UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA DE
FOTOSSENSIBILIZADORES COM APLICAÇÃO EM
TERAPIA FOTODINÂMICA**

Renato Cavalcante da Silva

Orientadora: Prof^a Dr^a Janice Rodrigues Perussi

São Carlos

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA DE
FOTOSSENSIBILIZADORES COM APLICAÇÃO EM
TERAPIA FOTODINÂMICA**

Renato Cavalcante da Silva

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Janice Rodrigues Perussi

São Carlos

2007

**Este trabalho é dedicado aos meus pais e a minha irmã,
em forma de agradecimento por todo o incentivo em todas
as etapas da minha vida.**

Agradecimentos

Prof^a. Dr^a. Janice Rodrigues Perussi, muito obrigado por sua dedicação, seriedade e por todo incentivo para que eu concluísse este trabalho.

Prof. Dr. Gilberto Chierice, muito obrigado pela convivência amiga.

Amigos do Grupo de Fotossensibilizadores e Grupo de Biofísica Molecular, obrigado pela fraterna acolhida em São Carlos.

Amigos da Seção de Pós-Graduação e demais funcionários do IQSC, obrigado pela simpatia e eficiência que fazem desta instituição um excelente local para se trabalhar.

Juliana, Priscila e Cláudia muito obrigado por tornar cada nova manhã um momento único.

Joelmir, João Fernando, Laura e Vinícius obrigado por fazer do nosso cotidiano sempre um bom motivo para se comemorar.

Sandra, Daniele e Keila: três diferentes formas de uma mesma amizade que começou há alguns e que hoje é motivo de orgulho pela seriedade com que vocês conduzem suas carreiras.

Maíra, Kátia, Willy, Evandro, Fabiane, Fayene e Eliane, obrigado por dividir comigo todos aqueles momentos de alegria.

Amigos do Curso de Licenciatura em Ciências Exatas do IFSC, muito obrigado pela breve e valiosa companhia.

Betinho valeu por tudo meu irmão.

Amigos da Pedra Agroindustrial S.A. muito obrigado por cada nova oportunidade.

Laurinha, muito obrigado por sua amizade sincera.

Rodrigo Curzio e Família, sou muito grato pela acolhida nesta nova etapa em Ribeirão Preto.

Rodrigo Picchi, Paulo, Allan e Sandro, muito obrigado por todo o incentivo.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUÇÃO	1
1.1 A terapia fotodinâmica	1
1.2 O mecanismo da terapia fotodinâmica	3
1.3 A janela terapêutica para o procedimento de irradiação	5
2. Fotossensibilizadores.....	6
2.1 Características de um fotossensibilizador ideal.....	11
2.2 Transporte e localização dos fotossensibilizadores.....	11
3. Estudos comparativos de fotossensibilizadores.....	14
II. OBJETIVOS	20
III. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Reagentes e Equipamentos.....	21
3.2 Experimento de Fotoxidação de Ácido Úrico	22
3.3 Experimento de Fotoxidação de BSA.....	23
3.3.1 Cálculo das Constantes de Velocidade	23
3.4 Experimento de Hemólise	25

3.4.1 Investigação do mecanismo envolvido na hemólise de eritrócitos.....	26
3.5 Determinação dos coeficientes de partição dos fotossensibilizadores	27
3.6 Descarte das amostras	28
3.7 Cálculo da média amostral e do desvio padrão	28
 IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 30
4.1 Estudos espectroscópicos dos fotossensibilizadores.....	30
4.2 Experimentos de fotoxidação de BSA	32
4.3 Experimentos de fotoxidação do ácido úrico	37
4.4 Experimentos de Hemólise	42
4.4.1 Determinação do mecanismo envolvido na hemólise de eritrócitos	47
4.5 Determinação dos coeficientes de partição dos fotossensibilizadores	50
4.6 Algumas considerações finais.....	51
 V. CONCLUSÃO.....	 54
 VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Representação do diagrama de Jablonski	3
Figura 2:	Reações envolvidas no mecanismo do tipo I	4
Figura 3:	Processos envolvidos no mecanismo do tipo II.....	4
Figura 4:	O anel porfirínico.....	6
Figura 5:	Estrutura básica do grupo heme da hemoglobina e a estrutura molecular da Hematoporfirina IX.....	7
Figura 6:	Photofrin® e alguns novos compostos estudados para uso em PDT.....	10
Figura 7:	Espectros de absorção ótica dos fármacos HpD: Protofrin®, Photogem® e Photosan®, concentração 20µgmL ⁻¹ , preparados em PBS, pH=7,4.....	30
Figura 8:	Espectro de absorção ótica da clorina Photodithazine®, concentração 20µg.mL ⁻¹ , preparada em PBS, pH=7,4.....	31
Figura 9:	Supressão de fluorescência nos espectros de emissão do BSA ($\lambda_{exc}=279nm$) devido ao efeito fotodinâmico. Solução de BSA (2mM), preparada em PBS (pH=7,4), irradiada com LED ($\lambda=630nm$, $I=25mWcm^2$, $t= 40min$) na presença de FS (1µg mL ⁻¹).	32
Figura 10:	Cinéticas de fotoxidação do BSA.....	33
Figura 11:	A) Comparação dos coeficientes angulares (k) obtidos diretamente da relação linear entre $\ln(F/F_0)$ e o tempo de irradiação. B) Comparação dos valores das constantes de velocidade de fotoxidação do BSA (k_c) obtidas após a correção dos valores de k pelos valores das absorbâncias dos FS no comprimento de onda de irradiação ($A_{FS \lambda=630nm}$).	34
Figura 12:	Reação de cicloadição entre o ¹ O ₂ e o triptofano [76].....	36

Figura 13:	Espectro de absorção ótica da solução de ácido úrico ($30\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em tampão fostato, pH 7.4.....	37
Figura 14:	Variação espectral da mistura Photogem® ($15\mu\text{g mL}^{-1}$) e AU ($30\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em tampão fostato (pH 7.4), irradiada com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I= 25\text{mW cm}^{-2}$, $t=40\text{min}$). As setas indicam o decréscimo nas bandas do ácido úrico e do Photogem.....	38
Figura 15:	Variação da absorbância das bandas do ácido úrico ($\Delta_{\text{AU}} 293\text{nm}$ e $\Delta_{\text{AU}} 235\text{nm}$) e do Photogem($\Delta_{\text{PG}} 369\text{nm}$) em função do tempo de irradiação.....	39
Figura 16:	Fotoxidação do ácido úrico via oxigênio singlete.....	39
Figura 17:	Espectros de absorção ótica antes e depois de irradiar com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I= 13\text{mW cm}^{-2}$, $t=300\text{s}$) uma mistura contendo AU($30\mu\text{g mL}^{-1}$) e FS($15\mu\text{g mL}^{-1}$). Os espectros de absorção ótica evidenciam a diminuição da banda em 293nm devido a fotoxidação do ácido úrico. A linha azul (-) indica o espectro obtido após o tempo de irradiação, a linha vermelha (-) indica o espectro obtido antes da irradiação.....	41
Figura 18:	Espectro de absorção ótica da oxihemoglobina.	43
Figura 19:	Fotoxidação de suspensão de eritrócitos, hematócrito 2%, na presença de Photogem $10\mu\text{g mL}^{-1}$, irradiada com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I= 25\text{mW cm}^{-2}$, $t=10\text{min}$).	45
Figura 20:	Curvas de hemólise obtidas para os FS.....	46
Figura 21:	Hemólise com Photogem® na ausência(-) e presença(-) de D_2O	47
Figura 22:	Curvas de hemólise obtidas para os fotossensibilizadores na presença de supressores. A linha verde (-) indica a presença de manitol, linha vermelha(-) a presença de azida e a linha preta (-) indica a hemólise realizada na ausência de supressores.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Distribuição de algumas porfirinas entre proteínas do plasma humano.....	13
Tabela 2:	Características espectroscópicas dos aminoácidos aromáticos da BSA.	15
Tabela 3:	Valores das constantes de velocidade da reação de fotooxidação de BSA(2mM) na presença de FS (1µg.mL ⁻¹), em solvente (pH=7,4), obtidas através da irradiação das amostras com LED (λ=630nm, I=25mW.cm ² , t= 40min).	34
Tabela 4:	Determinação do coeficiente de atividade fotodinâmica.	42
Tabela 5:	Valores de %H _{MÁX} e t ₅₀ obtidos para os FS estudados.	46
Tabela 6:	Valores de %H _{MÁX} obtidos.	49
Tabela 7:	Valores de t ₅₀ obtidos.....	49
Tabela 8:	Valores de P e Log P determinados para os FS.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Atividade Fotodinâmica
AU	Ácido Úrico
BSA	Albumina de Soro Bovino (do termo em inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
D₂O	Água Deuterada
FS	Fotossensibilizador
HDL	Lipoproteínas de alta densidade (do termo em inglês: <i>High-density lipoproteins</i>)
HP	Hematoporfirina
HpD	Derivados de Hematoporfirina
HpIX	Hematoporfirina IX
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade (do termo em inglês: <i>Low-density lipoproteins</i>)
LED	Diodo Emissor de Luz (do termo em inglês: <i>Light Emitting Diode</i>)
NPE6	N-aspartil-clorina-e-6
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato (do termo em inglês: <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDT	Terapia Fotodinâmica (do termo em inglês: <i>Photodynamic Therapy</i>)
PPIX	Protoporfirina IX
PF	Photofrin®
PG	Photogem®
PS	Photosan®
PZ	Photodithazine®

RESUMO

Fotossensibilizadores são moléculas capazes de interagir com a luz de modo a gerar espécies altamente reativas de oxigênio como o oxigênio singlete e outras formas radicalares. Esta propriedade pode ser utilizada para o tratamento de câncer, remoção de contaminantes ambientais, inativação de agentes patogênicos no sangue e hemoderivados, bem como na esterilização alimentos. A técnica que utiliza o efeito fotodinâmico para o tratamento de câncer recebe o nome Terapia Fotodinâmica (do termo em inglês: *Photodynamic Therapy* - PDT). Photofrin®, Photogem® e Photosan® são fármacos de primeira geração, derivados da hematoporfirina, que constituem o principal grupo de medicamentos com aplicação clínica em PDT. Photodithazine® é um fármaco de 2ª geração, derivado de clorina-e-6, que encontra-se em fase de testes clínicos e apresenta resultados promissores como fotossensibilizador (FS).

Este trabalho tem o objetivo de investigar a eficiência fotodinâmica destes fármacos através de experimentos que envolvem a utilização da albumina de soro bovino (BSA) e o ácido úrico (AU) como dosímetros químicos; eritrócitos como modelo de membrana celular e a determinação do coeficiente de partição (P ou Log P) para se investigar lipofilicidade e a interação dos FS com as membranas celulares. Soluções contendo BSA e FS, preparadas em tampão fosfato, foram iluminadas com LED ($\lambda=630\text{nm}$) e o decréscimo na fluorescência do BSA em 340nm foi utilizado para se calcular constante da velocidade de fotoxidação (k_c , min^{-1}). No teste do AU, a mistura AU e FS foi iluminada com LED e o coeficiente de atividade fotodinâmica (AF, $\text{m}^2\cdot\text{J}^{-1}$) foi determinado através do decréscimo da banda do AU em 293nm. Os resultados convergem para a seguinte ordem de eficiência fotodinâmica: Photodithazine® >> Photogem® > Photofrin® > Photosan®, baseada nos valores de k_c ($14,8\pm0,3$); ($9,8\pm0,5$); ($3,2\pm0,7$) e ($2,9\pm0,5$) min^{-1} e AF (64 ± 14), (37 ± 9), (9 ± 2) e (4 ± 1) m^2J^{-1} , respectivamente. Com objetivo de determinar o tempo necessário para causar 50% de hemólise (t_{50}), amostras de eritrócitos (hematócrito=2%) foram irradiadas por 10 minutos e o dano causado à membrana

pelo efeito fotodinâmico foi monitorado através da variação na absorbância característica da oxihemoglobina em 540 e 577nm. O mecanismo preferencial envolvido na fotoxidação da membrana celular foi investigado por meio de experimentos que avaliaram a influência de água deuterada, azida de sódio e manitol na velocidade de fotoxidação dos eritrócitos. Os resultados dos experimentos de hemólise apontam para a seguinte ordem de eficiência fotodinâmica: Photodithazine® >> Photofrin® > Photogem® > Photosan®, baseada nos valores de t_{50} : (1,2±0,3), (3,4±0,1), (3,8±0,2), (5,2±0,1)min e logP (0,21); (0,15); (0,11); (-0,21); respectivamente.

A hemólise com Photogem® em meio deuterado foi cerca de 25% mais rápida e a presença de azida de sódio causou diminuição na hemólise, expressa pela diminuição dos valores de porcentagem máxima de hemólise (%H_{MÁX}) e aumento nos valores de t_{50} . A presença de manitol nos ensaios de hemólise não apresentou influência nos valores de t_{50} e %H_{MÁX}, indicando que a hemólise não ocorre via mecanismo radicalar, mas aponta para o mecanismo do tipo II, via oxigênio singlete, como sendo o mecanismo predominante na fotoxidação da membrana plasmática dos eritrócitos pelos FS estudados.

As diferenças encontradas entre os fármacos HpD são atribuídas as suas diferentes constituições, uma vez que tratam-se de misturas de monômeros, dímeros e oligômeros em diferentes frações. Experimentos realizados em solução homogênea, tais como os experimentos de fotoxidação de BSA e o teste do ácido úrico, fornecem importantes informações a respeito da estrutura-atividade dos fármacos, mas negligenciam os efeitos de interação dos FS com o meio biológico. Em ambiente biológico, os FS participam de inúmeras interações adicionais, constituindo sistemas únicos, com diferentes propriedades fotofísicas e fotoquímicas. Estudos anteriores, realizados no nosso grupo de pesquisa, envolvendo a determinação da citotoxicidade destes FS em culturas de células normais e tumorais, bem como estudos de separação cromatográfica dos constituintes de fármacos HpD estão de acordo com os resultados apresentados neste trabalho.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a developing technology that has been used for cancer treatment and recognized to have a huge potential for microorganisms inactivation and detoxication. It is based on light irradiation of a photosensitizer (PS) in order to produce reactive oxygen species. Many kinds of compounds are known to have photosensitizing properties. Photofrin®, Photogem® and Photosan® consist of mixtures of monomers, dimers, and oligomers from hematoporphyrin treated chemically being the most clinically used PS. Photodithazine® is a water soluble chlorin-e6-derivative, a second-generation drug.

The present work provides a comparative study between these PS, using bovine serum albumin (BSA) and uric acid (UA) as chemical dosimeters as well as human red blood cells (RBC) as a cell membrane model and octanol/phosphate buffer partition coefficient (logP) to access the lipophilicity of the compounds. BSA and PS solutions in phosphate buffer were illuminated with LED ($\lambda=630\text{nm}$) and the decrease in the BSA fluorescence at 340nm was used to calculate the photooxidation rate constant (k_c , min^{-1}). In UA test, a mixture of UA and photosensitizer was illuminated with LED ($\lambda=630\text{nm}$) and the photodynamic activity coefficient (PA, m^2J^{-1}) was determined by the decrease in the 293nm absorbance of UA. The results from these methodologies suggest that the photodynamic efficiency order is: Photodithazine® > Photogem® > Photofrin® > Photosan®, based on PA values (64 ± 14), (37 ± 9), (9 ± 2) and (4 ± 1) m^2J^{-1} and k_c values (14.8 ± 0.3); (9.8 ± 0.5); (3.2 ± 0.7) and (2.9 ± 0.5) min^{-1} , respectively. In order to determine the t_{50} (time for 50% of hemolysis) the samples of RBC (hematocrit=2,0%) were irradiated for 10min and the absorbance characteristic of oxyhemoglobin (540 e 577nm) released due to the damage and consequent membrane lysis by the action of the PS was obtained. The mechanism involved in the photooxidation of the membrane was also studied determining how sodium azide, deuterium oxide and manitol affect the t_{50} values. The hemolysis experiments and logP values suggest the following order: Photodithazine® > Photofrin® > Photogem® > Photosan®, based on t_{50} values (1.2 ± 0.3), (3.4 ± 0.1), (3.8 ± 0.2), (5.2 ± 0.1)min and logP (0.21);

(0.15); (0.11); (−0.21), respectively. The rate of the hemolysis is increased about 25% in the deuterium oxide presence, and decreased in the sodium azide presence. Moreover, the experiments performed in the manitol presence not show any difference on t_{50} values. These results showed that the preponderant mechanism in the photohemolysis is of the type II.

The differences in the photooxidative action of the HpD should be due to the diverse content of monomers, dimmers and oligomers of the PS components. The results of hemolysis experiments suggest that these differences should result in singular interactions of HpD with the membrane constituents. Photofrin seems to be the more effective HpD concerning the hemolysis of erythrocytes and logP values.

Therefore the results of all used methodologies suggest that clorin-e6-derivative seems to be a much more efficient PS, followed by the three HpD. Photooxidation experiments performed in simple solution provide valuable information on structure-activity relationships, but neglect the effects due to of membrane interactions; the PS molecule can bind with the membrane of RBC and this PS-RBC complex is a unique system with different photophysical and photochemical properties. These results have been confirmed in our group by cytotoxic studies with tumor and non-tumor cells as well as by chromatographic separation of the HpDs showing that the correlation between the parameters still holds.

I. INTRODUÇÃO

1.1 A terapia fotodinâmica

Algumas moléculas são capazes de interagir com a luz de modo a gerar espécies altamente reativas de oxigênio como o oxigênio singlete e outras formas radicalares. Essas moléculas fotossensíveis são chamadas de fotossensibilizadores (FS) e sua propriedade de interagir com a luz gerando espécies altamente reativas é conhecida por efeito fotodinâmico e possui uma série de aplicações em diferentes áreas.

O efeito fotodinâmico pode ser utilizado para remoção de contaminantes ambientais^{1,2,3,4}, para a inativação de agentes patogênicos no sangue e hemoderivados^{5,6,7,8,9}, para a descontaminação de alimentos^{10,11} e para o tratamento de infecções localizadas, infecções fúngicas, acne e câncer^{12,13,14,15}.

A técnica que utiliza o efeito fotodinâmico para o tratamento de câncer recebe o nome de terapia fotodinâmica (do termo em inglês: *Photodynamic Therapy* - PDT). Atualmente existem protocolos clínicos para o tratamento de doenças malignas de pele (melanoma e não-melanoma), câncer de pulmão, bexiga, cérebro, mama, pescoço, oral e para cânceres do trato aerodigestivo em países como Canadá, Alemanha, EUA, França, Japão, Brasil, entre outros. A terapia consiste na administração de um FS, que se incorpora seletivamente nas células cancerígenas, e sua subsequente ativação por uma fonte de luz cujo comprimento de onda é definido de acordo com o espectro de absorção do FS, resultando em danos fotodinâmicos geralmente irreversíveis e, conseqüentemente, na morte das células cancerígenas^{13,14,15}.

Desde sua primeira aplicação clínica em 1966¹⁶, um grande número de estudos vem sendo realizado e atualmente a PDT se destaca entre as novas formas para tratamento de câncer. Os inúmeros resultados obtidos após quatro décadas de investigações demonstram que a PDT produz uma resposta positiva na remissão completa dos tumores na maioria dos casos tratados e

que a frequência de reincidência dos tumores não é maior do que aquela encontrada nos casos tratados com as terapias convencionais¹⁷.

Embora nos últimos anos as técnicas tradicionais empregadas para o tratamento de câncer (cirurgia, quimioterapia e radioterapia) tenham sofrido um desenvolvimento substancial, permitindo o aumento do tempo de vida dos pacientes com câncer, a remoção cirúrgica do tumor pode resultar em mutilações e alterações fisiológicas severas como por exemplo danos ao trato aerodigestivo e ao sistema excretor. Além disso, pacientes tratados com quimioterapia e radioterapia apresentam efeitos colaterais como alopecia (queda de cabelos), alterações gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia) e adinamia (prostração física), tornando o tratamento muito penoso para os doentes.

No caso do tratamento por PDT, tais efeitos colaterais estão descartados, uma vez que o dano fotodinâmico está centrado nas células cancerígenas e as células normais não são atingidas pelo tratamento. Desta forma, a PDT estaca-se como uma modalidade terapêutica que apresenta a vantagem de não possuir os efeitos colaterais graves associados às modalidades tradicionais de tratamento para o câncer.

O efeito fotodinâmico também pode ser usado para o tratamento de doenças não neoplásicas, como a degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose, acne, AIDS, arteriosclerose e artrite^{18,19}.

No Brasil a técnica de PDT para tratamento de tumores foi implantada em 1999 pelo CEPID em Ótica e Fotônica (Projeto FAPESP n°98/ 14270-8), sob a coordenação do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato do Instituto de Física de São Carlos - IFSC/ USP em parceria com a equipe do Dr. Guilherme Cestari Filho, médico do Hospital Amaral Carvalho em Jaú - SP, hospital referência no tratamento do câncer. Este projeto também envolveu pesquisadores do Instituto de Química de São Carlos e da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

1.2 O mecanismo da terapia fotodinâmica

O efeito fotodinâmico é frequentemente explicado por meio de dois mecanismos designados como Tipo I e Tipo II. Os processos envolvidos em ambos mecanismos estão resumidos na figura 1 pelo diagrama de Jablonski^{20, 21, 22}.

Figura 1: Representação do diagrama de Jablonski

Após absorver um fóton, a molécula do (FS) passa do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_1). Neste estado excitado o FS pode retornar ao estado fundamental emitindo um fóton de energia através de processos radiativos (fluorescência) e não-radiativos (relaxações vibracionais) ou pode ainda inverter seu spin espontaneamente através do processo de cruzamento entre sistemas e passar do estado S_1 para o estado excitado tripleto (T_1).

Uma vez formado, o T_1 pode sofrer decaimento para o estado fundamental através de processos radiativos (fosforescência) e não-radiativos (relaxações vibracionais).

O mecanismo tipo I, envolve a participação do FS em reações de transferência de elétrons entre a molécula do FS no seu estado excitado S_1 ou T_1 e o substrato, resultando na formação de íons radicais que tendem a reagir instantaneamente com o oxigênio molecular, produzindo uma mistura de intermediários de oxigênio altamente reativos como o radical

superóxido ($\bullet O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet OH$), capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas. Estes processos estão esquematizados na figura 2.

Figura 2: Reações envolvidas no mecanismo do tipo I .

O mecanismo do tipo II caracteriza-se por apresentar reações de transferência de energia entre o FS no estado T_1 e o oxigênio molecular, cujo estado fundamental também é tripleto (T_0). Estas reações levam à formação de oxigênio singlete (1O_2), uma espécie capaz de oxidar prontamente os constituintes e organelas celulares resultando na morte das células cancerígenas.

Os dois mecanismos podem ocorrer simultaneamente sendo que a proporção entre eles é altamente influenciada pelo FS, pelo substrato, pela concentração de oxigênio e pela ligação do FS com o substrato²³. No entanto, o mecanismo do tipo II aparenta ser mais eficiente (constantes de velocidade por volta de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) quando comparado às constantes de velocidade das reações de transferência de cargas (mecanismo tipo I), usualmente abaixo de $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^{24,25,26}. Consequentemente, a energia transferida para outros compostos que possam competir com o oxigênio deve ser de menor importância e dessa forma o mecanismo do tipo II , é comumente dominante ²⁷.

Figura 3: Processos envolvidos no mecanismo do tipo II.

O oxigênio singlete produzido é uma espécie altamente reativa, de caráter eletrofílico, capaz de induzir a oxidação dos constituintes e organelas celulares, sendo as proteínas e lipídios insaturados seus principais alvos, resultando assim em danos irreversíveis às organelas celulares e na morte das células cancerígenas^{28,29,30}. Por se tratar de uma espécie com curto tempo de vida

nos sistemas biológicos ($<0,04\mu\text{s}$) e um raio de ação bastante pequeno ($0,02\mu\text{m}$)³¹, o dano decorrente do tratamento fotodinâmico fica restrito às células cancerígenas, o que representa um grande diferencial frente às outras terapias tradicionais de tratamento do câncer.

1.3 A janela terapêutica para o procedimento de irradiação

O comprimento de onda da radiação luminosa incidente, utilizada no procedimento de irradiação, deve levar em conta a capacidade de penetração da luz no tecido e também os máximos de absorção do fármaco. A aplicação clínica da PDT exige a utilização de luz com comprimentos de onda característicos da região espectral do vermelho e infra-vermelho próximo (600-850nm). Isto se deve ao fato de ser nesta região que o tecido biológico apresenta-se mais transparente a radiação luminosa. Este intervalo é conhecido por “janela terapêutica”³¹.

Água e macromoléculas como proteínas e pigmentos, tais como a melanina e a bilirrubina podem absorver a radiação luminosa de modo a interferir na ativação do FS pela luz, uma vez que também competem pelos fótons incidentes. Entre estas moléculas, a hemoglobina é a principal responsável pela absorção, com máximos de absorção em 425, 544 e 577nm, o que limita o intervalo terapêutico a um valor mínimo de 600nm. Por outro lado, o emprego de luz com comprimento de onda acima de 850nm é descartado uma vez que nesses comprimentos de onda os fótons não possuem energia suficiente para participar ativar o FS, além disso, em comprimentos de onda maiores que 1200nm, a intensa absorção da radiação pelas moléculas da água também tornaria inviável esse procedimento³².

Atualmente, uma grande variedade de fontes coerentes e não-coerentes de iluminação pode ser utilizada no procedimento de irradiação durante as sessões de PDT, as mais comuns são os lasers: lasers pulsados de argônio, vapor de metal e Nd:YAG. No entanto, existem também outros tipos de fontes como o filamento de tungstênio, arco de xenônio, lâmpadas fluorescentes, além dos dispositivos LED (do termo em inglês: *Light Emitting Diode*). Lasers também são bastante

empregados devido ao seu caráter monocromático, versatilidade de ajuste de potência e de seleção de comprimento de onda da radiação incidente. Além disso, podem ser facilmente acoplados em feixes e fibras ópticas, o que torna essa associação um eficiente dispositivo para iluminar áreas de difícil acesso como as cavidades do reto, esôfago, bexiga e cavidades do abdômen³³. Entretanto, o elevado preço de aquisição, manutenção e treinamento de pessoal para a aplicação de PDT com lasers, estimulou o desenvolvimento de fontes baseadas em dispositivos LED. Estes dispositivos podem ser construídos com comprimentos de onda específicos, são de baixo custo, de resposta confiável, portáteis e de fácil manuseio³⁴.

2. Fotossensibilizadores

A classe de FS mais estudados são os compostos derivados da Hematoporfirina (HpD), uma porfirina presente no sangue, mais especificamente no sítio ativo da hemoglobina. A estrutura das porfirinas é constituída por um grupo cromóforo tetrapirrólico cíclico, chamado de anel porfirínico, que constitui um sistema eletrônico altamente conjugado e confere a estas moléculas transições eletrônicas na faixa do visível e ultravioleta[34].

Figura 4: O anel porfirínico.

A Figura 4 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 . O macrociclo porfirínico possui dois átomos de nitrogênio capazes de aceitar prótons e dois grupos NH capazes de perder prótons³⁵.

As porfirinas e seus derivados constituem uma classe de moléculas que desempenha papéis vitais no funcionamento de muitos sistemas bioquímicos como a fotossíntese, a transferência de elétrons na cadeia respiratória e transporte e armazenamento de oxigênio³⁶.

O sistema ferro-porfirina, funciona como um grupo prostético da hemoglobina, nos citocromos, bem como em enzimas como a catalase e a peroxidase. A molécula da hemoglobina é composta de quatro cadeias polipeptídicas ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\alpha 2$, $\beta 2$), unidas de forma não covalente, sendo que cada cadeia possui um grupo heme contendo um átomo de ferro³⁷.

Os derivados de Hematoporfirina (HpD) constituem o primeiro grupo de substâncias produzidas para aplicação em PDT e são conhecidas como fotossensibilizadores de primeira geração. Estes fotossensibilizadores são produzidos de acordo com a tecnologia original de desfibrilação do sangue de animais e de humanos, a partir de hematoporfirina IX (HpIX) existente na circulação sanguínea^{38, 39}.

Figura 5: Estrutura básica do grupo heme da hemoglobina e a estrutura molecular da Hematoporfirina IX.

A partir da década de 70 várias formulações de HpD foram testadas e levaram ao desenvolvimento dos fármacos Photofrin® (de origem americana) e seus análogos Photogem® (de origem russa) e Photosan® (de origem alemã), três fármacos empregados no presente estudo.

Embora não existam dúvidas a respeito do sucesso da terapia com o emprego dos HpD, estas preparações de fármacos apresentam algumas desvantagens como por exemplo, o fato de se acumularem também nas células epiteliais, de modo que após seu uso, o paciente deve manter-se afastado da luz solar por um período que pode variar de 4 a 6 semanas dependendo da dose administrada. Outra desvantagem é a baixa absorção da luz no comprimento de onda na região de interesse para a terapia (600-850nm) ⁴⁰.

Além disso, esses fármacos HpD não possuem uma constituição química definida, uma vez que são constituídos de uma complexa mistura de monômeros, dímeros e oligômeros[37,38]. Embora Photofrin®, Photogem® e Photosan® sejam comercializados como tendo de comportamento similar, foi recentemente demonstrado que tais fármacos possuem diferentes características no que diz respeito a sua foto-estabilidade e que estas características estão relacionadas com a citotoxicidade e eficiência destes fármacos ^{41,42}.

O Photogem® é o único fármaco aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a aplicação clínica da PDT no Brasil (aprovação em: 08/ 04/ 2003; Processo nº 25351.189638/02-00; Exp 132851/ 02-4). Hoje a experiência brasileira em PDT conta com aproximadamente 400 pacientes tratados, o processo ainda não é custeado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e ocorre sempre vinculado a centros de estudo e pesquisa no Brasil ⁴³.

A segunda geração de compostos fotossensibilizadores são substâncias com composição química definida e que podem ser ativadas pela luz na faixa de 650-800nm, região mais favorável, uma vez que a pele absorve menos a radiação luminosa e, portanto transmite mais luz, possibilitando o tratamento de lesões mais profundas. As clorinas são porfirinas reduzidas que apresentam forte banda de absorção na região de 640-700nm (vermelho). A clorina e-6 é uma forma derivada da clorofila-a que um alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete ^{34,41} e uma intensa absorção na região espectral de 610 à 630nm ^{35,41}.

O Photodithazine® (PZ) é um FS de segunda geração preparado na Rússia e foi também empregado no presente estudo. Trata-se de uma clorina-e-6 cuja estrutura química é modificada

através da adição de N-metil-D-glicosamina 0,5% como um agente solubilizante e estabilizante, tornando-a hidrossolúvel. As propriedades fototóxicas do PZ têm sido estudadas e a alta eficácia fotodinâmica parece estar relacionada com sua capacidade de penetrar nas células através das membranas biológicas. Estudos *in vitro* mostraram que este composto não apresenta toxicidade no escuro, exceto em concentrações muito elevadas⁴⁴. Além da vantagem em relação aos fotossensibilizadores de primeira geração de absorver em comprimentos de onda maiores, o PDZ é eliminado rapidamente do organismo, sendo que 94% da eliminação ocorre em 24 h e 98% em 48h⁴⁵.

O estudo da cinética de fotodegradação do Photodithazine® e a avaliação da citotoxicidade dos seus fotoprodutos demonstrou que as células tumorais são mais afetadas pela PDT com PZ do que as células não-tumorais e que os fotoprodutos do FS formados após a irradiação são ainda mais tóxicos para as células tumorais do que o próprio PZ⁴⁶.

Na Rússia, a aplicação de PZ em PDT se encontra na fase de testes clínicos e diversos casos de cânceres vêm sendo tratados: tumores malignos de pele, cavidade oral, laringe, brônquios, esôfago, estômago e vulva. Pacientes submetidos à PDT com PZ não apresentaram complicações locais ou sistêmicas e não houve reações de fotossensibilização cutânea devido a sua rápida eliminação⁴⁷.

A constante busca por novos fármacos capazes de atuar como fotossensibilizadores em PDT, levaram à síntese e ao estudo de novas moléculas derivadas de bacterioclorinas, clorinas, purpurinas, ftalocianinas, derivados de benzoporfirinas bem como a porfirina endógena protoporfirina-IX. Alguns destes compostos que estão sendo investigados e seus comprimentos de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), estão apresentados com o Photofrin® na figura 6.

Figura 6: Photofrin® e alguns novos compostos estudados para uso em PDT.

No geral, quando comparados aos fármacos derivados de hematoporfirinas, estes novos compostos possuem uma maior seletividade com relação ao tecido tumoral, associada a uma menor fototoxicidade cutânea. Além disso, a farmacocinética é rápida com um tempo de meia vida no plasma variando de algumas horas a poucos dias. Eles também apresentam propriedades

fotoquímicas favoráveis à aplicação em PDT, apresentando máximos de absorção em comprimentos de onda maiores⁴⁸.

2.1 Características de um fotossensibilizador ideal

É desejável que a molécula do FS seja cinética e termodinamicamente estável e que esta molécula possua síntese rápida, conveniente e de alto rendimento. O composto deve ser seletivo para diferentes tipos de tumores, apresentar farmacocinética favorável e não apresentar toxicidade a não ser quando excitado pela luz, quando este composto deve induzir a morte eficiente apenas das células malignas^{32,33}.

Além disso, o FS deve possuir alta pureza química a fim de simplificar a interpretação da relação dose-resposta nos estudos de dosimetria e possuir um coeficiente de absorção molar no vermelho ou no infravermelho próximo, devido a maior penetração da luz nestes comprimentos de onda nos tecidos, o que possibilita o tratamento de lesões mais profundas^{32,33}.

Os parâmetros fotofísicos desejáveis são: alto rendimento quântico de oxigênio singlete e alto tempo de vida do estado triplete, pois neste caso a produção de oxigênio singlete é mais efetiva^{32,33}.

2.2 Transporte e localização dos fotossensibilizadores

O transporte do FS até o tecido tumoral é feito através de proteínas presentes no plasma sanguíneo. Um adulto possui em média de 5 a 6 litros de sangue. Quase metade desse volume é ocupado por hemácias, glóbulos brancos e plaquetas, o restante é chamado de plasma e é constituído por 90% de água e 10% de solutos. Dissolvidos no plasma existe uma grande variedade de proteínas, lipoproteínas, nutrientes, metabólitos, produtos de excreção, íons e hormônios. Cerca de 70% dos solutos presentes no plasma são proteínas⁴⁹.

A soroalbumina é a principal proteína do plasma sanguíneo, constituindo cerca de 60% das proteínas do plasma^{50,51}. Nos mamíferos a albumina é sintetizada no fígado, possui uma vida média de 19 dias e é responsável por 80% da pressão osmótica do sangue. Por ser altamente solúvel e de estrutura flexível, inúmeros compostos se ligam reversivelmente a albumina que age como principal proteína transportadora do sistema vascular, transportando inúmeros metabólitos, tais como a bilirrubina, tetrapirroles, ácido graxos, aminoácidos, pequenos cátions, etc. e também transportando moléculas exógenas⁵².

As lipoproteínas do plasma são complexos constituídos por um tipo especial de proteína, chamada apolipoproteína, associada com várias combinações de fosfolípidios, colesterol e triacilglicerídios. As diferentes combinações entre lípidios e proteínas produzem partículas de diferentes densidades e cada uma dessas classes de lipoproteínas possui uma função de transporte específica. Existem pelo menos nove tipos diferentes de apolipoproteínas no plasma humano, estas distinguem-se em seu tamanho e reações específicas, podendo atuar como sinalizadores, carregar substâncias lipossolúveis para os diversos tecidos e até ativar enzimas que atuarão sobre os lípidios que estão sendo transportados⁴⁹.

A razão para a acumulação preferencial do FS no tecido doente em comparação com o tecido normal ainda não é um processo totalmente compreendido. Inicialmente, acreditava-se que o fato das células cancerígenas possuírem um elevado número de receptores para LDL fosse a chave para explicar o fenômeno da acumulação seletiva dos FS nos tumores.

Essa hipótese foi testada por Kongshaug e colaboradores⁵³ em um estudo que teve como objetivo correlacionar a lipofilicidade de alguns FS, a capacidade de ligação com LDL e a capacidade retenção dos fármacos nos tumores. A conclusão foi que um aumento na lipofilicidade (caráter apolar) do FS, em geral, aumenta a interação com LDL, no entanto, algumas exceções foram observadas neste estudo. Os dados da tabela I mostram que a protoporfirina-IX (PPIX) e a hematoporfirina (HP) ligam-se preferencialmente às proteínas de alta densidade (HDL), no entanto HP é significativamente mais polar que PPIX.

Tabela 1: Distribuição de algumas porfirinas entre proteínas do plasma humano.

	Tempo de retenção (min) *	Distribuição (%)		
		LDL	HDL	Proteínas pesadas
HP	~3	10	55	35
PF	3.6–20	16	70	14
PPIX	18	22	41	37
TPPS ₄	0.05	1–2	18	80

LDL = lipoproteína de baixa densidade; HDL = lipoproteína de alta densidade.

* o tempo de retenção é uma medida da hidrofobicidade do composto.

(Kongshaug et al.)⁴¹

O Photofrin® (PF) tem uma afinidade por LDL intermediária entre HP e PP, no entanto tem melhor retenção no tecido doente do que os outros dois ⁵⁴. HP e PPIX possuem uma maior afinidade por LDL do que a meso-tetrakis (p-sulfonatofenil) porfirina (TPPS₄), uma porfirina aniônica que possui alta afinidade por HDL, proteínas mais pesadas, e que no entanto é a porfirina mais eficientemente retida nos tumores^{55,56}. Kessel e colaboradores^{57,58}, demonstraram que um composto relativamente hidrofílico como a N-aspartil-clorina-e-6 (NPE6) liga-se preferencialmente a albuminas e HDL, ligando-se apenas de 1-2% em LDL e ainda assim apresenta excelentes resultados na extirpação de tumores em camundongos⁵⁹. Estes estudos sugerem que mecanismos que não envolvem somente a participação direta de LDL na entrega do FS no tecido doente também poderiam estar envolvidos e que certamente as outras proteínas do plasma, como a HDL e as soroalbuminas também poderiam desempenhar importante papel na distribuição dos FS nos tecidos e também estariam relacionadas com o fenômeno da retenção seletiva dos fotossensibilizadores nos tumores.

Desde então inúmeros outros trabalhos foram realizados e atualmente acredita-se que o transporte de fotossensibilizadores de caráter hidrofílico seja realizado por albuminas e globulinas do plasma, enquanto que o transporte de fotossensibilizadores lipofílicos parece ser principalmente realizado por lipoproteínas de baixa densidade (LDL) sendo a etapa de internalização do fotossensibilizadores nas células realizada por endocitose ^{60,61,62,63}.

As características fisiológicas diferenciadas do tumor também podem estar envolvidas nesse fenômeno de acumulação seletiva. O tumor é um micro-ambiente distinto que apresenta algumas diferenças em relação ao tecido sadio: as células crescem desordenadamente, resultando em arranjos celulares de maior volume intersticial; o tumor apresenta uma drenagem linfática deficitária; pH inferior ao do tecido sadio e uma concentração de receptores de LDL maior do que no tecido normal. Alguns trabalhos demonstraram que o fato do tecido tumoral e suas vizinhanças apresentarem um pH menor do que o tecido sadio^{64,65,66,67}, também poderia influenciar a captação do fármaco pelos tecidos doentes, favorecendo o acúmulo do FS nas células cancerígenas: os FS hidrofílicos tornam-se mais hidrofóbicos (lipofílicos) através de sua protonação e dessa forma, a entrada nas células seria facilitada^{68,69,70}.

Pode-se perceber que a questão da retenção seletiva dos FS pelo tumor e também sua localização sempre foi alvo de grande número de pesquisas. Até o momento, os resultados apontam que os fotossensibilizadores de caráter catiônico localizam-se no núcleo e na mitocôndria, os FS lipofílicos ligam-se às estruturas membranosas enquanto que os fármacos de caráter hidrofílico são frequentemente encontrados em lisossomos⁷¹.

Fatores como a capacidade de ligação do FS a outras proteínas do soro (por exemplo: VLDL, HDL, VHDL); propriedades de agregação, polaridade e a distribuição de cargas da molécula de FS são todos fatores de igual importância para explicar a retenção celular seletiva dos fármacos nas células cancerígenas. Estas propriedades atuando em conjunto resultam em maior acúmulo do FS no tecido doente, de maneira que o dano decorrente do tratamento fotodinâmico fica restrito às células cancerígenas, sendo esta ação seletiva um diferencial da PDT frente às terapias tradicionais de tratamento do câncer.

3. Estudos comparativos de fotossensibilizadores

Para a realização de estudos comparativos entre compostos com potencial aplicação em PDT, várias metodologias são descritas na literatura.

A fotoxidação de aminoácidos é um dos métodos utilizados com esta finalidade. Nesse método, acompanha-se a supressão da fluorescência do triptofano devido a sua fotoxidação na presença do FS e uma medida da eficiência fotodinâmica do composto é obtida através da determinação da constante de velocidade da reação^{72,73,74,75}.

A fotoxidação de proteínas leva à degradação de suas cadeias laterais devido à presença de aminoácidos suscetíveis às fotoxidações como cisteína, histidina, metionina, triptofano e tirosina. Os resíduos de triptofano, tirosina e fenilalanina, sendo aminoácidos aromáticos, são os responsáveis pela fluorescência das proteínas na região do ultravioleta. Em geral, no caso onde há maior fotoxidação de aminoácidos aromáticos, a proteína mostra uma diminuição da sua intensidade de fluorescência⁷⁶. SILVESTER et al. determinou que a fotoxidação da BSA por hematoporfirina e tetrametilpiridinoporfirina ocorria em dois diferentes sítios específicos da proteína: os resíduos Trp-134 e/ou Trp-214 e também no resíduo Cis-34⁷³.

A albumina é a proteína mais abundante do sangue dos vertebrados e apresenta funções importantes como o transporte de vários metabólitos no sistema circulatório. A estrutura primária da albumina de soro bovino é constituída por cerca de 580 amino ácidos. A tabela 2 apresenta algumas características espectroscópicas dos aminoácidos aromáticos presentes na BSA⁷⁶.

Tabela 2: Características espectroscópicas dos aminoácidos aromáticos presentes na BSA⁷⁷.

Aminoácido	Nº de resíduos	$\lambda_{\text{EXC}}(\text{nm})$	$\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{EM}}(\text{nm})$
Fenilalanina	27	258	193	282
Tirosina	19	275	1405	304
Triptofano	2	279 290	5580 3935	348

A absorção de proteínas, como por exemplo, a albumina soro bovina, é devida aos resíduos de triptofano e tirosina, ocorrendo em 280nm. Em comprimentos de onda maiores que 290nm, a absorção é devida principalmente ao triptofano. A fenilalanina apresenta um coeficiente de extinção muito baixo e praticamente não é excitada⁷⁶.

A fluorescência das proteínas, como ocorre por exemplo na albumina de soro bovino, é dominada pela emissão do triptofano, pois o coeficiente de extinção molar do indol desse resíduo é aproximadamente cinco vezes maior do que o fenil da tirosina. Embora a tirosina seja altamente fluorescente em solução, sua emissão é muito menor em proteínas devido ao efeito de supressão por grupos vizinhos, uma vez que este resíduo é um fluoróforo natural bastante sensível à polaridade de sua vizinhança⁷⁶.

Além do método da fotoxidação de proteínas, outros métodos ser utilizados em estudos comparativos da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores. FISHER et al. propuseram um método para avaliar a eficiência de FS através da fotoxidação de ácido úrico⁷⁸. No organismo humano, o ácido úrico é encontrado na forma do monoânion urato, sendo o produto final do metabolismo da purina e apresenta papel de antioxidante graças à ação dos uratos de reagir com radicais livres formados em nossas vias metabólicas neutralizando seu efeito danoso⁷⁷.

O ácido úrico é um excelente captador de oxigênio singlete ^{79,80} e pode ser utilizado como um dosímetro químico para avaliar a eficiência fotodinâmica de substâncias como as porfirinas e seus análogos ^{81,82}. Neste método, o coeficiente de atividade fotodinâmica é calculado levando se em conta o decréscimo na absorbância da banda centrada em 293nm do espectro de absorção ótica do ácido úrico na presença de um FS ativado pela luz.

No entanto, essas metodologias citadas podem ser incapazes de reproduzir de forma satisfatória o grande número de possíveis interações que podem ocorrer em meio biológico. Consequentemente, estudos comparativos de FS envolvendo ensaios citotóxicos em culturas celulares tornam-se bastante importantes, pois conseguem fornecer informações que ajudam a

melhor predizer o real comportamento do FS *in vivo*⁸³. O grande inconveniente, no entanto, é que a cultura de células é um procedimento bastante trabalhoso, demorado e de custo elevado. O emprego de eritrócitos como modelo de membrana surge como uma alternativa para a investigação das propriedades fotodinâmicas de potenciais FS^{84,85,86,87}. Nestes estudos, a avaliação da eficiência fotodinâmica dos FS é obtida através da determinação do tempo necessário para causar a hemólise de uma suspensão de eritrócitos. Neste caso a hemólise é causada pela fotoxidação das biomoléculas constituintes da membrana plasmática (proteínas e fosfolípidios insaturados), resultando na formação de poros e provocando a ruptura da membrana. Consequentemente, ocorre a liberação da oxihemoglobina presente no interior dos eritrócitos, cuja detecção pode ser realizada espectrofotometricamente, permitindo a monitoração da hemólise das células vermelhas do sangue em função do tempo de irradiação na presença de um fotossensibilizador.

A investigação do mecanismo preponderante na fotoxidação de biomoléculas tem sido o objeto de alguns estudos^{87,88} que empregam água deuterada (D_2O) e também supressores de oxigênio singlete, como por exemplo a azida de sódio (NaN_3) ale supressores de radicais como a superóxido dismutase e o manitol.

Na hemólise realizada na presença de D_2O , ocorre um aumento do tempo de vida do 1O_2 de 10 a 26 vezes, comparado à água não deuterada (2-3s)⁸⁸. Dessa forma, a presença de D_2O no meio reacional deve aumentar a hemólise, caso o mecanismo preponderante seja do tipo II.

A azida de sódio é um eficiente supressor de oxigênio singlete⁸⁶. Portanto, ao se adicionar NaN_3 à suspensão de eritrócitos na presença de um fotossensibilizador e luz, espera-se que a hemólise diminua, caso o mecanismo preponderante seja do tipo II.

Estudos anteriores^{89,90} demonstraram que o mecanismo de fotoxidação do tipo I é favorecido em solventes polares, uma vez que os radicais gerados em função das reações de transferência de elétrons seriam estabilizados em solventes de alta constante dielétrica. Em contraste, a solubilidade e o tempo de vida do oxigênio singlete são maiores em solventes

lipofílicos, de maneira que o mecanismo do tipo II é mais favorecido em ambientes hidrofóbicos. Entretanto, tem sido demonstrado que, mesmo em meios polares, o mecanismo de fotoxidação de biomoléculas envolvendo o oxigênio singlete é mais eficiente quando comparado aos processos dependentes das espécies radicalares em função da alta difusibilidade do oxigênio singlete e em função das reações de transferência de energia serem, em geral, mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons^{91,92}. Deve-se ressaltar que os mecanismos de fotoxidação das biomoléculas podem ser alterados em sistemas biológicos, devido a complexidade das interações que podem ocorrer nesse meio. Como exemplo, pode-se relatar os resultados obtidos com a octaetilporfirina de cobre (II), os quais demonstram que o fotossensibilizador ligado ou localizado próximo aos substratos macromoleculares (membranas, proteínas ou ácidos nucleicos) favorece o mecanismo tipo I⁸⁸.

Experimentos envolvendo a determinação do coeficiente de partição também são bastante empregados para se avaliar a hidrofobicidade (ou lipofilicidade) de compostos fotossensibilizadores, uma vez que os processos de absorção e distribuição de fármacos são regulados basicamente pela sua hidrofobicidade⁹³. O coeficiente de partição é definido como sendo a razão entre as concentrações que se estabelecem nas condições de equilíbrio de uma substância química, quando dissolvida em sistema constituído por uma fase orgânica e uma fase aquosa, e está associado à mudança de energia livre provocada pela substância sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema⁹¹.

O sistema 1-octanol/ tampão fosfato pH 7,4 é considerado o sistema preferencial para a determinação do coeficiente de partição. As principais vantagens do uso do 1-octanol como fase orgânica na determinação do coeficiente de partição são as seguintes: possui ampla capacidade de dissolução frente a diferentes compostos químicos; seu grupo hidroxila pode agir como doador ou como receptor de elétrons na formação de ligações de hidrogênio; embora imiscível em água, o 1-octanol tem capacidade para dissolver até 2,3 M de água sob condições de equilíbrio; as

ligações de hidrogênio de moléculas solvatadas não necessitam ser quebradas durante sua transferência da fase orgânica para a fase aquosa; não é volátil em temperatura ambiente; é adequado para medição direta na região do UV, uma vez que sua absorção ocorre em comprimento de onda muito abaixo da faixa em que absorve a maioria dos fármacos, é quimicamente estável e está disponível comercialmente ⁹¹.

Objetivos

II. OBJETIVOS

Este trabalho tem o objetivo de investigar a eficiência fotodinâmica dos fármacos Photofrin®, Photogem® , Photosan® e Photodithazine® através de experimentos que envolvem a fotoxidação de BSA, o uso de ácido úrico como dosímetro químico e de eritrócitos utilizados como modelo celular para se investigar a interação destes fármacos com as membranas. Além disso o mecanismo preponderante de fotoxidação da membrana plasmática também foi estudado.

Photofrin®, Photogem® e Photosan® são fármacos de primeira geração, derivados de hematoporfirina, que constituem o principal grupo de medicamentos com aplicação em PDT. Embora os derivados de hematoporfirina sejam comercializados como sendo fármacos de comportamento similar, foi recentemente demonstrado que tais medicamentos possuem diferentes características no que diz respeito a sua foto-estabilidade e que estas características podem resultar também em diferenças na ação destes fármacos. Photodithazine® é um fármaco de 2ª geração, derivado de clorina-e-6, que encontra-se em fase de testes clínicos e apresenta resultados promissores como fotossensibilizador.

Este trabalho faz parte do sub-projeto Laser em Medicina do CEPID em Ótica e Fotônica, criado com o apoio da FAPESP em 2000 (projeto n°98/ 14270-8) e que envolve o Instituto de Física de São Carlos, o Instituto de Química de São Carlos, a Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto e o Hospital Amaral Carvalho de Jaú, referência no tratamento do câncer.

Materiais e Métodos

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Equipamentos

Os fármacos Photogem®, Photosan® e Photodithazine® foram fornecidos pelo CEPID em Ótica e Fotônica. A albumina de soro bovino e o ácido úrico foram adquiridos da Aldrich®. As soluções foram preparadas em água deionizada e todos os estoques foram preparados imediatamente antes dos ensaios, ao abrigo da luz.

As medidas de absorção ótica foram efetuadas no espectrofotômetro UV-1601PC Shimadzu, utilizando-se cubeta de quartzo (quatro faces polidas) com 1,0 ou 0,5cm de caminho ótico. Os espectros foram monitorados na faixa de 200-700nm.

As medidas de fluorescência foram efetuadas no espectrofluorímetro HITACHI F-4500, utilizando-se cubeta de quartzo (quatro faces polidas) com 0,5cm de caminho ótico. Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos para o experimento de fotoxidação de BSA, excitando-se a molécula em 279nm e a emissão monitorada na faixa de 300-400nm. Outros parâmetros de configuração do aparelho foram: a) Ganho da fotomultiplicadora: 950W, b) Fenda de excitação e emissão: 5.0, c) Velocidade de varredura: 240nm/min.

O sistema de irradiação utilizado foi um diodo emissor de luz (LED) emitindo em 630nm, refrigerado à água, desenvolvido pelo Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos/IFSC-USP.

3.2 Experimento de Fotoxidação de Ácido Úrico

Neste experimento o ácido úrico foi utilizado como dosímetro químico para se calcular o coeficiente de atividade fotodinâmica (AF) dos diferentes FS segundo o procedimento padrão descrito por FISCHER et al ⁷⁵.

Foi obtido o espectro de absorção de uma mistura de ácido úrico (30µg mL⁻¹) e FS (15µg mL⁻¹). Em seguida, esta solução foi submetida à irradiação de 13mW cm⁻² durante 300s sob suave agitação. Após a irradiação, foi obtido novamente o espectro de absorção e desta forma, foi determinada a diferença na intensidade da absorção do ácido úrico (ΔA_{AU}) em 293nm antes e depois da irradiação.

O decréscimo na intensidade da banda em 293nm decorrente da reação de fotoxidação da molécula de ácido úrico pelo oxigênio singlete foi utilizado para calcular o coeficiente de atividade fotodinâmica, segundo a equação:

$$AF = \Delta A_{AU} \times 10^5 / E_o \times t \times A_{FS}(\lambda_{IRR}) \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

AF = coeficiente de atividade fotodinâmica (m² W⁻¹ s = m² J⁻¹);

ΔA_{AU} = diferença na intensidade da absorção do ácido úrico em 293nm, antes e depois da irradiação;

E_o = intensidade de luz (mWcm⁻²);

t = tempo de irradiação (s);

$A_{FS}(\lambda_{IRR})$ = absorbância do FS na mistura de ácido úrico + FS no comprimento de onda da irradiação.

Estas análises foram executadas em triplicata e a partir das leituras, foram obtidos os coeficientes de atividade fotodinâmica para cada um dos FS.

3.3 Experimento de Fotoxidação de BSA

Este experimento teve o objetivo de investigar a eficiência de cada FS em causar a fotoxidação de proteínas utilizando a molécula de BSA como modelo de proteína. A eficiência fotodinâmica foi estimada com base na determinação dos valores das constantes de velocidade de fotoxidação da molécula de BSA.

Uma solução contendo $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de FS e $130\mu\text{g mL}^{-1}$ ($2\mu\text{M}$) de BSA preparada em tampão fosfato (pH=7,4) foi irradiada durante 40 minutos com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I=25\text{ mWcm}^{-2}$). Nesse intervalo, a cada 5 minutos foi retirada uma alíquota e a fotoxidação da BSA foi acompanhada através da variação da intensidade do máximo de fluorescência em 340nm, sendo utilizado o comprimento de onda 279nm para excitar a molécula, uma cubeta de quartzo com 0,5cm de caminho óptico e fenda de excitação e emissão de 5,0nm. Estas análises foram executadas em duplicata e a partir das leituras, as constantes de velocidade de fotoxidação para cada um dos fotossensibilizadores foram obtidas.

3.3.1 Cálculo das Constantes de Velocidade

Em geral a fotoxidação de biomoléculas ocorre via oxigênio singlete, ou seja, pelo mecanismo tipo II que pode ser representado pelas seguintes reações ⁹⁴:

onde: ${}^0\text{P}$ = Fotossensibilizador no estado singlete fundamental

${}^1\text{P}$ = Fotossensibilizador no estado singlete excitado

${}^3\text{P}$ = Fotossensibilizador no estado triplete excitado

${}^1\text{O}_2$ = Oxigênio Singlete

${}^3\text{O}_2$ = Oxigênio Triplete (Estado Fundamental)

S = Substrato

considerando a última etapa (Equação 5) a etapa mais lenta e portanto determinante da velocidade da reação, então:

$$d[S] / dt = - k_2 [^1O_2] [S] \quad (\text{Equação 6})$$

Como a $[^1O_2]$ é muito maior que a concentração do $[^3O_2]$, podemos considerar que a concentração de $[^1O_2]$ é aproximadamente constante. Portanto, pela equação anterior:

$$d[S] / dt \sim - k[S] \quad (\text{Equação 7})$$

cujas forma integrada é :

$$\ln ([S] / [S_0]) = - kt \quad (\text{Equação 8})$$

onde: $[S]$ = a concentração do substrato (BSA) num dado momento

$[S_0]$ = a concentração inicial ($t = 0$) do substrato.

t = o tempo

k = a constante de velocidade da reação de fotoxidação

Como a concentração do substrato (S) é proporcional à intensidade de fluorescência (IF), podemos reescrever a Equação 8 como:

$$\ln (IF / IF_0) = - kt \quad (\text{Equação 9})$$

A Equação 9 indica que a cinética global é de pseudo-primeira ordem, pois o gráfico de $\ln ([S] / [S_0])$ contra t é uma reta cujo coeficiente angular é $- k$ e corresponde à constante de velocidade de fotoxidação.

3.4 Experimento de Hemólise

Este experimento teve o objetivo de determinar o tempo necessário para que cada um dos FS causar a hemólise de 50% das hemácias (t_{50}) após a irradiação e com base nesse valor estimar a ação fotooxidativa dos diferentes fotossensibilizadores.

O sangue utilizado nos ensaios de hemólise foi doado pelo próprio experimentador, coletado imediatamente antes dos ensaios num frasco Vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante. Os eritrócitos foram isolados dos demais componentes do sangue através de lavagens sucessivas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e centrifugação (3000rpm, 20min, 4°C).

Foram preparadas as seguintes soluções:

Solução 1 - Amostra: suspensão de hemácias 2,0% (m/m) em PBS e $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de FS.

Solução 2 - 100% hemólise: suspensão de hemácias 2,0% (m/m) em água deionizada.

Solução 3 - controle: suspensão de hemácias 2,0% (m/m) em PBS.

Solução 4 - controle de irradiação: suspensão de hemácias 2,0% (m/ m) em PBS e $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de FS.

As amostras foram irradiadas por 10 minutos com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I=25\text{ mWcm}^{-2}$) sob lenta agitação e durante este intervalo, alíquotas de 1mL foram retiradas, centrifugadas (2000rpm, 1min) e o sobrenadante analisado por espectroscopia de absorção no visível, afim de se obter as bandas características de absorção da oxihemoglobina em 540nm e 577nm, liberada em função do rompimento da membrana das células vermelhas do sangue devido a ação dos FS. Neste experimento, a hemólise dos eritrócitos foi acompanhada espectroscopicamente por meio do aumento da banda de absorção da oxihemoglobina em 577nm, cujos valores foram determinados indiretamente segundo a equação:

$$A_{\text{OXIHEMOGLOBINA}} = A_{\text{AMOSTRA}} - A_{\text{BRANCO}} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde: $A_{\text{OXIHEMOGLOBINA}}$ = absorvância da oxihemoglobina em 577nm.

A_{AMOSTRA} = absorvância da amostra em 577nm após a irradiação no tempo t..

A_{BRANCO} = absorvância da amostra no tempo zero.

A suspensão de hemácias 2% preparada em água deionizada (solução 2) forneceu o valor da absorvância de uma solução 100% hemolisada, uma vez que em meio hipotônico a membrana plasmática das hemácias se rompe prontamente. Este valor foi utilizado para se calcular os valores de % Hemólise segundo a equação 11:

$$\% \text{ Hemólise} = A_{\text{AMOSTRA}} \times 100 / A_{\text{SOLUÇÃO 2}} \quad (\text{Equação 11})$$

A_{AMOSTRA} = valor da absorvância de cada amostra, descontado o valor da absorvância no tempo zero.

$A_{\text{SOLUÇÃO 2}}$ = absorvância da solução 100% hemolisada (Solução 2).

O emprego da solução 3 foi realizado para quantificar a possível hemólise parcial causada devido a manipulação das células no preparo das soluções e ao sistema agitação mecânica. A solução 4 foi utilizada para verificar a existência de hemólise parcial decorrente da ação do FS na ausência da luz. Estas análises foram executadas em triplicata e os valores de %Hemólise foram usados para se construir um gráfico de %Hemólise em função do tempo de irradiação, conhecido por curva de hemólise, que possui alta correlação com o ajuste sigmoidal e é característico para cada FS. Através das curvas de hemólise, os valores de t_{50} e $H_{\text{MÁX}}$ (% máxima de hemólise) foram determinados para cada um dos FS.

3.4.1 Investigação do mecanismo envolvido na hemólise de eritrócitos

O procedimento utilizado para a realização dos experimentos de determinação do mecanismo de fotoxidação preponderante durante a hemólise dos eritrócitos seguiu o mesmo

procedimento geral para os experimentos de hemólise já mencionados, diferenciando-se apenas quanto a presença dos supressores azida de sódio e manitol.

Deste modo, suspensões de eritrócitos (hematócrito=2%) foram preparadas com cada um dos FS ($10\mu\text{g mL}^{-1}$), na presença e ausência dos supressores azida de sódio (2mM) e manitol (2mM), incubadas por 1h ao abrigo da luz e sob refrigeração (4°C), sendo logo em seguida irradiadas com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I=25\text{mWcm}^{-2}$, $t=15\text{min}$). A hemólise dos eritrócitos foi acompanhada espectroscopicamente por meio do aumento da banda de absorção da oxihemoglobina em 577nm. Os valores de porcentagem de hemólise foram calculados de acordo com as equações 11 e 12. Curvas de hemólise características foram construídas e os parâmetros t_{50} e $H_{\text{MÁX}}$ foram utilizados para se investigar o mecanismo preponderante na fotoxidação dos eritrócitos.

3.5 Determinação dos coeficientes de partição dos fotossensibilizadores

Preparou-se soluções de 5,00 mL contendo $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de FS, em tampão fosfato ($\text{pH}=7,4$). Transferiu-se 2,00 mL de cada solução para um tubo Falcon® de 15mL e adicionou-se igual volume de 1-Octanol. Procedeu-se a homogeneização em agitador mecânico por 2 minutos. A separação das fases pôde ser observada após centrifugação (2000rpm, 15min). Os espectros de absorção ótica (200-800nm) da fase aquosa foram obtidos antes e após a extração e por meio da distribuição dos fotossensibilizadores nas fases aquosa e orgânica, foram estimados os valores dos coeficientes partição para cada fármaco.

Esta relação de distribuição dos fármacos entre as fases pode ser expressa pela equação :

$$P = [\text{fase orgânica}] / [\text{fase aquosa}] \quad (\text{Equação 12})$$

em que P (ou também $\log P$) é o coeficiente de partição do composto analisado; [fase orgânica] a concentração do composto na fase orgânica nas condições de equilíbrio, calculada através da

diferença da absorbância dos fotossensibilizadores na fase aquosa antes e após a mistura dos solventes; [fase aquosa] a concentração da substância na fase aquosa nas condições de equilíbrio.

Os valores de coeficiente de partição foram utilizados para se avaliar a lipofilicidade (ou hidrofobicidade) dos fotossensibilizadores, fornecendo informações sobre as interações dos fármacos com a membrana celular.

3.6 Descarte das amostras

As amostras utilizadas nos experimentos de hemólise foram descartadas após tratamento com solução hipoclorito de sódio 3% durante 30 minutos e esterilizadas em autoclave a 120°C por 20 minutos. As amostras utilizadas nos experimentos de determinação dos coeficientes de partição dos fotossensibilizadores foram encaminhadas ao Laboratório de Resíduos Químicos do Campus da USP - São Carlos.

3.7 Cálculo da média amostral e do desvio padrão

Nas análises que fizeram uso da média amostral e do desvio padrão os cálculos foram realizados segundo as equações e [95]:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{Equação 13})$$

$$s = \sqrt{\left[\frac{1}{n-1} \right] \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Equação 14})$$

Onde: x_i = i-ésima observação

$\bar{x}$ = média amostral

n = número total de observações

s = estimativa do desvio padrão

Resultados e Discussão

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos espectroscópicos dos fotossensibilizadores

Os fármacos Photofrin®, Photogem® e Photosan® são compostos derivados de hematoporfirina, apresentando em seus espectros bandas características das porfirinas não metaladas, conforme mostra a figura 7.

Figura 7: Espectros de absorção óptica dos fármacos HpD: Protofrin®, Photogem® e Photosan®, concentração $20\mu\text{g mL}^{-1}$, preparados em PBS, pH=7,4.

As porfirinas apresentam uma forte deslocalização de elétrons π , a qual é responsável pelo caráter aromático do núcleo porfirínico, e consequentemente, no aumento das intensidades das bandas de absorção da região do visível e ultravioleta, resultando em uma banda mais intensa designada como Banda de Soret, seguida de quatro bandas nomeadas de bandas Q. Os espectros de absorção das porfirinas não metaladas diferenciam-se das metaladas por apresentarem 4 bandas Q ao invés de 2 bandas. As porfirinas não metaladas apresentam distorções na sua estrutura principal, ou seja, no conjunto dos anéis pirrólicos, ocasionando uma diferença de 25 a $29\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ entre os níveis de energia, e consequentemente, o aumento do número de bandas Q. A primeira banda Q (de maior energia) é identificada como banda IV, a segunda como III, a terceira

como II e a última (de menor energia) como I ⁹⁶.

O fármaco Photodithazine® (PZ) é um composto derivado de clorina e-6. As clorinas são porfirinas reduzidas e apresentam mudanças espectrais em relação as porfirinas, como deslocamento das bandas para o vermelho e aumento da intensidade de absorção ⁹⁷. O Photodithazine apresenta bandas características de clorina, ou seja, banda de Soret com máximo de absorção em 401nm e três bandas Q, com máximos em 505, 600 e 655nm conforme mostra a figura 8.

Figura 8: Espectro de absorção óptica da clorina Photodithazine®, concentração 20µg.mL⁻¹, preparada em PBS, pH=7,4.

Observa-se que o PZ apresenta máximo de absorção das bandas Q em comprimento de onda maior (655nm) do que o Photogem® (623nm), os valores de coeficiente de extinção molar(ϵ) para a última banda Q são: $\epsilon_{PZ} = 3,82 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{HPD} = 1,5 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ^{98,99}. Este fato representa um diferencial importante, uma vez o comprimento de onda do procedimento de irradiação é definido de acordo com o comprimento de onda da banda do FS encontrado dentro da região da janela terapêutica (600-850nm) e também devido fato da luz penetrar mais profundamente na pele em comprimentos de onda maiores¹⁰⁰.

4.2 Experimentos de fotoxidação de BSA

Neste trabalho a fotoxidação da BSA foi utilizada para avaliar a eficiência fotodinâmica de alguns derivados porfirínicos. A figura 9 reúne os espectros de emissão obtidos durante a reação de fotoxidação da BSA na presença de cada um dos FS estudados.

Figura 9: Supressão de fluorescência nos espectros de emissão do BSA ($\lambda_{\text{exc}}=279\text{nm}$) devido ao efeito fotodinâmico. Solução de BSA (2mM), preparada em PBS (pH=7,4), irradiada com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I=25\text{mWcm}^2$, $t=40\text{min}$) na presença de FS ($1\mu\text{g mL}^{-1}$).

Os valores das intensidades dos máximos de fluorescência do BSA foram utilizados para determinar o valor de $\ln(F/F_0)$ em relação a um determinado tempo de irradiação, conforme citado no item 4.2.2. Os resultados são mostrados na figura 10.

Figura 10: Cinéticas de fotoxidação do BSA.

Verifica-se que todas as considerações citadas no item 4.2 necessárias para a determinação da constante de velocidade da reação de fotoxidação do BSA (pseudo primeira ordem) são válidas devido a relação linear entre $\ln(F/F_0)$ e o tempo de irradiação, obtendo-se valores elevados de coeficientes de correlação linear ($r^2 > 0,99718$).

Os coeficientes angulares dos gráficos da figura 10 foram obtidos e corrigidos em função da absorbância de cada FS, uma vez que os diferentes FS apresentam diferentes absorbâncias no comprimento de onda de irradiação. Desde modo, esses coeficientes puderam ser utilizados como parâmetros de comparação da eficiência fotodinâmica dos FS na fotoxidação de BSA (Figura 11 e Tabela 3).

A

B

Figura 11: **A)** Comparação dos coeficientes angulares (k) obtidos diretamente da relação linear entre $\ln(F/F_0)$ e o tempo de irradiação. **B)** Comparação dos valores das constantes de velocidade de fotoxidação do BSA (k_c) obtidas após a correção dos valores de k pelos valores das absorvâncias dos FS no comprimento de onda de irradiação ($A_{FS \lambda=630nm}$).

Tabela 3: Valores das constantes de velocidade da reação de fotoxidação de BSA(2mM) na presença de FS ($1\mu g.mL^{-1}$), em solvente (pH=7,4), obtidas através da irradiação das amostras com LED ($\lambda=630nm$, $I=25m.Wcm^2$, $t=40min$).

Fotossensibilizador	$k (x 10^{-3} min^{-1})$	$k_c (min^{-1})$
PZ	$9,45 \pm 0,3$	$14,8 \pm 0,3$
PG	$9,63 \pm 0,4$	$9,8 \pm 0,4$
PF	$8,97 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,2$
PS	$4,25 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,5$

Os valores de k e k_c representam a média de pelo menos 3 experimentos realizados em triplicata.

Os valores de k_c , mostram que o PZ foi o fármaco mais eficiente na fotoxidação de BSA, seguido pelos fármacos derivados de hematoporfirina. O valor de sua constante de fotoxidação é praticamente duas vezes maior do que o melhor desempenho encontrado para os fármacos HpD.

A maior eficiência do PZ em fotoxidar BSA comparado ao Photofrin® pode estar relacionada ao tempo de vida do FS no estado triplete excitado. Se o tempo de vida do PZ no estado triplete excitado for maior em relação aos fármacos HpD, maior será a probabilidade de interação entre as moléculas de PZ e o oxigênio molecular do que entre o oxigênio e os fármacos

HpD. Neste caso o PZ apresentaria um rendimento quântico de geração de oxigênio singlete maior do que os HpD, o que resulta em uma maior eficiência fotodinâmica.

É importante ressaltar as concentrações dos FS utilizadas nos experimentos de fotoxidação de BSA foram expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$, uma vez que os fármacos HpD são constituídos por uma complexa mistura de oligômeros e não possuem constituição química definida. Embora este valor de concentração tenha sido igual para todos os experimentos ($1\mu\text{g mL}^{-1}$), não significa que as soluções dos FS sejam equimolares. Se a solução de PZ ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) contiver um maior número de moléculas do FS em relação a solução dos HpD, maior será a eficiência do PZ em gerar o oxigênio singlete, consequentemente, maior será a eficiência da clorina em fotoxidar a BSA e maior será sua constante de fotoxidação.

O mesmo ocorre entre os fármacos HpD: diferentes constituições de monômeros, dímeros e oligômeros resultam em diferentes eficiências fotodinâmicas e diferentes constantes de fotoxidação. Entre os fármacos HpD, o PG apresentou melhor eficiência na fotoxidação de BSA, sendo o valor de k_C aproximadamente 2,4 vezes maior que a k_C do PF e 4,5 vezes maior que a k_C do PS.

A fotoxidação de proteínas deve-se principalmente a fotoxidação de suas cadeias laterais devido à presença de aminoácidos suscetíveis às fotoxidações como cisteína, histidina, metionina, triptofano e tirosina. No entanto, trata-se de um processo bastante complexo, onde vários fatores podem interferir na cinética de reação, tais como as alterações conformacionais que acontecem na proteína devido à ligação do FS ou a destruição de outros aminoácidos susceptíveis a fotoxidação. Essas alterações de conformação tanto podem impedir a exposição de aminoácidos, protegendo-os da fotoxidação, quanto podem estar expondo ao ataque, resíduos outrora protegidos⁷⁶.

A metodologia empregada neste trabalho, baseada na supressão da fluorescência da BSA devido a fotoxidação da proteína, foi possível graças às propriedades óticas particulares dos resíduos de triptofano e tirosina. Em geral, a fluorescência das proteínas como, por exemplo, na

albumina, é dominada pela emissão do triptofano, pois o coeficiente de extinção molar do indol desse resíduo é aproximadamente cinco vezes maior que o fenil da tirosina. Embora a tirosina seja altamente fluorescente em solução, sua emissão é muito menor em proteínas devido ao efeito de supressão por grupos vizinhos, uma vez que este resíduo é um fluorofóro natural bastante sensível a polaridade de sua vizinhança⁷⁶.

Um estudo feito por Silvester et al⁷³ forneceu indícios do que poderia estar ocorrendo durante o processo de fotoxidação da BSA. O oxigênio singlete é capaz de reagir com o triptofano, conforme figura 12.

Figura 12: Reação de cicloadição entre o $^1\text{O}_2$ e o triptofano [76].

Silvester et al verificaram que a fotoxidação de BSA por hematoporfirina (Hp) ocorre em dois diferentes sítios específicos da proteína: nos resíduos Trp-135 e/ ou Trp-214 e no resíduo Cis-34 (cisteína). A fotoxidação da Cis-34 gera moléculas radiculares. Acredita-se que, a formação desses radicais ocorra através da “transferência de dano” através da proteína, iniciando-se no sítio de ligação do FS e propagando-se através de transferência de elétrons até o resíduo Cis-34. Foi observada também a formação de radicais em carbonos terciários no triptofano que coincide com a diminuição da fluorescência da BSA. A formação desses radicais a partir do triptofano poderia estar ocorrendo via transferência de elétrons. Verificou-se então que a fotoxidação da BSA foi devida tanto ao mecanismo de transferência de energia (tipo II) como também ao mecanismo de transferência de elétrons (tipo I)

Nos seres vivos, lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas, sendo alvos subcelulares destruídos na PDT. Portanto, estas reações

ocasionam alterações da permeabilidade celular, ruptura e vazamento de conteúdo celular, resultando na morte das células.

4.3 Experimentos de fotoxidação do ácido úrico

O ácido úrico (AU) é um eficiente captador de oxigênio singlete usado como dosímetro químico para a determinação quantitativa da ação fotodinâmica de FS ⁷⁷.

As figuras 13 e 14 apresentam respectivamente, o espectro de absorção ótica do ácido úrico e sua fotoxidação pelo fármaco Photogem®. Observa-se que o ácido úrico não possui absorbância no comprimento de onda da irradiação (630nm), o que garante que a interação com a luz é restrita aos FS nos experimentos de determinação do coeficiente de atividade fotodinâmica.

Figura 13: Espectro de absorção ótica da solução de ácido úrico ($30\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em tampão fosfato, pH 7.4.

Figura 14: Variação espectral da mistura Photogem® ($15\mu\text{g mL}^{-1}$) e AU ($30\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada em tampão fostato (pH 7.4), irradiada com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I=25\text{mW cm}^{-2}$, $t=40\text{min}$). As setas indicam o decréscimo nas bandas do ácido úrico e do Photogem.

A figura 15 mostra a variação da absorbância das bandas do ácido úrico ($\Delta_{\text{AU}} 293\text{nm}$ e $\Delta_{\text{AU}} 235\text{nm}$) e do Photogem ($\Delta_{\text{PG}} 369\text{nm}$) em função do tempo de irradiação. Observa-se que a banda em 293nm foi a banda do ácido úrico mais facilmente afetada pelo efeito fotodinâmico durante a reação de fotoxidação.

Figura 15: Variação da absorbância das bandas do ácido úrico ($\Delta_{AU} 293nm$ e $\Delta_{AU} 235nm$) e do Photogem($\Delta_{PG} 369nm$) em função do tempo de irradiação.

A reação de foto-oxidação do ácido úrico via oxigênio singlete é conhecida e pode levar à formação de produtos como a triuréia, a alantoxaidina, o íon oxanato e CO_2 (Figura 16) ¹⁰¹. O valor da constante de supressão de oxigênio singlete pelo ácido úrico é estimada em $k = 3,6 \times 10^8 \text{ mol L}^{-1}$ para condições semelhantes ao plasma humano. Dahl et al. propuseram um mecanismo de supressão do oxigênio singlete pelo ácido úrico envolvendo a captação da energia do estado triplete da molécula do FS no estado excitado pela molécula do ácido úrico ¹⁰².

Figura 16: Foto-oxidação do ácido úrico via oxigênio singlete.

Estudos anteriores mostraram que o ácido úrico é um antioxidante seletivo, não reagindo com peróxido de hidrogênio ou ânion superóxido, sendo possíveis as reações com oxigênio singlete e radicais hidroxila. Fischer et al. propôs um procedimento padrão para a determinação de um coeficiente que permitisse a comparação da atividade fotodinâmica em diferentes

fotossensibilizadores. O procedimento padrão estipulou um tempo de irradiação de 300s, de modo a aproximar uma correlação linear entre a variação da absorbância do ácido úrico e a concentração do FS ⁷⁷.

Observa-se que não apenas a molécula de AU sofreu dano decorrente do efeito fotodinâmico, mas também a molécula do próprio FS. Este fenômeno é conhecido como fotodegradação (sendo o termo em inglês: *photobleaching*) e tem sido objeto de vários estudos por se tratar de uma característica diretamente relacionada com a dose terapêutica do FS, e também relaciona-se com a cinética de eliminação dos fotossensibilizadores no organismo¹⁰³.

Desde modo, com a finalidade de comparar o efeito fotodinâmico de diferentes fármacos, amostras contendo os fotossensibilizadores ($15\mu\text{g mL}^{-1}$), foram irradiadas na presença de AU ($30\mu\text{g mL}^{-1}$) com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I= 13\text{mW cm}^{-2}$, $t=300\text{s}$) e tiveram seus espectros de absorção obtidos. Estes resultados estão apresentados na figura 17.

Figura 17: Espectros de absorção ótica antes e depois de irradiar com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I=13\text{mW cm}^{-2}$, $t=300\text{s}$) de uma mistura contendo AU($30\mu\text{g mL}^{-1}$) e FS($15\mu\text{g mL}^{-1}$). Os espectros de absorção ótica evidenciam a diminuição da banda em 293nm devido a fotoxidação do ácido úrico. A linha azul (—) indica o espectro obtido após o tempo de irradiação, a linha vermelha (—) indica o espectro obtido antes da irradiação.

Observa-se o decaimento da banda característica do ácido úrico em 293nm, indicando que ocorre a reação de decomposição desta molécula pelo oxigênio singlete formado pelos fotossensibilizadores excitados. A clorina Photodithazine® foi mais eficiente em causar a fotoxidação do AU; entre os fármacos HpD, o Photogem® mostrou-se mais eficiente. Verifica-se que a reação de fotodegradação dos FS ocorre mesmo na presença do AU, um forte captador de oxigênio singlete.

O decréscimo na banda Soret dos FS estão coerentes com os valores de decaimento da banda característica do AU. Baseando-se nesses valores, determina-se uma escala de atividade

fotodinâmica (PA), que pode ser útil para a comparação da eficácia de diferentes fotossensibilizadores, de acordo com a Equação 1, mencionada no item 3.2. Os valores de PA para os diferentes FS puderam ser calculados e estão reunidos na tabela 4.

Tabela 4: Determinação do coeficiente de atividade fotodinâmica.

Fotossensibilizador	Atividade Fotodinâmica ($\text{m}^2 \text{J}^{-1}$)
PZ	64 ± 14
PG	37 ± 9
PF	9 ± 2
PS	4 ± 1

Os valores representam a média de pelo 10 experimentos realizados em triplicata.

Os resultados dos experimentos de fotoxidação de ácido úrico estão de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de fotoxidação de BSA. Os resultados de ambas metodologias apontam que o Photodithazine® é o fármaco mais eficiente; entre os HpD o Photogem® é o fármaco mais eficiente; por outro lado o Photosan® obteve o pior desempenho em ambas as metodologias. Os resultados dos experimentos de fotoxidação de BSA e de fotoxidação de ácido úrico convergem para a seguinte ordem de eficiência fotodinâmica: Photodithazine® >> Photogem® > Photofrin® > Photosan®.

4.4 Experimentos de Hemólise

Os resultados dos experimentos de fotoxidação de biomoléculas estimularam a realização de experimentos com estruturas mais complexas, em experimentos que se aproximassem das condições do meio biológico. Para isso foram utilizados eritrócitos como modelo de célula com a finalidade de avaliar capacidade dos FS em interagir e fotoxidar as membranas celulares. A

facilidade e o baixo custo dos ensaios são dois fatores importantes que justificam a utilização de eritrócitos em testes biológicos^{104,105}.

A irradiação de eritrócitos com luz visível, na presença dos fotossensibilizadores provocou a liberação de hemoglobina no meio de reação. Este evento pôde ser monitorado através do aumento de intensidade no espectro de absorbância da hemoglobina em função do tempo de irradiação. O espectro de absorção ótica da hemoglobina está apresentado na figura 18.

Figura 18: Espectro de absorção ótica da oxihemoglobina.

O espectro apresenta as bandas características da oxihemoglobina. No sangue de um adulto normal a hemoglobina (Hb) pode existir em quatro diferentes formas: oxihemoglobina, desoxihemoglobina, carboxihemoglobina e metahemoglobina sendo as duas últimas responsáveis por menos de 2% da hemoglobina total, exceto em situações patológicas¹⁰⁶.

As principais formas heme-estruturais das moléculas de hemoglobinas caracterizadas por oxiemoglobina, deoxiemoglobina e metaemoglobina, são físico-quimicamente identificadas por seus espectros de absorção. O espectro da deoxiemoglobina tem absorção máxima no comprimento de onda 555nm, a oxiemoglobina tem absorções específicas em 540nm e 577nm, a metaemoglobina tem dois comprimentos de ondas com maior intensidade de absorção em 500nm e 630nm¹⁰⁷.

A oxidação da oxi-hemoglobina em meta-hemoglobina, durante a reação de fotoxidação de eritrócitos, pode interferir nos resultados das porcentagens de hemólise oriundos da ação dos fotossensibilizadores. Isso ocorre em razão da diminuição da absorbância da oxihemoglobina, cuja intensidade é utilizada como parâmetro da eficiência fotodinâmica dos FS em promover a hemólise das células vermelhas do sangue ⁷⁵.

Neste trabalho não foi observada a conversão de oxihemoglobina em metahemoglobina durante o experimento de hemólise. Zavodnik et al ¹⁰⁸ também não detectaram a oxidação da oxihemoglobina em metahemoglobina durante a fotoxidação de eritrócitos na presença de ftalocianina de zinco.

A hemoglobina oxigenada, ou oxihemoglobina, se caracteriza pelo estado reduzido ou ferroso (Fe^{++}) do ferro inserido no grupo heme enquanto que a metaemoglobina se caracteriza pelo estado oxidado ou férrico (Fe^{+++}). A incubação de uma solução de oxihemoglobina por um período de tempo prolongado gradualmente transforma-a em metahemoglobina ¹⁰⁹.

A formação de metahemoglobina por agentes químicos pode ocorrer de três formas: a) diretamente, por componentes que possuem um potencial redox grande, como ferrocianeto, cobre, peróxido de hidrogênio, hidroxilamina, cloratos, quinonas; b) oxidação por produtos intermediários do metabolismo de drogas e c) oxidação indireta, quando a substância, na presença de oxigênio induz à formação de O_2^- e HO que em seguida oxidarão a hemoglobina ^{110,111}.

Não foi observada hemólise devida ao efeito fotodinâmico na ausência de iluminação e na ausência de FS, os valores de porcentagem de hemólise para estes casos são inferiores a 1%. Esta hemólise residual é decorrente do sistema de agitação mecânica utilizado durante o procedimento de irradiação e demais manipulações das suspensões de células.

A figura 20 mostra o conjunto de espectros de absorção ótica que evidenciam a liberação da hemoglobina para o meio extracelular devido ao efeito fotodinâmico.

Figura 19: Fotoxidação de suspensão de eritrócitos, hematócrito 2%, na presença de Photogem $10\mu\text{g mL}^{-1}$, irradiada com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I= 25\text{mW cm}^{-2}$, $t=10\text{min}$).

A literatura tem demonstrado que a hemólise ocorre devido à fotoxidação das proteínas intrínsecas à membrana, as quais estão ligadas aos fosfolipídios, resultando na formação de poros e no aumento da mobilidade dos fosfolipídios, provocando a ruptura da membrana, e consequentemente, a liberação da oxihemoglobina presente no interior dos eritrócitos. Alguns estudos demonstram que também a oxidação dos fosfolipídios insaturados constituintes da membrana de eritrócitos pelas espécies reativas produzidas pelo efeito fotodinâmico aumentam a mobilidade dos fosfolipídios, resultando na formação de poros, e consequentemente, na ruptura da membrana dos eritrócitos^{104,105}.

A liberação da oxihemoglobina presente no interior dos eritrócitos, cuja detecção pode ser realizada através de técnicas espectrofotométricas, permite a construção das curvas de hemólise para cada um dos FS. As curvas de hemólise são gráficos da porcentagem de hemólise em função do tempo de irradiação, apresentam elevada correlação com ajuste sigmoidal e fornecem parâmetros importantes para a comparação da eficiência fotodinâmica de FS: o tempo necessário para que ocorra 50% de hemólise (t_{50}) e a porcentagem máxima de hemólise $(\%H_{M\acute{A}X})^{106}$.

A Figura 21 apresenta as curvas de hemólise para os fotossensibilizadores empregados neste estudo e a Tabela 5 reúne os valores de t_{50} e $\%H_{MÁX}$ obtidos.

Figura 20: Curvas de hemólise obtidas para os FS.

Os resultados demonstram que a clorina Photodithazine® foi o fármaco mais eficiente em causar a hemólise dos eritrócitos, este FS foi o mais rápido em causar a hemólise das células vermelhas, aproximadamente 2,6 vezes mais rápido que o melhor desempenho verificado entre os fármacos HpD.

Tabela 5: Valores de $\%H_{MÁX}$ e t_{50} obtidos para os FS estudados.

Fotossensibilizador	$\%H_{máx.}$	$t_{50}(\text{min})$
PZ	95 ± 2	$1,3 \pm 0,2$
PF	92 ± 3	$3,4 \pm 0,1$
PG	81 ± 5	$3,8 \pm 0,2$
PS	89 ± 2	$5,3 \pm 0,1$

Os valores de $H_{MÁX}$ e t_{50} representam a média e o desvio padrão ($m \pm sd$) de experimentos realizados em triplicata ($n=5$).

Entre os fármacos HpD, o Photofrin® foi 10% mais rápido que o Photogem® e aproximadamente 1,5 vezes mais rápido que o Photosan®. Quando se comparam os valores de $\%H_{máx.}$, verifica-se que o Photodithazine® é o fármaco mais eficiente em causar a hemólise; entre os HpD, os fármacos Photofrin® e Photosan® apresentaram desempenho bastante semelhante, seguidos pelo fármaco Photogem®.

4.4.1 Determinação do mecanismo envolvido na hemólise de eritrócitos

Com o objetivo de investigar o mecanismo da hemólise de eritrócitos os experimentos de hemólise foram realizados na presença de D_2O , NaN_3 (2mM) e manitol (2Mm).

A figura 22 mostra a curva de hemólise obtida a partir da fotoxidação de uma suspensão de eritrócitos (hematócrito=2%), contendo Photogem® ($10\mu g mL^{-1}$) e irradiada com LED ($\lambda=630nm$, $I= 25mW cm^{-2}$, $t=10min$) na ausência e em meio contendo 50% de D_2O .

Figura 21: Hemólise com Photogem® na ausência(-) e presença(-) de D_2O .

Observa-se que a hemólise com Photogem® em meio deuterado foi cerca de 25% mais rápida. Os valores de t_{50} foram determinados em 2,4 min para o experimento realizado em meio deuterado e 3,0 minutos para o experimento realizado em PBS. Os valores de $\%H_{m\acute{a}x}$ mantiveram-se em torno de 83% e não foram alterados em meio deuterado.

Embora o aumento da velocidade de fotoxidação das hemácias possa ser um indicativo de que esteja ocorrendo o mecanismo tipo II, via oxigênio singlete, apenas este experimento não pode ser utilizado para comprovar este fato⁷⁵. De Paolis¹¹² observou uma diminuição da velocidade de fotoxidação dos eritrócitos a medida que aumentava a porcentagem de deutério na solução a ser fotoxidada. Além disso, segundo Reuters et al.¹¹³, a energia de ligação das pontes de

deutério é maior quando comparada com a energia das pontes de hidrogênio, podendo resultar na deformação das estruturas terciárias de macromoléculas biológicas, em especial, as proteínas, macromoléculas presentes nas membranas.

Deste modo, tornou-se necessária a realização de experimentos de hemólise de eritrócitos na presença de supressores de oxigênio singlete, como NaN_3 , e de supressores de radicais como manitol para se determinar qual o mecanismo de ação dos FS na fotoxidação das hemácias.

A figura 23, apresenta os resultados para a hemólise de uma suspensão de eritrócitos (hematócrito= 2%) , contendo os FS ($10\mu\text{g}/\text{mL}$), irradiada com LED ($\lambda=630\text{nm}$, $I= 25\text{mW cm}^{-2}$, $t=10\text{min}$), contendo azida (2mM) ou manitol (2mM). As tabelas 6 e 7 apresentam respectivamente os valores de t_{50} e $\%H_{\text{MÁX}}$.

Figura 22: Curvas de hemólise obtidas para os fotossensibilizadores na presença de supressores. A linha verde (-) indica a presença de manitol, linha vermelha(-) a presença de azida e a linha preta (-) indica a hemólise realizada na ausência de supressores.

Tabela 6: Valores de %H_{MÁX} obtidos.

	PZ	PF	PG	PS
Fotoxidação na ausência dos supressores	96±1	93±1	87±1	88±1
Fotoxidação na presença de Manitol (2mM)	92±3	94±1	88±1	86±1
Fotoxidação na presença de Azida (2mM)	79±1	84±1	79±1	78±3

Tabela 7: Valores de t₅₀ obtidos.

	PZ	PF	PG	PS
Fotoxidação na ausência dos supressores	1,3±0,1	3,3±0,1	3,7±0,1	5,3±0,1
Fotoxidação na presença de Manitol (2mM)	1,3±0,1	3,2±0,1	3,6±0,1	5,4±0,2
Fotoxidação na presença de Azida (2mM)	3,0±0,1	3,6±0,1	4,9±0,2	7,6±0,1

A hemólise executada na presença de azida de sódio apresentou diminuição nos valores de %H_{MÁX} e um aumento nos valores de t₅₀. A diminuição nos valores de %H_{MÁX} foi de 20% no caso do Photodithazine® e 10% para os fármacos HpD. O aumento nos valores de t₅₀ exprimem a diminuição na velocidade de reação de fotoxidação das membranas dos eritrócitos quando a reação se processa na presença de azida de sódio. Na presença de azida de sódio, a hemólise com Photodithazine® se processou em um tempo aproximadamente 2,5 vezes maior. No caso dos HpD, o aumento foi de 10% no caso do Photofrin®, 30% para o Photogem® e 40% para o Photosan®.

A presença de manitol nos ensaios de hemólise não apresentou influência nos valores de t₅₀ e %H_{MÁX}, indicando que a hemólise não via mecanismo radicalar, mas aponta para o mecanismo do tipo II, via oxigênio singlete, como sendo o mecanismo predominante na fotoxidação da membrana plasmática dos eritrócitos.

4.5 Determinação dos coeficientes de partição dos fotossensibilizadores

Neste estudo, os coeficientes de partição (P ou logP) dos FS foram determinados para se avaliar a medida do caráter hidrofóbico (lipofílico) desses fármacos. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Valores de coeficiente de partição determinados para os fotossensibilizadores.

Fotossensibilizador	P=[orgânica]/[aquosa]	Log P
PZ	1,62	0,20
PF	1,40	0,15
PG	1,30	0,11
PS	0,61	-0,22

Photodithazine® apresentou os maiores valores de coeficiente de partição, trata-se portanto do FS de maior lipofilicidade, e por consequência, é o fármaco com maior afinidade e de maior mobilidade entre os lipídios constituintes da membrana celular. Entre os fármacos HpD, o Photofrin® apresentou um valor de coeficiente de partição cerca de 10 % maior que o Photogem® aproximadamente 2,3 vezes maior que o Photosan®.

O coeficiente de partição de um FS é a principal característica do fármaco a ser considerada no estudo da sua interação com as membranas celulares, uma vez que a permeabilidade de uma molécula através das membranas celulares pode ser estimada através de seu coeficiente de partição: quanto maior a lipofilicidade da molécula, maior é seu coeficiente de partição e mais rápida será sua difusão através das membranas. Os fármacos ao se difundirem no meio celular, em geral passam através das células atravessando as membranas, e não pelos espaços intercelulares, que são diminutos e permitem apenas o trânsito de água, sais e compostos de baixo peso molecular. A membrana celular é uma estrutura dinâmica, mutável e adaptável à passagem de diferentes substâncias e nosso organismo é uma sucessão de fases lipídicas e aquosas, deste modo um coeficiente de partição muito elevado ou muito baixo, pode constituir um obstáculo à difusão generalizada do fármaco¹¹⁴.

4.6 Algumas considerações finais

Os resultados dos experimentos de fotoxidação de BSA e de determinação dos coeficientes de atividade fotodinâmica convergem para a seguinte ordem de eficiência fotodinâmica: Photodithazine® >> Photogem® > Photofrin® > Photosan®.

Os resultados dos experimentos de hemólise apontam para a seguinte ordem de eficiência fotodinâmica: Photodithazine® >> Photofrin® > Photogem® > Photosan® e estão de acordo com a ordem de lipofilicidade determinada a partir dos experimentos de determinação dos coeficientes de partição.

Estes resultados evidenciam que entre os fotossensibilizadores estudados, o Photodithazine® é o mais eficiente, devido ao fato de ser mais lipofílico e possuir maior capacidade de interagir e fotoxidar os constituintes das membranas celulares. Entre os fármacos HpD, o Photogem® mostrou ser o fármaco HpD mais eficiente nos experimentos realizados em solução homogênea. No entanto, quando em ambiente biológico, o Photofrin® é o fármaco HpD mais eficiente.

Experimentos realizados em solução homogênea, tais como os experimentos de fotoxidação de BSA e o teste do ácido úrico, fornecem importantes informações a respeito da estrutura-atividade dos fármacos, mas negligenciam os efeitos de interação dos FS com o meio biológico. Em ambiente biológico, os FS participam de inúmeras interações adicionais, constituindo sistemas únicos, com diferentes propriedades fotofísicas e fotoquímicas[73]. Além disso, os fármacos HpD estudados, por se tratarem de uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros, de diferentes constituições, podem participar de um número ainda maior de interações, tornando o sistema objeto deste estudo ainda mais complexo.

Estudos comparativos envolvendo a determinação da citotoxicidade destes fotossensibilizadores em culturas de células tumorais e não tumorais ^{42,115}, bem como os resultados dos estudos de separação cromatográfica dos constituintes dos fármacos HpD ¹¹⁶, ambos realizados no Grupo de Fotossensibilizadores do Instituto de Química de São Carlos,

onde este estudo foi realizado, mostram que quanto maior a lipofilicidade da molécula anfifílica do FS, maior o dano obtido através do efeito fotodinâmico, estando de acordo com os resultados apresentados neste trabalho.

Conclusão

V. CONCLUSÃO

Neste trabalho, o emprego de métodos espectroscópicos simples permitiu avaliar a eficiência fotodinâmica de diferentes fotossensibilizadores com aplicação clínica em PDT. BSA e Acido úrico foram utilizados como dosímetros químicos de modo a permitir uma avaliação da eficiência fotodinâmica de quatro fotossensibilizadores. Eritrócitos foram utilizados como modelo de célula para se investigar as interações dos fotossensibilizadores com as membranas celulares e a determinação do coeficiente de partição permitiu uma medida do caráter lipofílico destes fotossensibilizadores.

Photodithazine®, uma clorina do tipo e-6, foi o fotossensibilizador mais eficiente nas diferentes metodologias empregadas. Photosan®, um fármaco HpD, apresentou o pior desempenho entre os fármacos estudados.

Os resultados convergem para a seguinte escala de eficiência fotodinâmica: Photodithazine® >> Photofrin® = Photogem® > Photosan®. As diferenças encontradas entre os fármacos HpD são atribuídas as suas diferentes constituições, uma vez que tratam-se de misturas de monômeros, dímeros e oligômeros, em diferentes proporções.

Os resultados obtidos neste trabalho estimulam a realização de estudos adicionais envolvendo a avaliação da eficiência fotodinâmica das frações constituintes dos fármacos HpD, que podem ser obtidas através de técnicas cromatográficas, com a finalidade de investigar a influência de cada uma dessas frações na ação anticancerígena destes fotossensibilizadores.

Referências Bibliográficas

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. RENGIFO-HERRERA, J. A.; SANABRIA, J.; MACHUCA, F.; DIEROLF, C. F.; PULGARIN, C.; ORELLANA, G. A. Comparison of Solar Photocatalytic Inactivation of Waterborne E. coli Using Tris (2,2'-bipyridine)ruthenium(II), Rose Bengal, and TiO₂. **Journal of Solar Energy Engineering**, v.129, n.1, p.135-140, 2007.

2. NAVNTOFT, C.; ARAUJO, P.; LITTER, M. I.; APELLA, M. C.; FERNÁNDEZ, D.; PUCHULU, M. E.; HIDALGO, M. V.; BLESÁ, M. A. Field Tests of the Solar Water Detoxification SOLWATER Reactor in Los Pereyra, Tucumán, Argentina. **Journal of Solar Energy Engineering**, v.129, n.1, p. 127-134, 2007.

3. ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; CINIGLIA, C.; DE CHAMPDORE, M.; LO GIUDICE, R.; MAROTTA, R.; ZUCCATO, E. Antibiotics in the environment: Occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin. **Environmental Science & Technology**, v.38, N.24, p.6832-6838, 2004.

4. PERUSSI, R. J. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1-xxx, 2007, (no prelo).

5. HERVIG, T. A.; APELSETH, T.; SONDERGAARD, M. Plasma/platelet pathogen inactivation. **ISBT Science Series**, v.1, n.1, p. 227-229, 2006.

6. SMITH, T. G.; Kain, K.C. Inactivation of Plasmodium falciparum by Photodynamic Excitation of Heme-Cycle Intermediates Derived from δ -Aminolevulinic Acid. **The Journal of Infectious Diseases**, v.190, p.184-191, 2004.

- 7.WAINWRIGHT, M.; GIDDENS, R. M. Phenotiazinium photosensitizers: choice in synthesis application. **Dyes Pigments**, v. 57, p.245-257, 2003.
- 8.WAINWRIGHT, M. The emerging chemistry of blood product disinfection. **Chemical Society Reviews**, v.31, p.128-136, 2002.
- 9.BEM-HUR, E.; CHAN, W. S.; YIM, Z.; ZUK, M. M.; DAYAL, V.; ROTH, N.; HELDDMAN, E. ; LAZO, A.; VALERI, C. R. ; HOROWITZ, B. Photochemical descontamination of red blood cells concentrates with the silicon phthalocyanine Pc4 and red light. **Developments in Biological Standardization**, v.192, p.149-155, 2000.
- 10.LUKIENE, Z.; PEIULYTE, D.; JURKONIENE, S.; PURAS, R. Inactivation of Food Contaminants by Photosensitization. **Food Technology and Biotechnology**, v.43, n.4, p.335-341, 2005.
- 11.LUKIENE, Z. Photosensitization: An Overview. **Food Technology and Biotechnology**, v.43, n.4, p.411-418, 2005.
- 12.SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos; **Revista Química Nova**, v.25, n.5, p.801-807, 2002.
- 13.BAGNATO, V. S.; MARCASSA, L. G.; MARCASSA, J. C.; CESTARI, G. F.; FERREIRA, J.; KURACHI, C. **Guia prático de Terapia Fotodinâmica para o tratamento de tumores**. Instituto de Física de São Carlos, 2002. p 1-2 e 65-91.

14. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. Porphyrin-based Photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v.54, p.4151-4202, 1998.

15. MENEZES, P. F. C.; BAGNATO, V. S.; JOHNKE, R. M. ; BONNERUP, C.; SIBATA, C. H.; ALISSON, R. R.; PERUSSI, J. R. Photodynamic therapy for Photogem® and Photofrin® using different light wavelengths in 375 human melanoma cells. **Laser Physic Letters**, v.4, n.7, p.546–551, 2007.

16. LIPSON, R.L. ; GRAY, M.J.; BALDES, E.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Proceedings of the 9th International Cancer Congress**, Tokyo, Japan, p.393, 1966.

17. DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p.3897-3915, 2004.

18. SCHUITMAKER, J. J.; BASS, P.; VAN LEENGOED, H. L. L. M.; VAN DER MEULEN, F. W.; STAR, W. M.; VAN ZANDWIJK, N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology: B**, v.34, p.3 -12, 1996.

19. DOUGHTY, T. J., KATZIR, A. Optical Methods for tumor treatment and detection, mechanism and techniques in PDT. **Proceedings of SPIE**, v.2675, 1996, 405p.

20. BONNET, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v.24, p.19-33, 1995.

21. TANELIAN, C.; MECHIN, R.; SEGHTROUCHNI, R.; SCHWEITZER, C. Mechanistic and Kinetic Aspects of Photosensitization in the Presence of Oxygen **Photochemistry and Photobiology**, v.71, p.12-19, 2000
22. SMITH, G. L. Journal of the chemical society faraday trasaction II, v.74, p.1350-1354,1978.
- 23.HENDERSON, B.W.; DOUGHERTY,T.J. How does photodynamic therapy works? **Photochemistry and Photobiology**, v.55, n.1, p. 145-157, 1992.
24. PARKER, J. P.; STANBRO, W. D. Optical determination of the collisional lifetime of singlet molecular oxygen. **Journal of American Chemical Society**; v. 104; p.2067-2069, 1982
25. FOOTE, C. S. Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. **Free Radical Biology**, v.2, p.85-133, 1976.
26. WASSERMAN, H. H.; MURRAY, R. W. **Singlet Oxygen** Academic Press; 1st Edition; p. 139-167, 1979.
27. HOWE,L.; ZHANG,J.Z. The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution. **Photochemistry and Photobiology**, v.67, n.1, p.90-96, 1998.
28. WEISHAUPT, K. R., GOMER, C. J., DOUGHERTY, T. J. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. **Cancer Research**, v.36, n.7, p.2326-2329, 1976.

29. DOUHERTY, T. J.; KAUFMAN, J. E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K. R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**, v.38, n.8, p.2628-2635, 1978.
30. DOLPHIN, D. Can.J.Chem. 72(1994)
31. MOAN, J.; BERG, K. The photodregadation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochemistry and Photobiology**, v.53, n.4, p.549-553, 1991.
32. SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L., KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.869-880, 2000.
33. COLUSSI, V. C.; NICOLA, E. M. D., NICOLA, J. H. I. Fototerapia, fotoquimioterapia e alguns fotossensibilizadores. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.42, n.4, p.229-236, 1996.
34. MACHADO, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Revista Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.
35. SMITH, K. M. General features of the structure and chemistry of phophyrin compounds. IN: SMITH,K.M **Porphyrins and Metalloporphyrins**. Amstrerdam, Elsevier Scientific Publishing Company, 1975.

36. WHITE, A; HANDLER, P.; SMITH, E. L. **Principles of Biochemistry**. New York, Academic Press, 1968.
37. STRYER, L. **Biochemistry**. 4ed. New York, W. H. Freeman and Company, 1995. 1064p.
38. DOUGHERTY, T. J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. **Photochemistry and Photobiology**, v.46, p. 569-573, 1987.
39. MIRONOV, A. F.; NIZHNIK, A. N.; NOCKEL, A.Y. Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. **Journal of Photochemistry and Photobiology:B**, v.4, n.3, p.297-306, 1990.
40. CARVALHO, V.C.M., Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo - São Carlos, 2001. Tese (Mestrado): p. 91p.
41. FERREIRA, J.; KURACHI, C. ; MORIYAMA, L. T.; MENEZES, P. F. C.; PERUSSI, J. R., SIBATA, C.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO E SILVA JR., O. ; BAGNATO, V. S. Correlation between the photostability and photodynamic efficacy for different photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v 3, p 91-95, 2006.
42. CAVALCANTE, R. S. ; IMASATO, H. ; BERNAL, C. ; BAGNATO, V. S. ; PERUSSI, J. R. Evaluation of the Photodynamic Efficiency of Photosensitizers for Photodynamic Therapy. **Applied Cancer Research Supplement**, São Paulo, v. 25, p. 103-103, 2005.

43. BONINI, D. **Correlação entre bioquímica celular e necrose tecidual em regimes de fracionamento de dose de luz em terapia fotodinâmica.** Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo - São Carlos, 2006. Tese (Mestrado): p. 65p.

44. RESHETNICKOV, A.V.; PONOMAREV, G.V.; ABAKUMOVA O.Y.; TSVETKOVA, T.A.; KARMENYAN, A.V.; REBEKO, A.G.; BAUM, R.P. Novel drug form of chlorin E₆. In: optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy. **Proceedings of. SPIE**, p. 124-130, 2000

45. IVANOV , A. V.; RESHETNICKOV, A. V.; PONOMAREV, G. V. One more PDT application of chlorin E₆. **Proceedings of. SPIE**, p. 131-137, 2000.

46. CORRÊA, J.C. **Fotodegradação do Photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser.** São Carlos, 2006. 114p. Dissertação de mestrado, Instituto de Química de São Carlos, USP.

47. STRANADKO, E. P. H.; PONOMAREV, G. V.; MECHKOV, V. M.; RIABOV, M. V.; IVANOV A. V.; RESHETNIKOV, A. V.; KORABOYEV, U. M. The first experience of Photodithazine clinical application for photodynamic therapy of malignant tumors. In: Optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy. **Proceedings of. SPIE**, p. 124-130, 2000.

48. BAST, R.C. ; KUFEL, D.W. ; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R., HOLLAND, J. F; FREI, E. **Cancer Medicine.** 5ª Edição. B.C. Decker Inc. , Ontário, Canadá, 2000.

49. NELSON, D. L. ; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica.** 3ª edição. Editora Sarvier, São Paulo, SP, Brasil, 2002.

50. CARTER, D.; HO, J. X. **Advances in protein chemistry**. New york, Academic Press, 1994. v.45, p.153-203.
51. HE,X. M.; CARTER, D. Atomic-structure and chemistry of human serum -albumin. **Nature**, v. 358, p.209-215, 1992.
52. PETERS, T. All about albumins: biochemistry , genetics and medical applications. San Diego, Academic Press, 1996.431p.
53. KONGSHAUG, M. ; MOAN, J. ; BROWN, S. B. The distribution of porphyrins with different tumor localising ability among plasma proteins. **British Journal of Cancer**, v.59, p.184-188,1989.
54. MOAN, J. Porphyrin photosensitization and phototherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 43, p.681- 692, 1986.
55. WINKELMAN, J. W. Quantitative studies of tetraphenyl-porphine sulfonate and hematoporphyrin derivative distribuitins in animal tumor systems.In **Methods in Porphyrin Photosensitization**, Kessel, D.(ed) p. 91. Plenum Press: new york.
56. EVENSEN, J. F. Distribution of tetraphenyl sulfonate in mice bearing Lewis lung carcinoma.In: **Photodynamic therapy of tumors and other diseases**, Jori, G. & Perria,C.(eds) p. 215. Libreria Progetto: Padova, 2001

57. KESSEL, D. Determinants of photosensitization by mono-L-aspartyl-chlorin-e-6. **Photochemistry and Photobiology**, v. 49, p. 447-452,1989.

58. KESSEL, D.; WHITCOMB, K. L.; SCHULZ, V. Lipoprotein-mediated distribution of N-aspartyl chlorin e-6 in the mouse . **Photochemistry and photobiology**, v.56, p. 51-56,1992.

59. GOMER, C. J.; FERRARIO, A. Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e 6 in a mouse tumor model . **Cancer research**, v.50, p.3985-3990,1990

60. KESSEL, D.; THOMPSON, K.; SAATIO, K.; NANTWI, K. Tumor Localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine, **Photochemistry and Photobiology**, v.45, p.787-790, 1987.

61. JORI,G. In vivo transport and pharmacokinetic behaviour of tumor photosensitizers. **Photosensitizing Compounds: their chemistry, biology and clinical use**, Ciba Found.Symp. 146 (1989) 78-94.

62. CANDIDE, C. ; MORLIERE, P. ; MAZIERE, J. C. ; GOLDSTEIN, S. ; SANTUS, R. ; DUBERTRET, L. ; ET.AL. In vitro interaction of the photoactive anticancer porphyrin derivative Photofrin II with low density lipoprotein and its delivery in cultured human fibroblasts, *FEBS Lett.* 207(1986) 133-138.

63. CUNDERLIKOVA, B.; KONGSHAUG, M.; GANGESKAR, L.; MOAN, J. Increased binding of chlorin e6 to lipoproteins at low pH values. *IJCB* 32(2000) 759-768.

64. TANNOCK, I. F.; ROTIN, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. **Cancer Research**, v.49, p. 373-4384, 1989.
65. GERWECK, L. E.; SEETHARAMAN, K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. **Cancer Research**, v.56, p.1194-1198, 1996.
66. AIN, R. K. Mass heat transfer in tumors: application in detection and treatment. **Adv. Transport Processes** 3 (1983) 205-339.
67. WIKE-HOOLEY, J. L.; HAVERMAN, J.; REINOLD, H. S. The relevance of tumor pH to the treatment of malignant diseases. **Radiotherapy and Oncology**, v.2, p.343-366, 1984.
68. MOAN, J. ; CHRISTENSEN, T. Cellular uptake and photodynamic effect of hematoporphyrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 2, p. 291-299, 1981.
69. BOHMER, R. M.; MORSTYN, G. Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature and cell size. **Cancer Research**, v.45, p.5328-5334, 1985.
70. MOAN, J.; PENG, Q.; EVENSEN, J. F.; BERG, K.; WESTYERN, A.; RIMINGTON, C. Photosensitizing efficiencies, tumor and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. **Photochemistry and Photobiology**, v.46, p. 713-721, 1987.

71. PATRICE, T. Comprehensive Series In Photochemistry & Photobiology: **Photodynamic Therapy**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge,UK, 283p. 2003.
72. BALL, D. J. et al. The characterization of three substituted zinc phthalocyanines of differing charge for use in PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B.**, v.45, p.28-35,1998.
73. SILVESTER, J. A. et al. Photodynamically generated bovine serum albumin radicals: evidence for damage transfer and oxidation at cysteine and tryptophan residues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 5, p. 754–766, 1998.
74. MUSSI, L.; Eficiência Fotodinâmica das Protoporfirinas IX de Magnésio e Zinco. Campinas, 2003. 73 p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP.
75. SILVA, A. R.; Análise das propriedades fotossensibilizantes do In(III) - mesotetrafenilporfirina para uso em Terapia fotodinâmica. Campinas, 2003. 82p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP
76. STRAIGHT, R. C.; SPIKES, J. D. **Photosensitized Oxidation of Biomolecules**, CRC Press; 4; 92-143, 1984.
77. SZABO, A. The enzyme catalysis process. Plenum Public Corpr., 1989
78. FISCHER, F. A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers, **Clinica Chimica Acta**, v. 274, p.89-104,1998.

79. BECKER, B. F.; Towards the physiological function of uric acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v.14, p.615-631, 1993.
80. KANOFISKY, J. R. Quenching of singlet oxygen by human plasma. **Photochemistry and Photobiology**, v.51, p.299-303, 1990
81. MAESTRIN, A. P. J; RIBEIRO, A. O. ; TEDESCO, A. C. A novel chlorin derivative of meso-tris(pentafluorophenyl)-4-pyridylporphyrin: Synthesis, photophysics and photochemical properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 923-930, 2004.
82. MAESTRIN, A. P. J.; TUDESCO, A. C.; NERI, C. R. Synthesis, spectroscopy and photosensitizing properties of hydroxynitrophenylporphyrins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n.5, p.708-713,2004
83. MENEZES, P. F. C.; BERNAL, C.; BAGNATO, V. S., PERUSSI, J. R. Photodynamic Activity of Different Dyes. **Laser Physics**, v. 17, n. 4, p. 468–471, 2007.
84. DUBBELMAN, T. M. A. R.; GOEIJ, A. F. P. M.; VAN STEVENICK, J. Photodynamic effects of protoporphyrin on human erythrocytes, nature of the cross-linking of membrane proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 511, p.141-151, 1978.
85. MISSIRY, M. A. , ABOU-SEIF, M. Photosensitization induced reactive oxygen species and oxidative damage in human erythrocytes. **Cancer Letters**, n.158, p.155-163, 2000.

86. ZAVODNIK, I. B. The mechanism of Zn-phthalocyanine photosensitized lysis of human erythrocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, n. 67, p.1-10, 2002.
87. ALI, I. A., GATASHEK, K. M.; NASEEM, I. Hemolysis of human red blood cells by riboflavin-Cu(II) system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1523; p. 225-229, 2000.
88. ZAIDINI, S. I. A.; OLEINICK, N. L.; ZAIM, M. T.; MUKHTAR, H. **Photochemistry and Photobiology**; v.58; p.771-776, 1993.
89. MAC DONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. **Journal of Porphyrins Phthalocyanines**; v.5, p.105-129, 2001.
90. OSCHSNER, M. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**; v.39, p. 1-18, 1997.
91. PARKER, J. P.; STANBRO, W. D. **Journal of the American Chemical Society**, v.104, p.2067-2069, 1982.
92. FOOTE, C. S. **Free Radical Biology**, v. 2, p. 85-133, 1976.
93. TAVARES, L. C. QSAR: a abordagem de Hansch. **Revista Química. Nova**, v.27, n.4 , p. 631-639, 2004.
94. BONNET, R. **Chemical Society Reviews**, v. 24, p.19-33, 1995.

95. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento de Otimização de experimentos**, 2ª Ed, Ed. da Unicamp, Campinas; (1995); 32-34.

96. FALK, J. E. **Porphyrins and Metalloporphyrins**; Elsevier, v.2, 1ª Ed.p. 72-93, 1964.

97. DAZIANO, J. P.; STEENKEN, S.; CHABANNON, C. et al. Photophysical and redox properties of a series of phthalocyanines: Relation with their photodynamic activities on TF-1 and Daudi leukemic cells. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n. 4, p. 712-719, 1996.

98. DOUGHERTY, T.J.; GRINDEY, G.B.; FIEL, R.; WEISHAUP, R.; BOYLE, D.G. Photoradiation therapy II. Cure of animal tumours with hematoporphyrin and light. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 55, n. 1, p. 115-121, 1975.

99. RESHETNICKOV, A. V.; PONOMAREV, G.V.; ABAKUMOVA O.Y.; TSVETKOVA, T.A.; KARMENYAN, A.V.; REBEKO, A.G.; BAUM, R.P. Novel drug form of chlorin E6. In: Optical methods for tumor treatment and detection: mechanisms and techniques in photodynamic therapy. **Proceedings of SPIE**, v. 3909, p. 124-130, 2000.

100. NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKLOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOLAB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Acta Biochim Pol**, v.52, p.339-52, 2005.

101. CANELLAKIS, E. S. ; COHEN, P. P. J. **Biological Chemistry**; v.213, p.379, 1955.

102. DAHL, T. A. ; MIDDEN, W. R.; HARTMANN, P.W. Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. **Photochemistry and Photobiology**, v.47, p.357–362, 1988.
103. MENEZES, P. F. C. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. São Carlos, 2006. 157p. Tese de doutorado, Instituto de Química de São Carlos, USP.
104. ZAVODNIK, I. B. The mechanism of Zn-phthalocyanine photosensitized lysis of human erythrocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, n. 67, p.1-10, 2002.
105. GUIDI, G. et al. **Gazzet. Chim. Italiana**, v.126, n.11, p.719-724, 1996
106. SOLE, D. , GOMES, D. C. I. ; VANNA, T. A.; GUELPA, A. MALLOZI, M. C. ; NASPITZ, C. Oximetria de pulso na avaliação da broncoprovocação com metacolina e por exercício em crianças com asma. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**. Disponível em: <http://www.sbai.org.br/Vol212/oxi.htm> (acesso em 11/07/2007)
107. NAOUM, P. C. ; RADISPIEL, J. ; MORAES, M. S. Spectrometric measurement of methemoglobin without interference of chemical or enzymatic reagents. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.26, n.6, p.19-22, 2006.
108. ZAVODNIKA, I.B.; ZAVODNIKA, L.B.; BRYSEWSKAB. M.J. The mechanism of Zn-phthalocyanine photosensitized lysis of human Erythrocytes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , v.67, p.1–10. 2002

109. BUNN, H. F., FORGET, B. G. Hemoglobin Oxidation: Methemoglobin, Methemoglobinemia and Sulfhemoglobinemia. In: **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects**. Philadelphia: Saunders, 1986. P 457-72.
110. SALTMAN, P. **Oxidative Stress: A Radical View**. Semin. Hematol., v. 26, p.249-256, 1989.
111. SILLS, M.R., ZINKHAM, W.H. Methylene blue-induced Heinz body hemolytic anemia. **Arch. Pediatr. Adolesc. Med.**, v.148, p. 306-10, 1994.
112. DE PAOLIS, A. ; CHANDRA, S.; CHARALAMBIDES, A. A.; BONNET, R.; MAGNUS, I. A. **Journal of Biochemistry** ; v. 226; p.757-766, 1985.
113. GUIDI, G.; COSTANZO, L. L.; CONDORELLI, G.; GIUFFRIDA, S.; MIANO, P.; SORTINO, S.; VELARDITA, A. **Gazzet. Chim. Italiana**, v.126, n.11; p.719-724, 1996.
114. KATZUNG,B.G; **Farmacologia Básica e Clínica**. 9 ed. São Paulo: Editora Guanabara S.A, 2003
115. CORRÊA, J.C. **Fotodegradação do Photodithazine e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser**. São Carlos, 2006. 114p. Dissertação de mestrado, Instituto de Química de São Carlos, USP.
116. SANCHEZ, M. A. A. Isolamento, estudo da atividade biológica e caracterização preliminares dos componentes majoritários do Photogem® por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível e espectrometria de massa. , 2006. 153p. Dissertação de mestrado, Instituto de Química de São Carlos, USP.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.