		514nm	55,5 $\pm$ 0,2	44,6 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,2
		630nm	60,7 $\pm$ 0,3	53,4 $\pm$ 0,5	9,6 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 0,1

Observou-se que a citotoxicidade do Photogem[®] no escuro antes e após 120 min de irradiação tanto em células não tumorais quanto em tumorais, aumenta com o tempo de incubação (Figuras 52A e B). Estes resultados são coerentes uma vez que existem controles cinéticos para a incorporação do corante nas células. Após cerca de 18h de incubação os valores de IC₅₀ não mudam mais significativamente. Por essa razão, este tempo de incubação foi o escolhido para a determinação da citotoxicidade do fotoproduto formado e está de acordo com o tempo de incubação utilizado na literatura [71, 81, 97]. De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o IC₅₀ do Photogem e de seus fotoprodutos formados em 488, 514 e 630nm para as células VERO e HEP-2 apresentaram-se diferente significativamente para todos os tempos de incubação, com nível de significância de 0.05 ($p < 0.05$).

Na literatura, é descrito que essa estabilização do valor de IC₅₀ para clorina *m*THPC ocorre a partir de 12 h de irradiação [111].

É evidente que a citotoxicidade do Photogem[®] e seus fotoprodutos é maior para as células tumorais Hep-2. A principal informação que pode ser obtida destes resultados é que a captura celular para as células não tumorais é provavelmente mais lenta, levando a uma menor citotoxicidade, sendo portanto um resultado importante em TFD.

Figura 52: Variação nos valores de IC_{50} do Photogem® e seus fotoprodutos irradiados previamente com laser em 488, 514 e 630nm por 2h (Dose de irradiação de $360J/cm^2$) em função do tempo de incubação. (A) Células normais, (B) Células tumorais.

As diferenças na citotoxicidade dos fotoprodutos comparadas com a do PG não irradiado são atenuadas com o aumento do tempo de incubação.

No entanto observa-se para Photogem® e seus fotoprodutos que 18 e 24h não se alteram muito os valores do IC_{50} . A citotoxicidade de cada droga está relacionada com a sua incorporação nas células [112] e maior parte dos FSs aumenta sua citotoxicidade com o aumento do tempo de incubação [70, 111-115].

Belichenko [109] reportou que após prolongados tempos de incubação ocorre uma tendência dos monômeros se agregarem em grandes agregados (diminuição da fluorescência na membrana plasmática), dificultando a formação do estado triplete e consequentemente reduzindo a eficiência quântica de formação do oxigênio singlete [49, 109].

Pode se dizer de acordo com a literatura que somente monômeros e dímeros são capazes de gerar FS no estado triplete gerando oxigênio singlete responsável pelo dano fotodinâmico [49, 109].

THPC e PPIX, ao contrario de derivados de hematoporfirinas, apresentam uma menor citotoxicidade quando em elevados tempos de incubação, uma vez que para estes compostos o tempo de incubação leva a formação de grandes agregados que dificultaria a formação de oxigênio singlete [49, 109].

Sabendo da importância do tempo de incubação na eficácia da terapia fotodinâmica, pode-se controlar a quantidade de droga e o tempo de irradiação em função do tempo de incubação. Deste modo encontrando para cada FS o tempo de incubação ideal (maior fotocitotoxicidade), menores quantidade de FSs serão utilizados bem como o tempo de iluminação será reduzido, causando assim um maior dano as células e tecidos tumorais e um menor dano aos tecidos e células não tumorais que possuem a capacidade de liberar mais rápido a droga [112, 113].

4.4 ESTUDOS CITOTÓXICOS DO PHOTOGEN[®] NO CLARO.

4.4.1 EFEITO DA LUZ EM CULTURAS DE CÉLULAS

Foram realizados vários experimentos citotóxicos de modo a avaliar o efeito da associação de porfirinas e luz visível sobre a proliferação das células. Foram analisados os efeitos da intensidade de luz e tempo de irradiação para diferentes concentrações de droga. A intensidade de luz pode ser definida como a quantidade de energia transmitida ao alvo por unidade de tempo e é expressa em mW/cm^2 ou W/m^2 . A quantidade de energia transmitida durante todo o intervalo de tempo é definida como dose de luz, que por sua vez é expressa em J/cm^2 ou KJ/m^2 . A relação entre intensidade de luz, dose de luz e tempo de irradiação é dada pela equação 9:

$$I = \frac{D}{t} \quad (\text{equação 9})$$

onde:

I = intensidade de luz em mW/cm^2

D = dose de luz em J/cm^2

t = tempo de irradiação em segundos

sendo que $1 \text{ J} = 1 \text{ W} \times \text{segundo}$

Foi analisada a citotoxicidade do Photogem[®] irradiado em culturas de células em função do tempo de irradiação com laser em 630nm. Procurou-se desta forma avaliar o efeito da luz em 630nm sobre a proliferação das células tumorais (HEp-2) e normais (VERO) na ausência e presença de droga. As concentrações de Photogem[®] utilizadas para o experimento variaram de 0–25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e as intensidades de luz LED em 630nm utilizadas foram: 13, 20, 25 mW/cm^2 , com tempos de irradiação variando de 7- 60 minutos.

Estes experimentos foram utilizados como um segundo controle, pois em TFD somente a luz na ausência de porfirina não deve apresentar efeito tóxico às células.

Tabela 18: Efeito da luz no Índice de sobrevivência celular (I.S.) para as células não tumorais (VERO) variando a dose de irradiação ($D = \text{J}/\text{cm}^2$). Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.

t irradiação das células (min)	INTENSIDADE DE IRRADIAÇÃO (mW/cm^2)					
	$I=13\text{mw}/\text{cm}^2$		$I=20\text{mw}/\text{cm}^2$		$I=25\text{mw}/\text{cm}^2$	
	D J/cm^2	I.S. (%)	D J/cm^2	I.S. (%)	D J/cm^2	I.S. (%)
7	5,4	99,2	8,4	98,9	10,5	98,2
14	10,9	98,4	16,8	98,2	21	97,9
20	15,6	97,5	24	97,0	30	97
25	19,5	97,2	30	96,9	38,5	96,5
40	31,2	96,8	48	96,0	60	95,6
60	46,8	96,1	72	95,5	90	94,8

Pode-se verificar na Tabela 18 que para as células não tumorais a mortalidade em 1h de irradiação em 630nm foi de 3,9% em 13 mW/cm^2 , 4,5% em 20 mW/cm^2 e 5,2% em 25 mW/cm^2 . Logo, o aumento na intensidade de irradiação, praticamente não afetou na mortalidade celular que pode ser considerada desprezível para todos os tempos de irradiação.

De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o I.S. do Photogem® em cada dose de irradiação apresentaram-se diferente significativamente em cada tempo de iluminação, com nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$), no entanto entre as três intensidades de irradiação (13, 20 e 25mW/cm²) em cada tempo de iluminação não ocorreram diferenças significativas, com nível de significância de 0,05 ($p = 0,5$).

Tabela 19: Efeito da luz no Índice de sobrevivência celular (I.S.) para as células tumorais (HEp-2). Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.

t irradiação das células (min)	INTENSIDADE DE IRRADIAÇÃO (mW/cm ²)					
	I=13mw/cm ²		I=20mw/cm ²		I=25mw/cm ²	
	D J/cm ²	I.S. (%)	D J/cm ²	I.S. (%)	D J/cm ²	I.S. (%)
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

Podemos verificar na Tabela 19 que para as células tumorais, a mortalidade em 1h de irradiação em 630nm foi de 22,8% em 13mW/cm², 23,5% em 20mW/cm² e 25% em 25mW/cm². A mortalidade celular aumenta ligeiramente com a intensidade, no entanto aumenta muito em função do tempo de irradiação das células. Estes experimentos foram realizados com o intuito de descobrir um intervalo de tempo adequado de irradiação que não causasse dano citotóxico as células mostrando apenas o dano citotóxico do FS a ser testado. Deste modo a maioria dos experimentos foram realizados com LED em 630nm, com Intensidade de 25mW/cm² por 20 min de irradiação das células (D=30J/cm²), levando-se em conta que o índice de sobrevivência para as células não tumorais é de 97% contra 91% para as células tumorais. De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o I.S. do Photogem® em cada dose de irradiação apresentaram-se diferente significativamente em cada tempo de iluminação, com nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$), no entanto entre as três

intensidades de irradiação (13, 20 e 25mW/cm²) em cada tempo de iluminação não ocorreram diferenças significativas, com nível de significância de 0,05 (p=0,5). Comparando os valores de I.S. para Photogem[®] nas diferentes intensidades de irradiação (13, 20 e 25mW/cm²) para as células VERO e Hep-2 observamos que ocorrem diferenças significativas, com nível de significância de 0,05 (p<0,05).

Pode-se verificar que a mortalidade para as células tumorais em 1 h de irradiação é cerca de cinco vezes maior que em células não tumorais em todas as intensidades utilizadas. Deve-se ressaltar que na aplicação clínica de TFD dificilmente uma lesão é irradiada por tempo superior a 40 min.

4.4.2 COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE DO PHOTOGEN[®] E DE SEUS FOTOPRODUTOS (OBTIDOS NA IRRADIAÇÃO EM 514nm) EM CULTURA DE CÉLULAS EM DIFERENTES DOSES DE IRRADIAÇÃO.

4.4.2.1 Citotoxicidade e Fotocitotoxicidade do Photogem[®] em cultura de células em diferentes doses de irradiação.

Foram realizados vários experimentos citotóxicos no claro (luz LED em 630nm) para Photogem[®] na faixa de concentração de 0-15µg/mL em cultura de células não tumorais e células tumorais, nas três intensidades de irradiação, variando a o tempo de irradiação e conseqüentemente a dose de irradiação.

Tabela 20: Citotoxicidade do Photogem[®] irradiado após incubação em cultura celular com laser em 630nm e I=13; 20 e 25mW/cm² para as células não tumorais (VERO) com tempos de irradiação de 7-60 min. Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.

IC ₅₀ escuro: 5,7± 0,6 µg/mL						
t irradiação (min)	13mw/cm ²	20mw/cm ²	25mw/cm ²	13mw/cm ²	20mw/cm ²	25mw/cm ²
	Dose de energia (J/cm ²)			IC ₅₀ (µg/mL) ± DP		
7	5,4	8,4	10,5	5,5± 0,2	5,5± 0,5	5,2± 0,4
14	10,9	16,8	21,0	5,4± 0,5	5,1± 0,3	4,9± 0,3
20	15,6	24,0	30,0	5,0± 0,4	4,6± 0,6	3,5± 0,4
25	19,5	30,0	38,5	4,6± 0,2	4,3± 0,2	3,3± 0,3
40	31,2	48,0	60,0	4,1± 0,3	3,8± 0,2	3,1± 0,2
60	46,8	72,0	90,0	1,7± 0,1	1,4± 0,1	1,2± 0,2

De acordo com a Tabela 20, o IC_{50} diminui 3,2 vezes em $13\text{mw}/\text{cm}^2$, 3,9 vezes em $20\text{mw}/\text{cm}^2$ e 5 vezes em $25\text{mw}/\text{cm}^2$ para 1h de irradiação. Em 20 minutos de irradiação, onde o efeito da luz nas três intensidades é praticamente o mesmo, pode se dizer que as diferenças na citotoxicidade entre as intensidades de luz diminuem, mas a citotoxicidade ainda assim é maior em $25\text{mw}/\text{cm}^2$. De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o IC_{50} do Photogem[®] nas diferentes intensidades de irradiação (13 , 20 e $25\text{mW}/\text{cm}^2$) não apresenta diferenças significativas, com nível de significância de $0,05$ ($p=0,4$).

Tabela 21: Citotoxicidade do Photogem[®] irradiado com tempos de 7-60 min após incubação em cultura celular com laser em 630nm e $I=13$; 20 e $25\text{mW}/\text{cm}^2$ para as células tumorais (HEp-2) com tempos de irradiação de 7-60min. Os experimentos foram realizados 6 vezes em triplicatas.

$IC_{50 \text{ escuro}}: 2,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$						
$t_{\text{irradiação}}$ (min)	$13\text{mw}/\text{cm}^2$	$20\text{mw}/\text{cm}^2$	$25\text{mw}/\text{cm}^2$	$13\text{mw}/\text{cm}^2$	$20\text{mw}/\text{cm}^2$	$25\text{mw}/\text{cm}^2$
	Dose de energia (J/cm^2)			$IC_{50} (\mu\text{g}/\text{mL}) \pm \text{DP}$		
7	5,4	8,4	10,5	$2,5 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
14	10,9	16,8	21,0	$2,0 \pm 0,3$	$1,7 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,2$
20	15,6	24,0	30,0	$1,7 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2$
25	19,5	30,0	38,5	$1,5 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
40	31,2	48,0	60,0	$1,4 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
60	46,8	72,0	90,0	$0,9 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$

De acordo com a Tabela 21, o IC_{50} diminui 2,8 vezes em $13\text{mw}/\text{cm}^2$, 4,4 vezes em $20\text{mw}/\text{cm}^2$ e 5 vezes $25\text{mw}/\text{cm}^2$ para 1h de irradiação. Em 20 minutos de irradiação, onde o efeito da luz nas três intensidades é praticamente o mesmo, pode se dizer que as diferenças na citotoxicidade entre as intensidades de luz diminuem, mas a citotoxicidade ainda assim é maior em $25\text{mw}/\text{cm}^2$. De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o IC_{50} do Photogem[®] nas diferentes intensidades de irradiação (13 , 20 e $25\text{mW}/\text{cm}^2$) apresentam diferenças significativas, com nível de significância de $0,05$ ($p<0,05$). Comparando os valores de IC_{50} para Photogem[®] nas diferentes intensidades de irradiação (13 , 20 e $25\text{mW}/\text{cm}^2$) para as células VERO e Hep-2 observamos que ocorrem diferenças significativas, com nível de significância de $0,05$ ($p<0,05$).

Figura 53: Valores do IC_{50} do Photogem[®] irradiado em cultura de células não tumorais - VERO (A) e em cultura de células tumorais - HEP-2 (B) com LED em 630nm em função do tempo de irradiação. $I=13, 20$ e 25mW/cm^2 .

Na Figura 53 pode-se visualizar claramente a diferença de citotoxicidade entre as células não tumorais e tumorais bem como em relação às intensidades de luz. Os valores de IC_{50} no claro diminuem com o tempo de irradiação, porém de forma mais pronunciada na intensidade de 25mW/cm^2 . Pode-se observar que com o tempo de irradiação a citotoxicidade do Photogem[®] aumenta o que é conveniente para a aplicação clínica do TFD, pois enquanto dure a irradiação deseja-se matar o maior número possível de células tumorais.

4.4.2.2 Citotoxicidade e Fotocitotoxicidade dos Fotoprodutos do Photogem[®] em cultura de células em diferentes doses de irradiação.

As Tabelas 22 e 23 apresentam os valores de IC_{50} dos fotoprodutos do Photogem[®] obtidos por irradiação prévia com laser em 514nm em células não tumorais e tumorais, respectivamente.

Tabela 22: Citotoxicidade do Photogem® previamente irradiado por 120 min em 514nm D=360J/cm², após incubação em cultura celular com laser em 630nm e I=13; 20 e 25mW/cm² para as células não tumorais (VERO), com tempos de irradiação de 7-60 min. Os experimentos foram realizados 10 vezes em triplicatas.

IC ₅₀ escuro: 12,4 ± 0,5 µg/mL						
t irradiação (min)	13mw/cm ²	20mw/cm ²	25mw/cm ²	13mw/cm ²	20mw/cm ²	25mw/cm ²
	Dose de energia (J/cm ²)			IC ₅₀ (µg/mL) ± DP		
7	5,4	8,4	10,5	11,8± 0,3	11,6± 0,5	10,0± 0,3
14	10,9	16,8	21,0	11,0± 0,2	10,5± 0,3	9,3± 0,2
20	15,6	24,0	30,0	10,2± 0,4	9,5± 0,2	8,9± 0,3
25	19,5	30,0	38,5	9,8± 0,2	9,0± 0,4	8,4± 0,2
40	31,2	48,0	60,0	7,8± 0,2	6,6± 0,2	5,4± 0,1
60	46,8	72,0	90,0	5,0± 0,2	4,3± 0,1	3,9± 0,1

Tabela 23: Citotoxicidade do Photogem® previamente irradiado por 120 min em 514nm D=360J/cm², após incubação em cultura celular com laser em 630nm e I=13; 20 e 25mW/cm² para as células tumorais (HEp-2) com tempos de irradiação de 7-60min. Os experimentos foram realizados 10 vezes em triplicatas.

IC ₅₀ escuro: 7,8 ± 0,6 µg/mL						
t irradiação (min)	13mw/cm ²	20mw/cm ²	25mw/cm ²	13mw/cm ²	20mw/cm ²	25mw/cm ²
	Dose de energia (J/cm ²)			IC ₅₀ (µg/mL) ± DP		
7	5,4	8,4	10,5	7,7± 0,1	7,6± 0,1	7,2± 0,2
14	10,9	16,8	21,0	7,5± 0,3	7,4± 0,2	6,3± 0,2
20	15,6	24,0	30,0	6,8± 0,1	7,1± 0,2	5,6± 0,1
25	19,5	30,0	38,5	6,0± 0,2	6,4± 0,2	4,8± 0,2
40	31,2	48,0	60,0	5,0± 0,1	4,5± 0,1	4,0± 0,1
60	46,8	72,0	90,0	2,0± 0,1	1,7± 0,1	1,5± 0,1

Pode-se observar que IC₅₀ diminui 2,3 vezes em 13mw/cm², 2,8 vezes em 20mw/cm² e 3,2 vezes 25mw/cm² para 1h de irradiação.

De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o IC₅₀ do Photogem® para as células tumorais e não tumorais nas diferentes intensidades de irradiação (13, 20 e 25mW/cm²) apresentam diferenças significativas, com nível de significância de 0,05 (p<0,05). Comparando os valores de IC₅₀ para Photogem® nas diferentes intensidades de irradiação (13, 20 e 25mW/cm²) para as células VERO e Hep-2 observamos que ocorrem diferenças significativas, com nível de significância de 0,05 (p<0,05).

Figura 54: Valores do IC₅₀ dos fotoprodutos do Photogem[®] obtidos por irradiação prévia em 514nm (t= 120 min, D=360J/cm²) irradiados em cultura de células não tumorais (A) e em cultura de células tumorais (B) com LED em 630nm (I=13, 20 e 25mW/cm²) em função do tempo de irradiação.

A citotoxicidade dos fotoprodutos do Photogem[®] obtidos por irradiação prévia em 514nm e posteriormente irradiados em cultura celular com LED em 630nm em ambas as linhagens celulares (Figura 54A e B) apresentaram o mesmo comportamento que o Photogem[®] sem irradiação prévia. No entanto as diferenças encontradas para os valores de IC₅₀ dos fotoprodutos no escuro (IC₅₀VERO: 12,4 ± 0,5 µg/mL e IC₅₀ Hep-2: 7,8 ± 0,6 µg/mL) irradiados em diferentes intensidades de luz em cultura celular são maiores tanto para as células não tumorais quanto para as células tumorais. Em termos de citotoxicidade entre as linhagens celulares, observamos que as células tumorais apresentam-se mais susceptíveis à morte celular do que as células normais, fato este importante já que o interesse é a morte de células tumorais em TFD.

Podemos observar que o IC₅₀ diminui com o aumento da intensidade de luz, sendo mais evidente para as células tumorais. No entanto, os fotoprodutos do Photogem[®] (obtidos por irradiação prévia em 514nm) precisam de 1 hora de irradiação com LED em 630nm, para ambas as linhagens, para apresentar o mesmo valor de IC₅₀ do Photogem[®] sem irradiação prévia, sendo que este tempo para Photogem[®] é de 14 min em células tumorais e 25 min para células não tumorais.

Comparando-se o decréscimo nos valores de IC_{50} para as células tumorais e normais, observa-se que o IC_{50} diminui em torno de 2,5 para as células não tumorais e 4,5 para as células tumorais o que enfatiza a citotoxicidade acentuada para as células tumorais.

Os resultados sugerem que os fotoprodutos do Photogem[®] são menos citotóxicos tanto no escuro quanto no claro, de acordo com a literatura segundo a qual os fotoprodutos possuem uma atividade fotodinâmica menor do que seu FS precursor [71, 102].

O aumento da intensidade de luz causa um aumento na citotoxicidade. Dessa forma, fica claro como a Dosimetria é importante em TFD, uma vez que a intensidade de luz é diretamente proporcional ao efeito celular.

4.4.3 CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE DO PHOTOGEN[®] E DE SEUS FOTOPRODUTOS (OBTIDOS NA IRRADIAÇÃO PRÉVIA EM 488, 514 e 630nm) EM CULTURA DE CÉLULAS.

4.4.3.1 Citotoxicidade e Fotocitotoxicidade do Photogem[®] e seus fotoprodutos em cultura de células.

Foram realizados experimentos citotóxicos no claro utilizando-se Photogem[®] e os seus fotoprodutos obtidos da irradiação do Photogem[®] 50 μ g/mL por 120min com laser em 488, 514nm e 630nm com 50mW/cm² (Dose de irradiação de 360J/cm²). As culturas de células não tumorais e tumorais foram irradiadas com LED em 630nm, por 20 min de acordo com os experimentos do efeito da luz.

A Tabela 24 apresenta os valores de IC_{50} em células não tumorais e células tumorais dos fotoprodutos do Photogem[®] cuja fotodegradação foi induzida por irradiação em três comprimentos de onda por 120 min com 50mW/cm².

Tabela 24: Citotoxicidade (IC_{50}) no escuro e no claro do Photogem[®] e seus fotoprodutos (obtidos com irradiação prévia por 120 min com $I=50mW/cm^2$ – Dose= $360J/cm^2$ em 488, 514 e 630nm, incubados por 18h e irradiados com LED em 630nm ($D=30J/cm^2$), por 20 min com $I=25mW/cm^2$ em células não tumorais e células tumorais.

FS Células	LUZ	Photogem®	Fotoprodutos obtidos (λirradiação)			Número experimentos
			488nm	514nm	630nm	
IC50 (µg/mL) ± DP						
VERO	Ausência	5,7± 0,6	10,6 ± 0,5	12,4 ± 0,5	16,4 ± 0,7	16
	Presença	3,5 ± 0,2	7,7 ± 0,4	8,9 ± 0,6	12,0 ± 0,7	10
HEp-2	Ausência	2,5 ± 0,1	7,0 ± 0,5	7,8 ± 0,6	9,6 ± 0,6	15
	Presença	1,3± 0,2	4,5 ± 0,7	5,0 ± 0,3	5,8± 0,2	10

De acordo com os resultados anteriores, a citotoxicidade é maior para o Photogem[®] seguida dos fotoprodutos em 488, 514 e 630nm, tanto no escuro quanto no claro. A Razão IC_{50} dos fotoprodutos células normais/ células tumorais tanto no escuro como no claro, aumenta para os fotoprodutos gerados por irradiação com de maior comprimento de onda (630nm), no entanto é maior no claro indicando que a citotoxicidade e fotocitotoxicidade são maiores para as células tumorais. A Razão IC_{50} dos fotoprodutos escuro/ claro é praticamente a mesma em células normais, indicando que a luz não potencializou o efeito citotóxico nestas células. Já para as células tumorais ocorre o efeito citotóxico da luz, no entanto este efeito potencializador da luz é maior para os fotoprodutos obtidos em 630nm. Este fato pode ser devido ao fato de que os fotoprodutos existem em equilíbrio com Photogem[®], e neste caso a fotodegradação em 630nm, é relativamente baixa comparando-se com a irradiação em 488 e 514nm e consequentemente a formação do fotoproduto também é mínima. Pode-se dizer que quando estes fotoprodutos obtidos com laser em 630nm são adicionados em cultura de células e posteriormente irradiados com LED em 630nm, ocorre a degradação e formação de mais fotoprodutos que absorvem em 640nm, fazendo com que ocorra uma maior quantidade de

fotoprodutos, gerando, portanto um maior efeito citotóxico, este potencializado pelo efeito da luz.

De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o IC_{50} do Photogem[®] e seus fotoprodutos formados em 488, 514 e 630nm irradiados ou não com laser em cultura de células tumorais ou não tumorais apresentam diferenças significativas, com nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$). Estes fatores são importantes para melhor compreensão da fotodegradação e formação de fotoprodutos em TFD.

Na Figura 55 pode-se observar o comportamento citotóxico para o Photogem[®] e seus fotoprodutos. Estes resultados indicam que a diferença na citotoxicidade entre os fotoprodutos obtidos nos três comprimentos de onda é maior no claro para as células tumorais, o que nos mostra que com a presença de luz, a citotoxicidade aumenta principalmente para as células tumorais.

Figura 55: Citotoxicidade no escuro e no claro para as células não tumorais (A) e tumorais em (B) do Photogem[®] e seus fotoprodutos obtidos em 488, 514 e 630nm com intensidade de 50mW/cm², D=360J/cm². A citotoxicidade no claro, irradiando-se Photogem[®] e seus fotoprodutos em cultura de células com laser em 630nm com intensidade de 25mW/cm² por 20 min, D=30J/cm².

4.4.3.2 Citotoxicidade e Fotocitotoxicidade do Photogem® e seus fotoprodutos em cultura de células em função do tempo de incubação.

Experimentos controle foram realizados para verificar a dependência dos valores de IC_{50} do Photogem® e seus fotoprodutos em função do tempo de incubação com as células não tumorais e células tumorais.

Tabela 25: Citotoxicidade no escuro e no claro com LED em 630nm ($D=30J/cm^2$) do Photogem® e dos fotoprodutos do Photogem® obtidos em 514 e 630nm por 120 min ($I=50mW/cm^2$ $D=360J/cm^2$) para a linhagem celular VERO em função do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados 10 vezes em triplicatas.

FS	$\lambda_{irradiação}$	LUZ	Tempo de incubação			
			2 h	6h	18 h	24h
			$IC_{50} (\mu g/mL) \pm DP$			
Photogem®	-----	Ausência	20,8± 0,4	16,0±0,5	5,7± 0,6	4,3 ± 0,5
		Presença	12,5 ± 0,6	9,4 ± 0,6	3,5 ± 0,2	2,7 ± 0,1
	488nm	Ausência	58,9± 0,4	45,2± 0,4	10,6 ± 0,3	8,4 ± 0,4
		Presença	34,0 ± 0,1	28,0 ± 0,5	7,7 ± 0,4	6,0 ± 0,4
	514nm	Ausência	65,4± 0,5	53,0± 0,5	12,4 ± 0,5	9,4 ± 0,5
		Presença	39,0± 0,9	33,0 ± 0,9	8,9 ± 0,6	6,9 ± 0,3
	630nm	Ausência	74,2± 0,3	65,8± 0,3	16,4± 0,5	12,6 ± 0,5
		Presença	42,0 ± 0,4	40,0 ± 0,4	12,0 ± 0,7	9,1 ± 0,4

A Tabela 25 mostra que os valores de IC_{50} são menores para os tempos de incubação mais longos (18 e 24hs), indicando que a citotoxicidade aumenta com o tempo de incubação, Cunderlikova [70] mostra que os maiores danos às células ocorrem após tempos prolongados de incubação com a droga, devido principalmente à distribuição das porfirinas nas células que muda com o tempo de incubação [75].

Tabela 26: Citotoxicidade no escuro e no claro com LED em 630nm ($D=30J/cm^2$) do Photogem[®] e dos fotoprodutos obtidos do Photogem[®] em 488, 514 e 630nm por 120 min ($I=50mW/cm^2$ $D=360J/cm^2$) para a linhagem celular HEP-2 em função do tempo de incubação. Os experimentos foram realizados 10 vezes em triplicatas.

FS	$\lambda_{irradiação}$	LUZ	Tempo de incubação			
			2 h	6h	18 h	24h
			IC ₅₀ ($\mu g/mL$) $\pm$ DP			
Photogem [®]	-----	Ausência	12,8 $\pm$ 0,6	9,9 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,4
		Presença	5,6 $\pm$ 0,8	4,9 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2
	488nm	Ausência	52,3 $\pm$ 0,2	41,1 $\pm$ 0,6	7,0 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,3
		Presença	32,8 $\pm$ 0,6	27,0 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,7	3,4 $\pm$ 0,9
	514nm	Ausência	55,5 $\pm$ 0,2	44,6 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,2
		Presença	35,3 $\pm$ 0,4	30,0 $\pm$ 0,6	5,0 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,6
	630nm	Ausência	60,7 $\pm$ 0,3	53,4 $\pm$ 0,5	9,6 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 0,1
		Presença	38,0 $\pm$ 0,6	35,0 $\pm$ 0,6	5,8 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,2

A Tabela 26 apresenta os valores de IC₅₀ que são menores para os tempos de incubação mais longos (18 e 24hs), indicando que com o tempo de incubação a citotoxicidade aumenta.

Comparando-se a citotoxicidade das células tumorais e normais, verificamos que o IC₅₀ do Photogem[®] e dos seus fotoprodutos é menor para as células tumorais e a citotoxicidade e o efeito da luz se tornam mais acentuadas em tempos de incubação longos.

De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o IC₅₀ do Photogem[®] e seus fotoprodutos formados em 488, 514 e 630nm irradiados ou não com laser em cultura de células não tumorais e tumorais apresentam diferenças significativas em função do tempo de incubação, com nível de significância de 0,05 ($p<0,05$).

4.4.4 COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE DO PHOTOGEN[®] E SEUS FOTOPRODUTOS EM CULTURA DE CÉLULAS EM FUNCAO DO TEMPO DE IRRADIACAO PRÉVIA EM 630nm.

Os resultados citotóxicos e fotocitotóxicos do Photogem[®] e seus fotoprodutos obtidos por irradiação prévia com LED em 630nm (D= 360 e 540Jcm²) para as células não tumorais (VERO) e células tumorais (HEp-2) estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27: Valores de IC₅₀ do Photogem[®] e seus fotoprodutos obtidos por irradiação prévia com LED em 630nm por 4 e 6hs com I=25mW/cm² (D= 360 e 540Jcm²), no escuro e no claro com LED em 630nm (D=30J/cm²) para as células não tumorais – VERO e células tumorais - Hep-2, em função do tempo de incubação de 18hs, n=10.

CÉLULAS LUZ		IC ₅₀ (µg/mL) ± DP		
		Não irradiado	Irradiado por 4h D=360Jcm ²	Irradiado por 6h D=540Jcm ²
VERO	Ausência	5,7± 0,6	16,4± 0,7	20,0± 0,2
	Presença	3,5± 0,2	12,0± 0,7	15,5± 0,2
HEp-2	Ausência	2,5 ± 0,1	9,6± 0,6	13,7± 0,2
	Presença	1,3± 0,2	5,8± 0,2	9,0± 0,2

Pode-se verificar que a citotoxicidade diminui à medida que o tempo de irradiação prévia da solução de Photogem[®] aumenta. De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o IC₅₀ do Photogem[®] e do Photogem irradiado por 4h e 6h em células tumorais e não tumorais na ausência e presença de luz apresentam diferenças significativas, com nível de significância de 0,05 (p<0,05).

Figura 56: Citotoxicidade no escuro e no claro para as células não tumorais(A) e tumorais em (B) do Photogem® e seus fotoprodutos obtidos em 630nm por 4 e 6h de irradiação com intensidade de 25mW/cm² (Dose de 360-540J/cm²). A citotoxicidade no claro foi obtida irradiando-se Photogem® e seus fotoprodutos em cultura de células com laser em 630nm com intensidade de 25mW/cm² por 20 min, D=30J/cm².

Comparando os resultados anteriores para Photogem® 40µg/mL (Figura 22C) degradado em PBS com laser em 630nm com intensidade de irradiação de 50mW/cm² (Dose de irradiação de 0-360J/cm²), com Photogem® 20µg/mL (Figura 42) degradado em PBS com LED em 630nm com intensidade de irradiação de 25mW/cm² (Dose de irradiação de 0-540J/cm²), verifica-se que realizando o ajuste cinético para a variação da dose até 360J/cm², tempo de 240min para a Figura 42, a constante de tempo de degradação (τ) é de 170min contra 32min (Figura 22C), e a eficiência de degradação para a Figura 42 está em torno de 9% contra 11% (Figura 22C) respectivamente para ($\Delta A_{\max}$).

Em relação a formação de fotoprodutos, a constante de tempo para a formação é de 87 min contra 146 min (Figura 22C), e a eficiência de formação é de 60% para a Figura 42 contra 43% (Figura 22C) respectivamente para ($\Delta A_{\max}$).

Isto indica que Photogem® 40µg/mL irradiado em 50mW/cm² apresentou uma rápida e equivalente degradação em relação a uma solução menos concentrada (20µg/mL) irradiada com uma intensidade 2 vezes menor (25mW/cm²). Já a eficiência de formação do

fotoproduto é maior quando em uma menor concentração e intensidade de irradiação, tornando o processo nestas condições mais rápido.

Pode-se dizer que Photogem[®] irradiado por um tempo maior em baixa intensidade de irradiação, a quantidade de fotoproduto aumenta em solução. Deste modo estes fotoprodutos competem em solução com o próprio Photogem[®], e aumentando sua concentração levam a uma diminuição maior ainda da citotoxicidade.

4.4.5 COMPARAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E FOTOCITOTOXICIDADE DO PHOTOGEN[®] NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE SORO

A Tabela 28 apresenta os valores de IC₅₀ para Photogem[®] incubado por 2h com e sem adição de 3% de soro, em células não tumorais e tumorais.

Tabela 28: Valores de IC₅₀ do Photogem[®] no claro para as linhagem celulares normais (VERO) e tumorais (HEp-2) em relação à presença ou ausência de soro ao meio de cultura, com tempo de incubação de 2hs.

Photogem®		LUZ	VERO	Hep-2
			IC ₅₀ (µg/mL) ± DP	
t _{incubação} = 2h	Ausência de soro	Ausência	15,9± 1,04 (12x)	8,8± 0,2 (12x)
		Presença	7,5± 0,9 (12x)	2,9± 0,9 (12x)
	Presença de 3% de soro	Ausência	20,8± 0,3 (10x)	12,8± 0,6 (10x)
		Presença	12,5 ± 0,6 (10x)	5,6 ± 0,8 (10x)

Figura 57: Citotoxicidade no escuro e no claro para as células não tumorais (A) e tumorais em (B) do Photogem[®] irradiado em cultura de células na presença e ausência de soro (3%) com laser em 630nm com intensidade de 25mW/cm² por 20 min, D=30J/cm².

De acordo com os dados da Tabela 28 e da Figura 57, podemos observar que os valores de IC₅₀ tanto para as células não tumorais como para as células tumorais aumentam com a adição de 3% de soro ao meio contendo Photogem[®] a ser incubado com a droga. Isto se deve ao fato de que o fotossensibilizador liga-se às proteínas do soro, diminuindo assim a concentração de Photogem[®] livre. Isso faz com que uma concentração menor do corante passe a atuar sobre a célula e com isso apresente um maior valor de IC₅₀. Na ausência de soro a captura celular da droga é governada somente pela incorporação da droga na membrana [70].

De acordo com o teste estatístico os valores encontrados para o IC₅₀ do Photogem[®] na presença e ausência de soro células tumorais e não tumorais na ausência e presença de luz apresentam diferenças significativas, com nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$).

Estes dados estão de acordo com a literatura [97], onde a presença de soro reduz a captura de HpD pela célula, uma vez que as proteínas do soro se ligam às porfirinas.

A presença de soro (proteínas) diminui a atividade fotodinâmica, uma vez que este melhora a solubilização dos FS favorecendo a desagregação, favorecendo a formação de espécies monoméricas (monomerização) e diminuindo as formas agregadas [70, 109, 111].

Isto ocorre por que o complexo FS-soro é pouco capturado pela membrana, diminuindo a captura da droga (sua concentração nas células) e conseqüentemente a sua citotoxicidade [111]. Assim como a localização e a captura do FS (que pode determinar o tipo e número de lesões fotodinamicamente induzidas), a eficácia fotodinâmica é profundamente influenciada por processos biológicos mediando e regulando as manifestações induzidas das lesões [115].

4.5 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS

Na Figura 58 está apresentado o espectro de fluorescência do Photogem[®] não degradado e degradado previamente com laser em 630nm com dose de irradiação de 1500J/cm², no tecido hepático normal não necrosado e necrosado obtido por Ferreira [99, 116].

Figura 58: Espectros de fluorescência no tecido normal e necrosado para Photogem[®] e Photogem[®] previamente degradado com laser em 630nm com dose de irradiação de 1500J/cm². Concentração utilizada: 5mg/mL, λ_{exc} =532nm [99, 116].

Pode-se observar na Figura 58 que o espectro de fluorescência do Photogem[®] no tecido normal (bandas em 620 e 685nm) apresenta maior intensidade do que em tecidos necrosados devido a baixa penetração da luz nestes tecidos e ocorre um deslocamento da

banda de fluorescência em 620nm para o vermelho quando em tecido necrosado. Com a degradação prévia do Photogem[®] este comportamento se mantém, apenas modificam-se as intensidades de fluorescência da banda em 620nm. Em relação a banda em 685nm, ocorre um alargamento da banda para Photogem[®] degradado ou não em tecido necrosado. Esta modificação espectroscópica do tecido normal para tumoral evidenciada pelo deslocamento dos picos de fluorescência deve-se à modificação das características dos tecidos, que apresenta principalmente diferenças em sua coloração.

Sabendo-se que existem diferenças entre os tecidos normais e tumorais principalmente em relação a penetração de luz, os experimentos foram realizados em tecidos sadios com o intuito de se estabelecer um padrão de dosagem de luz para posteriormente ser aplicados em tecidos tumorais.

A fluorescência do Photogem[®] no tecido pode ser medida através de um equipamento de diagnóstico de fluorescência adquirido comercialmente da Rússia (Figura 59), composto de laser de Hélio – Cádmiu (443nm) e laser de Neodímio: YAG dobrado (532nm), contendo monocromador, computador com um programa de aquisição de dados (LightView) e uma fibra do tipo Y acoplada ao laser de excitação, responsável pela captação dos dados na superfície dos tecidos. A fibra Y é composta por uma fibra central, que leva a luz de excitação, e seis fibras concêntricas coletoras da luz emitida pelo tecido avaliado. A fibra deverá ser mantida em contato com o tecido o mais perpendicularmente possível e a outra extremidade da fibra será conectada ao monocromador, este que conectado ao computador é capaz de levar a luz coletada do tecido ao programa LightView, que fornece resultados da intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda.

Figura 59: (A) Sistema de Diagnóstico. (B) Esquema de funcionamento do sistema.

Na Figura 60 observamos o espectro de absorção do Photogem[®] e seus fotoprodutos formados com irradiação do Photogem[®] em 514 e 630nm.

Figura 60: Espectros de absorção ótica do Photogem[®] 50 μ g/mL (concentração inicial de degradação = 5mg/mL), $c=0,2$ cm. Photogem[®] 5mg/mL em PBS foi degradado com laser em 514 e 630nm com dose de irradiação de 1500J/cm².

De acordo com a Figura 60 observa-se que a degradação da banda de Soret é maior para a irradiação em 514nm, causando uma diminuição na banda de Soret de 49% contra 41% para a irradiação em 630nm. No entanto a eficiência de formação da banda do fotoproduto no vermelho em 640nm é aproximadamente igual para ambos comprimentos de onda de irradiação 14% contra 12,5% no vermelho. Na Figura 61 observamos o espectro de fluorescência do Photogem[®] e seus fotoprodutos formados com irradiação em 514 e 630nm.

Figura 61: Espectros de fluorescência do Photogem[®] degradado em PBS na concentração de 5mg/mL diluída para a concentração de 25 μ g/mL. Irradiação com laser em 514 e em 630nm com potência de dose de irradiação de 1500J/cm² ($I=500\text{mW}/\text{cm}^2$, com tempo de 50min). Excitação: 532nm e as medidas foram feitas com a fibra óptica em contato na solução de Photogem[®]. $c=0,5\text{cm}$

Em relação à intensidade de fluorescência, verifica-se que a degradação do Photogem[®] é maior quando irradiado em 514nm, seguida de Photogem[®] irradiado em 630, indicando que com a degradação ocorre a diminuição das intensidades das bandas de fluorescência em 611nm e em 676nm, bem como a formação de uma nova banda em 636nm. A formação do fotoproduto ocorre em ambos os casos, no entanto a banda do fotoproduto apresenta-se mais definida para Photogem[®] irradiado em 514nm, já que com a irradiação em 630nm ocorre apenas um alargamento da banda em 676nm para 636nm, o que pode ser um indício de que neste comprimento de onda de irradiação o fotoproduto não teve tempo suficiente para ser formado.

Segundo Ferreira [99, 116] existe uma diferença de profundidade na penetração da luz no tecido hepático, em relação a outros tecidos uma vez que a profundidade de penetração da luz no tecido fotossensibilizado é menor devido a absorção da luz incidente. Esta análise pode ser feita comparando-se os coeficientes de penetração da luz no fígado (α), obtidos através do logaritmo do decaimento da intensidade de luz em função da distância de

penetração no tecido. O modelo exponencial de decaimento mostra que tantos efeitos de espalhamento, quanto de absorção, podem ser resumidos em um coeficiente efetivo, denominado de coeficiente de penetração de luz. Neste caso, a intensidade em qualquer porção do tecido alvo com relação ao ponto de incidência pode ser matematicamente representada pela relação:

$$I = I_0 e^{-\alpha z}$$

onde α^{-1} representa o coeficiente de penetração de luz.

Na Figura 62 podemos visualizar a diferença de profundidade de penetração da luz no tecido hepático.

Figura 62: Decaimento da intensidade de fluorescência em fígado não fotossensibilizado e sensibilizado em função da distância.

Os valores de α^{-1} (coeficientes de penetração da luz no fígado) do tecido hepático não fotossensibilizado e fotossensibilizado é de 4,73mm e 1,14mm respectivamente, esta diferença deve-se ao fato de que uma grande parcela de luz incidente está sendo absorvida no tecido fotossensibilizado.

Segundo Ferreira, ocorre uma abrupta separação entre o tecido normal e o necrosado na presença do fotossensibilizador. Na ausência do fotossensibilizador e presença da luz o tecido hepático não apresenta necrose [99, 116]. Na análise histológica foi observado

que o limiar entre o tecido normal e necrosado é evidente e bem delimitado, provavelmente devido ao decaimento da intensidade de luz. O esperado seria ocorrer uma necrose gradual, alta necrose na região superficial, diminuindo gradativamente da mesma forma que a luz decai ao penetrar no tecido normal, no entanto foi constatado uma abrupta necrose, confirmando a ideia de um limiar de intensidade de luz necessário para se atingir tal efeito [99, 116]. A necrose observada naquele estudo tem sua linha de transição a uma profundidade média de 1,5mm. Na região do tecido fotossensibilizado foi verificado que a intensidade de luz é de aproximadamente 60mW/cm^2 (limiar para a necrose). Deste modo o autor concluiu que para intensidades de luz abaixo deste valor (que representam profundidades inferiores a 1,5mm) as observações da alteração tecidual restringem-se a uma degeneração dos hepatócitos, quadro este reversível clinicamente, e constatado pela normalidade do tecido a profundidades inferiores a 1,5mm, uma vez que o tecido hepático é conhecido pela sua rápida regeneração após pequenos danos teciduais (alta capacidade de proliferação celular). Deve – se salientar que estas observações não se aplicam aos tecidos não normais, uma vez que o tecido hepático neoplásico é naturalmente caracterizado por um substrato celular deficitário e que, portanto, deve apresentar um limiar de intensidade muito mais baixo do que o aqui relatado [99, 116].

Deste modo a morfometria do fígado permitiu a análise da profundidade da necrose causada pela TFD. Comparou-se os valores da profundidade de necrose obtidos por Ferreira [99, 116] para o Photogem[®] com os valores obtidos pela degradação prévia do Photogem[®] em 514 e 630nm. A Figura 62 apresenta a alteração hepática causada pelo Photogem[®] logo após a aplicação da TFD (A) e 30 horas após a iluminação com laser em 630nm (B) [99].

Figura 63: A) Alteração hepática causada pelo Photogem[®] logo após a aplicação da TFD. B) Alteração hepática causada pelo Photogem[®] 30 horas após a iluminação [99].

Observa-se que após 30 horas da aplicação da TFD ocorre a necrose do tecido fotossensibilizado (formação de uma úlcera de fundo esbranquiçado e áreas escuras bem delimitadas) [99].

Na Figura 64 observa-se as alterações macroscópicas no tecido sendo possível visualizar a transição do tecido normal e necrosado fotossensibilizado com Photogem[®] (A) encontrado nos estudos de Ferreira [99 116], como também para Photogem[®] degradado previamente em 514 (B) e 630nm (C).

Figura 64: Microscopia óptica (aumento de 10x). Transição entre tecido hepático normal e necrosado fotossensibilizado com Photogem[®] (A) [99] Photogem[®] degradado previamente em 514 (B) e 630nm (C). A) Tecido normal não necrosado. B) Tecido normal necrosado.

A TFD para o Photogem[®] e seus fotoprodutos causa no fígado, uma necrose coagulativa difusa com presença de infiltrado inflamatório neutrofílico predominante e necrose total da veia centrolobular [99]. Na Figura 65 observamos a região delimitada para Photogem (A), Photogem degradado previamente em 514nm (B) e 630nm (C).

Figura 65: Microscopia óptica (aumento de 40x). Transição entre tecido hepático normal e necrosado fotossensibilizado com Photogem[®] (A) [99] Photogem[®] degradado previamente em 514 (B) e 630nm (C). 1) Tecido necrosado. 2) Tecido normal não necrosado.

Na Figura 65 observamos melhor a diferenças das células normais e necrosadas estas com predomínio de neutrófilos para PG e PG previamente irradiado em 630 e 514nm.

Na tabela 29 os resultados obtidos da profundidade de necrose para Photogem[®] previamente degradado em 514 e 630nm comparados com os obtidos por Ferreira [99, 116].

Tabela 29: Análise da profundidade de necrose para Photogem® e Photogem® previamente degradado com laser em 514 e 630nm.

Dose (J/cm ²)	Concentração PG (mg/kg)	Profundidade de necrose (mm)		
		PG	PG degradado em 514nm	PG degradado em 630nm
150	1.5	1,2±0,1	1,0±0,2	0,8±0,2
	2.0	1,5±0,1	1,2±0,2	0.9±0,2
200	1.5	1,4±0,1	1,3±0,2	1,1±0,2
	2.0	1,6±0,2	1,6±0,2	1,6±0,2

De acordo com a Tabela 29 observou-se que na dose de irradiação de 150J/cm² em ambas as concentrações (1,5 e 2mg/Kg), a profundidade de necrose é maior para Photogem® seguida de Photogem® degradado previamente em 514 e 630nm. Na dose de irradiação de 200J/cm² e na concentração de 2mg/Kg não existe diferença na profundidade de necrose para Photogem® bem como para seus fotoprodutos, o que pode estar relacionado com a fototoxicidade dos fotoprodutos, que em altas concentrações e doses de irradiação, apresentam uma maior atividade fotodinâmica. De acordo com a literatura [117] se a fotodegradação do FS esta acontecendo juntamente com a irradiação do tumor, a destruição da droga pode ser completa antes de atingir o limiar de necrose, portanto deve-se controlar a concentração de droga e intensidade de iluminação.

Esses resultados poderiam ser explicados pelo fato anteriormente observado na Tabela 4 e 5 de que a quantidade do fotoproduto formado em 514nm é maior do que em 630nm, e sua citotoxicidade é portanto maior [103, 118, 119].

Estes resultados sugerem que é possível prever a profundidade de necrose através de um controle da degradação e formação de fotoprodutos do FS, isto é estabelecendo-se para isso a dosimetria em TFD. Para isso é necessário conhecer a concentração de droga administrada no animal, bem como a concentração de droga presente no fígado antes da irradiação, para poder então dosar a quantidade de luz suficiente para que não ocorra a degradação da droga, como também a formação do fotoprodutos (dependente do comprimento de onda de irradiação. A taxa de degradação e formação de fotoprodutos altera a profundidade

de necrose, fazendo com que mais droga e luz devam ser administradas para alcançar o mesmo efeito fotodinâmico que o Photogem[®]. Com um controle rígido dos parâmetros mencionados acima seria possível prever a necrose [99, 116].

V. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo a investigação da fotodegradação do fotossensibilizador Photogem® bem como a formação de fotoprodutos causados pela irradiação com laser em diferentes comprimentos de onda.

Em Terapia Fotodinâmica, o FS absorve luz, atingindo o estado tripleto, que reage com o oxigênio molecular dos tecidos gerando oxigênio singleto, responsável pela ação fotodinâmica (morte celular) como também pela própria degradação da molécula do FS. Outra via de formação do oxigênio singleto é através da auto-oxidação das espécies monoméricas do FS. Sendo assim, seja qual for o modo pelo qual o oxigênio singleto é formado, ele vai agir como um coadjuvante importante nos processos de degradação da molécula do FS, levando a um aumento dos processos de degradação da molécula.

Os resultados deste estudo mostraram que a fotodegradação do Photogem®, um derivado de hematoporfirina, ocorre independente do comprimento de onda de irradiação, concentração e intensidade de irradiação (dose de luz administrada), no entanto a eficiência e o tempo dos processos de degradação dependem de todos os fatores mencionados acima.

Os processos de degradação são intensificados com a utilização de luz em comprimentos de onda menores, principalmente próximo da Banda de Soret do FS, onde estes FS são capazes de absorver mais energia.

Em baixas concentrações de Photogem®, o aumento da intensidade de irradiação leva a uma maior eficiência de degradação, tornando o processo mais lento e em altas concentrações, o aumento da intensidade de irradiação leva ao aumento da degradação em um tempo mais rápido.

Deve-se enfatizar que os processos de formação de fotoprodutos induzidos pela irradiação no visível e ultravioleta são dependentes da degradação do FS, uma vez que o aumento da intensidade de irradiação do FS (10x) tanto em alta quanto em baixa concentração

leva a uma diminuição da eficiência de formação dos fotoprodutos no visível, no entanto este decréscimo é maior para PG em concentração maior.

Pode-se afirmar que em altas intensidades de luz, a degradação do FS é favorecida, aumentando a formação de fotoprodutos tipo mono e di pirróis que absorvem no ultravioleta (240-320nm) bem como de produtos intermediários tipo bilirrubina em 545nm (dependentes de oxigênio singlete para sua formação), no entanto é desfavorecida a formação de fotoprodutos tipo clorina com absorbância em 640nm formados predominantemente a partir dos agregados de Hp e HpD por foto-redução e foto-oxidação em ambiente anaeróbico (sem presença de oxigênio).

Em resumo, esta elevada degradação decorrente de uma alta dose de luz prejudica a formação dos fotoprodutos do tipo clorina, fazendo com que estes se formem muito mais rápido, mas também sejam degradados.

Em baixas intensidades de luz a eficiência dos processos de degradação e formação de fotoprodutos é dependente do comprimento de onda de irradiação como também da concentração do FS, sendo que em maiores concentrações e menores comprimentos de onda de irradiação, observamos uma maior eficiência de degradação e formação dos fotoprodutos, sem ocorrer a degradação do próprio fotoproduto formado.

Os resultados dos experimentos citotóxicos com o Photogem® irradiado sugerem que os fotoprodutos obtidos pela degradação do laser em 488 e 514nm são mais citotóxicos do que os fotoprodutos obtidos em 630nm, apesar de que a proporção de PG decorrente da degradação em 488 e em 514nm seja menor do que a proporção de PG decorrente da degradação em 630nm. Isto pode ser explicado pelo fato de que a degradação em 488 e 514nm sendo maior ocasiona uma maior formação de fotoprodutos, o que não ocorre na degradação em 630nm, indicando que quando o fotoproduto estiver em uma maior quantidade na mistura “PG-fotoproduto” a citotoxicidade é maior do que quando em menor

concentração. Pode-se dizer que a iluminação da mistura “PG-fotoproduto” em células deve aumentar a formação de fotoproduto quando estes ainda não atingiram sua máxima formação como é o caso dos fotoprodutos em 630nm, aumentando, portanto sua atividade fotocitotóxica. Deve-se ressaltar que os fotoprodutos apresentam uma menor atividade fotodinâmica quando comparados a PG não irradiado. Sabendo-se que estes fotoprodutos são gerados pela iluminação e que apresentam-se menos citotóxicos, PG quando irradiado em 630nm (λ usado em clínica), deve apresentar uma alta formação de fotoprodutos com o tempo de iluminação, podendo vir a diminuir a eficácia fotodinâmica por um lado, mas também fazer com que o fotossensibilizador ou o fotoproduto remanescente nas células não tumorais seja menos tóxico.

Quando PG é degradado previamente em 514 e 630nm (em alta concentração e dose de energia), a eficiência dos processos de degradação e formação dos fotoprodutos são praticamente equivalente, no entanto de acordo com os espectros de fluorescência, verifica-se que a dose de iluminação do PG em 514nm foi capaz de degradar o FS, gerando e degradando seus próprios fotoprodutos formados, já no caso da irradiação de PG em 630nm, ocorreu a degradação, no entanto a formação do fotoproduto não teve tempo suficiente para ser completa (banda do fotoproduto em 636nm não definida). Estas diferenças podem ser decorrentes do fato que os mecanismos de degradação e formação dos fotoprodutos em 514 e 630nm são diferentes, e apesar de apresentarem bandas no vermelho podem apresentar-se diferentes um dos outros. Estes fatos podem ter ocasionado diferenças nos resultados encontrados de profundidade de necrose em tecido de fígado sadio de ratos, indicando que em menores doses de energia a profundidade de necrose é maior para PG seguido dos fotoprodutos do PG obtidos pela irradiação prévia em 514 e 630nm. No entanto, sob uma maior dose de energia e em maiores concentrações, a profundidade de necrose é a mesma, o que é um indicativo de que os fotoprodutos quando em maiores concentrações e sob alta

iluminação podem ter uma atividade equivalente ao PG, no entanto o aumento da dose de energia pode acarretar desvantagens em TFD. Estes resultados em animais concordam com os obtidos em células, no entanto deve-se enfatizar que nem sempre os resultados *in vitro* são os mesmos que *in vivo*, uma vez que em animais existem outros fatores que podem vir a interferir nos resultados.

Sabendo-se que a eficiência dos processos de transformações dos FSs é dependente da concentração do FS, comprimento de onda de irradiação, intensidade e tempo de iluminação, deve-se estabelecer procedimentos de Dosimetria em TFD, minimizando as possíveis desvantagens da fotodegradação prejudiciais à terapia e potencializando as vantagens com o objetivo de alcançar um maior dano ao tecido tumoral e pouco ou nenhum dano ao tecido normal.

Altas taxas de degradação decorrentes de elevadas doses de irradiação (alta intensidade de luz e ou longos tempos de irradiação) ocasionam desvantagens em TFD, principalmente porque causa uma rápida degradação do FS (menor concentração do FS), levando a uma diminuição do oxigênio singlete (menor concentração de oxigênio molecular nos tecidos), gerando portanto um menor efeito fotodinâmico. Esta alta degradação é um indicativo que em elevadas doses de energia e em tempos longos de iluminação ocorre um excessivo consumo de oxigênio singlete, uma vez que este é necessário nos processos de degradação da molécula do FS e uma baixa quantidade de oxigênio singlete presente pode prejudicar a degradação como também o dano citotóxico nos tecidos tumorais.

No entanto a degradação também apresenta vantagens, uma vez a degradação do FS aumenta a sua cinética de eliminação do organismo, fazendo com que os tecidos normais, que apresentam uma menor retenção de FS sejam protegidos de danos irreversíveis, além de diminuir a fotossensibilidade da pele, que é a maior desvantagem dos FS derivados de hematoporfirinas em TFD.

Logo, estabelecer uma Dosimetria em Terapia Fotodinâmica, requer um controle rígido da dose de luz administrada, isto é, controle da intensidade de luz e do tempo de irradiação, como também em casos de múltiplas sessões ou então em lesões extensas, verificar o melhor intervalo entre as doses de irradiação (fracionamento da luz), aumentando a oxigenação dos tecidos a fim de evitar uma menor eficácia da terapia.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. São Paulo: Manole, 2000. 566p.
2. COLUSSI, V.C. **Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e biológicos**. 1997. 100 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.
3. PAGEM, C. P.; CURTIS M. J.; SUTTER, M. C.; WALKER, M. J. A.; HOFFMAN, B. **B. Farmacologia Integrada**. São Paulo: Manole, 1999. 606 p.
4. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer**. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 1 jun. 2006.
5. 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. Tese (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
6. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de Laringe**. Disponível em: <www.inca.gov.br> Acesso em: 1 jun. 2006.
7. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Câncer de Laringe**. Disponível em: <www.cancernet.nci.nih.gov/statistics>. Acesso em: 1 jun. 2006.
8. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cancer of the larynx**. Disponível: <www.cancernet.nci.nih.gov/cancertopics/pdq/treatment/laryngeal/healthprofessional>. Acesso em: 1 jun. 2006.
9. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Tratamentos do Câncer**. Disponível em: <www.cancernet.nci.nih.gov/cancertopics/treatment/types-of-treatment>. Acesso em: 1 jun.2006.

-
10. SASSE, A. **Tratamentos do Futuro.** Disponível em: <<http://andre.sasse.com/futuro.htm>>. Acesso em: 1 jun. 2006.
11. HOSPITAL DO CÂNCER AMARAL CARVALHO. **Manual de tratamentos e Câncer.** Disponível: <www.saudebrasilnet.com.br/edcancer/folhetos/manual%20tratamento.pdf>. Acesso em: 1 jun. 2006.
12. KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 783 p.
13. SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy in oncology. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 2, n. 6, p. 917-27, 2001.
14. SIMPLICIO, F. I; MAIONCHI, F; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.
15. BROWN, S.B., BROWN, E.A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet. Oncol.**, v. 5, n. 8, p. 497-508, 2004.
16. DOUGHERTY, T.J. Activated dyes as antitumor agents. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 52, n. 4, p. 1333-6, 1974.
17. DOUGHERTY, T.J. Hematoporphyrin derivative for detection and treatment of cancer. **J. Surg. Oncol.**, v. 15, n. 3, p. 209-210, 1980.
18. DOUGHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUPT, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res.**, v. 38, n. 8, p. 2628-2635, 1978.
19. DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

-
20. DOUGHERTY, T.J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. **Photochem. Photobiol.**, v. 46, p. 569-573, 1987.
21. DOUGHERTY, T.J. Photosensitization of malignant tumors. **Semin. Surg. Oncol.**, v. 2, n.1, p. 24-37, 1986.
22. DOUGHERTY, T.J. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. **Photochem. Photobiol.**, v. 45, n. 6, p. 879-889, 1987.
23. DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, n. 6, p. 895-900, 1993.
24. COLUSSI, V.C.; NICOLA, E. M.; NICOLA, J.H. Phototherapy, photochemotherapy, and various photosensitizers. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 42, n. 4, p. 229-236, 1996.
25. SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.
26. KATO, H.; HORAI, T.; FURUSE, K.; FUKUOKA, M.; SUZUKI, S.; HIKI, Y.; ITO, Y.; MIMURA, S.; TENJIN, Y.; HISAZUMI, H. Photodynamic therapy for cancers: a clinical trial of porfimer sodium in Japan. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 84, n. 11, p. 1209-1214, 1993.
27. PHOTODYNAMIC Therapy. **The mechanism in cells.** Disponível em: <<http://www.chestsurg.org/pdtpphoto.htm>>. Acesso em: 1 jun. 2006.
28. SCHOOL OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY AT THE UNIVERSITY OF LEEDS. **Photodynamic Therapy.** Disponível em: <<http://www.bmb.leeds.ac.uk/pdt/>>. Acesso em: 1 jun. 2006.

-
29. SCHUITMAKER, J. J.; BAAS, P.; VAN LEENGOED, H. L.; VAN DER MEULEN, F. W.; STAR, W. M.; VAN ZANDWIJK, N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 34, n. 1, p. 3-12, 1996.
30. ZECELL, D.M. **Hematoporfirina e derivados: propriedades ópticas e terapia fotodinâmica do câncer.** 1987. 97f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.
31. ZECELL, D.M. **Processos para monitoração e otimização da terapia fotodinâmica de tumores.** 1991. 145f. Tese (Doutorado) - Instituto de Física "Gleb Wataghin", Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.
32. PASS, H.I. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, n. 6, p. 443-456, 1993.
33. CARVALHO, V. C. M.; MELO, C. A. S.; BAGNATO, V. S.; PERUSSI, J. R. Comparison of the effects of cationic and anionic porphyrins in tumor cells under illumination of argon ion laser. **Laser Physics**, v. 12, n. 10, p. 1314-1319, 2002.
34. JORI, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 36, n. 2, p. 87-93, 1996.
35. WOODBURN, K. W.; FAN, Q.; KESSEL, D.; WRIGHT, M.; MODY, T. D.; HEMMI, G.; MAGDA, D.; SESSLER, J. L.; DOW, W. C.; MILLER, R. A.; YOUNG, S. W. Phototherapy of cancer and atheromatous plaque with texaphyrins. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 14, n. 5, p. 343-348, 1996.
36. COLUSSI, V. C.; FEYES, D. K.; MUKHTAR, H. Perspectives of photodynamic therapy for skin diseases. **Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol.**, v. 11, n. 6, p. 336-346, 1998.

37. SMETANA, Z.; BEN-HUR, E.; MENDELSON, E.; SALZBERG, S.; WAGNER, P.; MALIK, Z. Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 44, n. 1, p. 77-83, 1998.
38. BEN-HUR, E.; OETJEN, J.; HOROWITZ, B. Silicon phthalocyanine Pc 4 and red light causes apoptosis in HIV-infected cells. **Photochem. Photobiol.**, v. 65, n. 3, p. 456-466, 1997.
39. COLUSSI, V. C.; FEYES, D. K.; MULVIHILL, J. W.; LI, Y. S.; KENNEY, M. E.; ELMETS, C. A.; OLEINICK, N. L.; MUKHTAR, H. Phthalocyanine 4 (Pc 4) photodynamic therapy of human OVCAR-3 tumor xenografts. **Photochem. Photobiol.**, v. 69, n.2, p. 236-241, 1999.
40. WEISHAUP, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. **Cancer Res.**, v. 36, n. 7, p. 2326-2329, 1976.
41. HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY, T.J. How does photodynamic therapy work? **Photochem. Photobiol.**, v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.
42. PENG, Q.; MOAN, J.; NESLAND, J. M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. **Ultrastruct. Pathol.**, v. 20, n. 2, p. 109-129, 1996.
43. ZAIDI, S. I.; OLEINICK, N. L.; ZAIM, M. T.; MUKHTAR. Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice: electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, n. 6, p. 771-776, 1993.
44. CHEN, Q.; CHEN, H.; HETZEL, F. W. Tumor oxygenation changes post-photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 63, n. 1, p. 128-131, 1996.

-
45. SHELEG, S. V.; ZHAVRID, E. A.; KHODINA, T. V.; KOCHUBEEV, G. A.; ISTOMIN, Y. P.; CHALOV, V. N.; ZHURAVKIN, I. N. Photodynamic therapy with chlorin e₆ for skin metastases of melanoma. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 20, n. 1, p. 21-26, 2004.
46. OLIVEIRA, M. Arma a laser contra o câncer. **Rev. Pesq. FAPESP**, p. 64-67, 2002.
47. BAGNATO, V.S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L.G.; SIBATA, C.H.; ALLISON, R.R. PDT experience in Brazil: A regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 107-118, 2005.
48. BRAULT, D. Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 6, n. 1-2, p. 79-86, 1990.
49. STRAUSS, W.S.L.; SAILER, R.; GSCHWEND, M.H.; EMMERT, H.; STEINER, R.; SCHNECKENBURGER, H. Selective examination of plasma membrane-associated photosensitizers using total internal reflection fluorescence spectroscopy: Correlation between photobleaching and photodynamic efficacy of protoporphyrin IX. **Photochem. Photobiol.**, v. 67, n. 3, p. 363-369, 1998.
50. GEORGAKOUDI, I.; NICHOLS, M.G.; FOSTER, T.H. The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. **Photochem. Photobiol.**, v. 65, n. 1, p. 135-144, 1997.
51. POTTIER, R.; KENNEDY, J.C. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 1990.
52. TOMINAGA, T. T.; YUSHMANOV, V. E.; BORISSEVITCH, I. E.; IMASATO, H.; TABAK, M. Aggregation phenomena in the complexes of iron tetraphenylporphine sulfonate with bovine serum albumin. **J. Inorg. Biochem.**, v. 65, n. 4, p. 235-244, 1997.

-
53. WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. L. **Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: Academic Press, 1968. 1187p.
54. SANTIAGO, P.S. **Estudos espectroscópicos da interação de porfirinas catiônicas com modelos de membrana biológica**. 2004. 145f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
55. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Hemoglobina**. Disponível em: <www.ufrgs.br/bioquimica/galmolec/proteinas/hemoglobina/right-c.htm>. Acesso em: 1 jun.2006.
56. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Heme**. Disponível em: <www.ufrgs.br/bioquimica/galmolec/proteinas/hemoglobina/right-c.htm> Acesso em: 1 jun.2006.
57. IVANOV, A.V.; RESHETNICKOV, A.V.; PONOMAREV, G.V. One more PDT application of Chlorin e₆. **SPIE**, v. 3909, p. 131-137, 2000.
58. MIRONOV, A.F.; NIZHNIK, A.N.; NOCKEL, A.Y. Haematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 4, p. 297-306, 1990.
59. RÚSSIA. Ministério dos serviços públicos de saúde da Federação Rússia. Certificado de Registro do medicamento Photogem de nº 47. **Farmacopéia Russa**. nº 42-3199-98, 10 fev. de 1999. p. 1-6.
60. CHISSOV, V. I.; SKOBELKIN, O. K.; MIRONOV, A. F.; SMIRNOV, V. V.; SOKOLOV, V. V.; SUKHIN, G. M.; FILONENKO, E. V.; LITVIN, D. G.; STRANADKO, E. F.; KOLOBANOV, A. S.; ASTRAKHANKINA, T. A.; NOCKEL, A. Y.; ZHARKOVA, N. N. Photodynamic therapy and fluorescent diagnosis of malignant tumors using preparation Photogem. **Khirurgiia** (Russia), n. 12, p. 3-6, 1994.

61. SOKOLOV, V. V.; STRANADKO, E. F.; ZHARKOVA, N. N.; IAKUBOVSKAIA, R. I.; FILONENKO, E. V.; ASTRAKHANKINA, T. A. The photodynamic therapy of malignant tumors in basic sites with the preparations Photohem and Photosens (the results of 3 years of observations). **Vopr. Onko.l** (Russia), v. 41, n. 2, p. 134-148, 1995.
62. PRIVALOV, V.A.; LAPP, A.V.; SELIVERSTOVA, O.V.; FAIZRAKHMANOVA, A.B.; YAROVOYA, N.N.; KOCHNEVAA, E.V.; EVNEVICH, M.V.; ANIKIN, A.S.; RESHETNICOV, A.V.; ZALEVSKY, I.D. ; KEMOV, Y.V. Clinical Trials of a New Chlorin Photosensitizer for Photodynamic Therapy of Malignant Tumors. **Proceedings of SPIE**, v. 4612, p.178-189, 2002.
63. ROMANKO, YU. S.; TSYB, A. F.; KAPLAN, M. A.; POPUCHIEV, V. V. Effect of Photodynamic Therapy with Photodithazine on Morphofunctional Parameters of M-1 Sarcoma. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 6, p. 584 - 589, 2004.
64. VARGAS, F.; DÍAZ, Y.; YARTSEV, V.; MARCANO, A.; LAPP, A. **Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media**. Disponível em: <http://medphys.csu.ru/publication/pdt/pdt_venesuela_2004.pdf>, 2004. Acesso em: 1 jun. 2006.
65. 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. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, n. 18, p. 4853-60, 2004.
66. CENTER OF LASER IN MEDICINE. **Historical Aspects of Photodynamic Therapy Development**. Disponível em: <<http://www.magicray.ru/ENG/lecture/L2/2.html>>. Acesso em: 1 jun. 2006.
67. SITE COMERCIAL RUSSO. **Novel Drug Form of Chlorin E₆**. Disponível em: <<http://www.grand.ru/index.php?p=pub2>> Acesso em: 1 jun. 2006.

-
68. MEDICAL PHYSICS CENTER. **Main requirements to photosensitizers (PS).** Disponível em: <<http://medphys.csu.ru/English/load.php?p=1252>>. Acesso em: 1 jun. 2006.
69. CUNDERLIKOVA, B.; KONGSHAUG, M.; GANGESKAR, L.; MOAN, J. Increased binding of chlorin e(6) to lipoproteins at low pH values. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 32, n. 7, p. 759-768, 2000.
70. CUNDERLIKOVA, B.; GANGESKAR, L.; MOAN, J. Acid-base properties of chlorin e₆: relation to cellular uptake. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 53, n. 1-3, p. 81-90, 1999.
71. BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, n. 47, p. 9513-9547, 2001.
72. 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)dporphyrin and phthalocyanine systems. **J. Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 4, n. 5, p. 544-550, 2000.
73. 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. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 53, n. 1-3, p. 136-143, 1999.
74. 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, n. 4, p. 271-278, 1998.
75. ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformations of sensitizers .2. Photoproducts formed in aqueous solutions of porphyrins. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 39, n. 2, p. 172-175, 1997.

-
76. ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformations of sensitizers .1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 39, n. 2, p. 167-171, 1997.
77. ROTOMSKIS, R.; BAGDONAS, S.; STRECKYTE, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 33, n. 1, p. 61-67, 1996.
78. HADJUR, C.; LANGE, N.; REBSTEIN, J.; MONNIER, P. MONNIER, P.; BERGH, H. VAN DEN.; 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. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 45, p. 170-178, 1998.
79. SPIKES, J.D.; BOMMER, J.C. Photobleaching of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, n. 3, p. 346-350, 1993.
80. LANGMACK, K.; MEHTA, R.; TWYMAN, P.; NORRIS, P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates--theory and practice. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 60, n. 1, p. 37-43, 2001.
81. MOAN, J.; BERG, K. The Photodegradation of Porphyrins in Cells Can Be Used to Estimate the Lifetime of Singlet Oxygen. **Photochem. Photobiol.**, v. 53, n. 4, p. 549-553, 1991.
82. OCHSNER, M.J. Photophysical and photobiological process in the photodynamic therapy of tumor. **Photochem. Photobiol. B.**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.
83. BOYLE, D.G.; POTTER, W.R. Photobleaching of Photofrin II as a means of eliminating skin photosensitivity. **Photochem. Photobiol.**, v. 46, n. 6, p. 997-1001, 1987.

84. BEZDETNAYA, L.; ZEGHARI, N.; BELITCHENKO, I.; BARBERIHEYOB, M.; MERLIN, J. L.; POTAPENKO, A.; GUILLEMIN, F. Spectroscopic and biological testing of photobleaching of porphyrins in solutions. **Photochem. Photobiol.**, v. 64, n. 2, p. 382-386, 1996.
85. ROTOMSKIS, R.; VANDEMEENT, E. J.; ARTSMA, T. J.; HOFF, A. J. Fluorescence-Spectra of Hematoporphyrin and Hematoporphyrin-Diacetate Aggregates in Buffer Solution. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 3, n. 3, p. 369-377, 1989.
86. STRECKYTE, G.; ROTOMSKIS, R. Phototransformations of porphyrins in aqueous and micellar media. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 18, n. 2-3, p. 259-263, 1993.
87. ROTOMSKIS, R.; VAICAITIS, V.; PISKARSKAS, A. Time-Resolved Absorption-Spectroscopy of Hematoporphyrin and Its Photoproducts. **Chemical Physics Letters**, v. 202, n. 3-4, p. 233-236, 1993.
88. BYRNE, C. J. ; COOPER, M.A.; COWLED, P. A. ; JOHNSTONE, R. A.W. ; MACKENZIE, L.; MARSHALLSAY, L.V.; MORRIS, I.K. ; MULDOON, C. A. ; RAFTERY, M. J. ; YIN, S. S.; DAVIDWARD, A. The Photodynamic Therapy (PDT) Anticancer Activity of a Range of Porphyrin Dimers and Related Compounds Derived from Hematoporphyrin. **Aust. J. Chem.**, v. 57, p. 1091-1102, 2004.
89. MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Res.**, v. 23, n. 5A, p. 3591-3600, 2003.
90. GOTTSCHLICH, S.; LIPPERT, B. M.; SCHADE, W.; WERNER, J. A. Time-resolved fluorescence spectroscopy of a hematoporphyrin derivative used for photodynamic therapy of cancer. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, v. 98, n. 2, p. 237-240, 1997.

91. GRADES, E. A. **Investigations on structure-property-relationship of self associating photosensitizers by means of time-resolved spectroscopy.** 2003. 110f. Tese (Doutorado)- Vorgelegt dem Rat der Physikalisch-Astronomischen Fakultät der Friedrich-Schiller, Universität Jena, Jónava (Litauen), 2003.
92. GANDINI, S.C.M. **Estudos espectroscópicos da interação de porfirinas aniônicas com modelos de sistemas biológicos.** 2001. 179f. Tese (Doutorado em Química Analítica)-Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
93. WOLDE, A. ten; MARKIES, B. A.; Pieterse, W.A.; SPECKAMP, W. NICO. Stability and scanning electron microscopy of Photofrin-H and Photosan-3. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 36, p. 139-142, 1996.
94. STRATONNIKOV, A.A.; MEEROVICH, G.A.; LOSCHENOV, V.B. Photobleaching of photosensitizers applied for Photodynamic Therapy. **SPIE**, v. 3909, p. 81-91, 2000.
95. DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods.**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.
96. CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res.**, v. 47, n. 4, p. 936-42, 1987.
97. MOAN, J.; KESSEL, D. Photoproduct Formed from Photofrin II in Cells. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol**, v. 1, p. 429-436, 1988.
98. CHOU, T. C.; HAYBALL, M. **CalcuSyn.** Windows software for dose effect analysis. Inglaterra: Biosoft (Cambridge), 1996. p. 1-5.

99. FERREIRA, J. **Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados Pós Terapia Fotodinâmica - Estudo *in vivo***. 2004. 99f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
100. MELO, C. A. S.; KURACHI, C.; GRECCO, C.; SIBATA, C. H.; CASTRO-E-SILVA, O.; BAGNATO, V. S. Characterization of light penetration in rat tissues. **J. Clin. Laser Med. Surg.**, v. 19, n. 4, p. 175-179, 2001.
101. ZENG, H.; KORBELIK, M.; MCLEAN, D. I.; MACAULAY, C.; LUI, H. Monitoring photoproduct formation and photobleaching by fluorescence spectroscopy has the potential to improve PDT dosimetry with a verteporfin-like photosensitizer. **Photochem. Photobiol.**, v. 75, n. 4, p. 398-405, 2002.
102. KONIG, K.; WABNITZ, H.; DIETEL, Variation in the fluorescence decay properties of haematoporphyrin derivative during its conversion to photoproducts. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 8, n. 1, p. 103-111, 1990.
103. BERENBAUM, M.C.; BONNETT, R.; SCOURIDES, P.A. In vivo biological activity of the components of haematoporphyrin derivative. **Br. J. Cancer.**, v. 45, n. 4, p. 571-581, 1982.
104. MENEZES, P. F. C.; MELO, C. A. S.; BAGNATO, V. S.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Dark cytotoxicity of the photoproducts of the photosensitizer Photogem after photobleaching induced by a laser. **Laser Physics**, v. 15, n. 3, p. 435-442, 2005.
105. 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.

-
106. MENEZES, P. F. C.; SIBATA, C.; BAGNATO, V. S.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Photocytotoxicity of Photogem[®] Submitted to Photobleaching. **SPIE**, v. 5689, p. 244-254, 2005.
107. JONES, L. R.; GROSSWEINER, L. I. Singlet oxygen generation by Photofrin in homogeneous and light-scattering media. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 26, n. 3, p. 249-256, 1994.
108. BEZDETNAYA, L.; ZEGHARI, N.; BELITCHENKO, I.; BARBERIHEYOB, M.; MERLIN, J. L.; POTAPENKO, A.; GUILLEMIN, F. Spectroscopic and biological testing of photobleaching of porphyrins in solutions. **Photochem. Photobiol.**, v. 64, n. 2, p. 382-386, 1996.
109. BELITCHENKO, I.; MELNIKOVA, V.; BEZDETNAYA, L.; REZZOUG, H.; MERLIN, J. L.; POTAPENKO, A.; GUILLEMIN, F. Characterization of photodegradation of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) in solution: biological consequences in human tumor cells. **Photochem. Photobiol.**, v. 67, n. 5, p. 584-590, 1998.
110. TITA, S. P. S.; PERUSSI, J. R. The effect of porphyrins on normal and transformed mouse cell lines in the presence of visible light. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 10, p. 1331-1336, 2001.
111. REZZOUG, H.; BARBERI-HEYOB, M.; MERLIN, J. L.; BOLOTINE, L.; LIGNON, D. GUILLEMIN, F. In vitro comparison of the photodynamic activity of meso-tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin and hematoporphyrin derivative. **Bull. Cancer**, v. 83, n. 10, p. 816-822, 1996.
112. ROUSSET, N.; VONARX, V.; ELEOUET, S.; CARRE, J.; BOURRE, L.; LAJAT, Y.; PATRICE, T. Cellular distribution and phototoxicity of benzoporphyrin derivative and Photofrin. **Res. Exp. Med. (Berl)**, v. 199, n. 6, p. 341-357, 2000.

-
113. GOMES, E. R.; CRUZ, T.; LOPES, C. F.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, C. B. Photosensitization of lymphoblastoid cells with phthalocyanines at different saturating incubation times. **Cell Biol. Toxicol.**, v. 15, n. 4, p. 249-260, 1999.
114. BLAIS, J.; AMIRAND, C.; BALLINI, J. P.; DEBEY, P.; FOULTIER, M. T.; PATRICE, T. Photofrin-induced fluorescence in progressive and regressive murine colonic cancer cells: correlation with cell photosensitivity. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 27, n. 3, p. 225-31, 1995.
115. SEEMA GUPTA, B.S.; DWARAKANATH, K.; MURALIDHAR, V. JAIN. Cellular uptake, localization and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in human glioma and squamous carcinoma cell lines. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 69, p. 107-120, 2003.
116. FERREIRA, J.; KURACHI, C.; MELO, C. A. S.; MORIYAMA, L. T.; ZUCOLOTO, S.; BAGNATO, V. S. Necrosis characteristics of photodynamics therapy in normal rat liver. **Laser Physics**, v. 14, n. 2, p. 209-212, 2004.
117. MANG, T. S.; DOUGHERTY, T. J.; POTTER, W. R.; BOYLE, D. G.; SOMER, S.; MOAN, J. Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 45, n. 4, p. 501-506, 1987.
118. MENEZES, P. F. C.; MELO, C. A. S.; BAGNATO, V. S.; IMASATO, H.; PERUSSI, J. R. Cytotoxicity of the photoproducts of Photogem[®] after photobleaching induced by intense illumination. **SPIE**, v. 5622, n. 2, p. 51-55, 2004.
119. MENEZES, P. F. C.; MELO, C. A. S.; BAGNATO, V. S.; PERUSSI, J. R. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct of the photosensitizer Photogem[®] during intense illumination. **Laser Physics**, v. 14, n. 9, p. 1214-1218, 2004.