

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**INFLUÊNCIA DO pH NA INTERAÇÃO DO PHOTOFRIN[®],
PHOTOGEM[®] E PHOTOSAN[®] COM DMPC E LIPOPROTEÍNA DE
BAIXA DENSIDADE**

Aline Martins Duboc Natal

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

Orientador: Prof. Dr. Hidetake Imasato

São Carlos

2006

Aos meus pais Vera e Yelson, ao meu irmão Nicolai, a minha cunhada Ana Paula e ao Sérgio, pelo apoio e a paciência e por acreditarem no meu potencial, o meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

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

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

À Profa. Dra. Thaís Borges César do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara, pela co-orientação neste trabalho.

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

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

À Profa. Dra. Leila Maria Beltramini do Grupo de Biofísica “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos .da USP, pela colaboração no meu trabalho.

À Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo do Grupo de Biofísica “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física da USP, pela colaboração no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara, por permitir o uso das instalações do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos.

À Dra. Mariana Carina Frigieri do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara ao apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Célia Bertolini do Departamento de Bioquímica e Tecnologia do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, por permitir o uso de equipamentos de seu laboratório.

Aos amigos do Instituto de Química que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse realizar este trabalho.

RESUMO

O efeito do fotossensibilizador na estrutura biológica não é apenas influenciado por suas propriedades fotofísicas, mas também por sua interação específica com biosistemas. Além disso, a localização do fotossensibilizador no tecido tumoral é um importante fator que resulta em diferentes mecanismos de destruição do tumor.

Muitos fotossensibilizadores, após administração sistêmica, se ligam às proteínas plasmáticas e com isso são distribuídos em diferentes sítios no organismo. Os fotossensibilizadores hidrofílicos são largamente transportados por albuminas e globulinas e se acumulam preferencialmente no estroma vascular dos tumores. Entretanto, fotossensibilizadores mais hidrofóbicos se ligam às lipoproteínas, principalmente LDL, que promove a entrada do FS na célula através de endocitose mediado por receptor. Sendo assim, a localização do FS depende de sua ligação com as diferentes proteínas plasmáticas, sua farmacocinética e também é influenciada pela diferença entre o tecido normal e tumoral. O tecido tumoral tem pH mais baixo e maior expressão de receptores de LDL do que os tecidos normais, aumentando a seletividade dos FSs as células tumorais. A incorporação de FS hidrofóbicos em lipossomas para a administração sistêmica pode realçar ao transporte deste pelas lipoproteínas.

No presente trabalho estudou-se a influência do pH na interação de fotossensibilizadores com lipossomas de DMPC e LDL. Os fotossensibilizadores utilizados nesse estudo foram Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®] que são derivados de hematoporfirinas. A metodologia empregada constitui de variação das concentrações de DMPC e LDL para os seguintes valores de pHs 5,0; 7,4 e 9,0, esse último pH utilizou-se somente para DMPC. O complexo FS – DMPC foi obtido por incubação dos FSs (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com diferentes concentrações de DMPC (0 a 400 μM) por trinta minutos no escuro.

Isolou-se o LDL do plasma humano por ultracentrifugação por gradiente de densidade. Após a separação, o complexo FS – LDL foi obtido por incubação (12 horas no escuro) do FS (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com diferentes concentrações de LDL (0 a 0,04 μM). O comportamento desses complexos foi analisado por espectroscopia de absorção ótica e por espectroscopia de fluorescência.

ABSTRACT

The effect of a photosensitizing compound on biological structures is governed not only by its photophysical properties but also by the specificity of its interaction with biosystems. Moreover, localization of the photosensitizer in the tumor tissue is an important factor affecting the outcome as well as mechanism leading to tumor destruction.

Following administration, most photosensitizers are bound to blood components and delivered to different sites in the organism. It is generally accepted that hydrophilic photosensitizers are largely transported by albumins and globulins and mainly accumulate in the vascular stroma of tumors. More hydrophobic sensitizers are bound to lipoproteins, which promote drug internalization by cells through endocytosis of the lipoprotein carrier. In this way, uptake and localization depend on the initial plasma binding and the plasma pharmacokinetics of the drug. However, the selective localization of some photosensitizers are influence for the difference between malignant and normal tissues. Notably, the lower pH of the microenvironment usually found in the tumor tissue and the expression of greater number of LDL receptors on the surface of the tumor cells might influence cellular uptake. Delivery to lipoproteins or target tissues may be facilitated and enhanced by the incorporation of lipophilic photosensitizers into liposomes for systemic administration.

In the present work we have studied the pH-dependence of the interaction of photosensitizers with DMPC liposomes and low density lipoprotein (LDL). The photosensitizers used in this study are Photofrin[®], Photogem[®] and Photosan[®], which are hematoporphyrin derivates. The methodology used to this work, constitute of various concentrations of DMPC liposomes and LDL at different pH values. It were used the 5,0; 7,4 and 9,0 pH values. The DMPC-drug complexes were obtained by incubation of the photosensitizers 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with differents DMPC concentrations for 30 min in the dark. The LDL was isolated from human plasma by sequential density gradient ultracentrifugation. The LDL-drug complexes were obtained by incubation of the photosensitizers 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ with differents LDL concentrations. The incubation was performed in a water bath at 20°C for 12 hours in the dark. The comportment of the complexes was analyzed by fluorescence spectroscopy and UV-visible spectroscopy.

Lista de Figuras

- Esquema 1.1:** Esquema típico para reações do Tipo I (Transferência de Elétron): **S** representa o fotossensibilizador e **A** a molécula que será oxidada.....8
- Figura 1.1:** Mecanismo de fotoxidação de biomoléculas. Mecanismo (tipo I e II) de geração de espécies reativas de oxigênio pela combinação de luz, fotossensibilizador e oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$). O fotossensibilizador no estado siglete fundamental (S_0) é irradiado com luz gerando fotossensibilizador no estado siglete excitado (S_1). O S_1 pode decair para o estado triplete excitado (T_1) gerando radical superóxido ($^3\text{O}_2^-$) (mecanismo tipo I) e/ou oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (mecanismo tipo II). Estas espécies reativas de oxigênio podem causar danos em biomoléculas das células tumorais [Silva, 2003; Ribeiro, 2005].....9
- Esquema 1.2:** Esquema típico para reações do Tipo II (Transferência de Energia).....10
- Figura 1.2:** Estrutura de agregados de porfirinas com conformação face a face (a) e lado a lado (b).....14
- Figura 1.3:** (a) Estrutura de um lipossoma de bicamada fosfolipídica. (b) Esquema de circulação de lipossomas na corrente e sua distribuição para os tecidos [Massing *et al*, 2000].....17
- Figura 1.4:** (a) Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL); (b) Estrutura do receptor de LDL; (c) Mecanismo de captação de LDL por endocitose mediada por receptores [Nelson, 2002].....21
- Figura 1.5:** Estrutura básica da porfirina.....23

- Figura 1.6:** Síntese da hematoporfirina. 1: Heme; 2: protoporfirina; 3: hematoporfirina. [De-Yu Xu, 2006].....24
- Figura 1.7:** Estrutura química do Photofrin[®], evidenciando a formação de uma ligação tipo éter entre duas unidades de porfirina [Carvalho, 2001].....25
- Figura 1.8:** Estrutura monomérica do Photogem[®], onde onde os radicais R₁ e R₂ podem ser - CH(OH)CH₃, - CH=CH₂ ou a própria estrutura monomérica da porfirina e os radicais R₃ e R₄, H ou a própria estrutura monomérica da porfirina, podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros [Menezes, 2006].....26
- Figura 3.1:** Separação de amostras centrifugadas por 24 horas a 4,0 °C e 147000 g.....34
- Figura 4.1:** Espectros de absorção na região do UV-vis de soluções 10 µg mL⁻¹ dos fotossensibilizadores em tampão acetato/fosfato /borato 30mM, em pH 7,4: (a) Photofrin[®] (Espectrofotômetro UV-Vis U-2800 Hitachi) (b) Photogem[®] e (c) Photosan[®] (Espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5G Varian).....36
- Figura 4.2:** Espectros de emissão de fluorescência de soluções 10 µg mL⁻¹ dos fotossensibilizadores em tampão acetato/fosfato /borato 30 mM, em pH 7,4: (a) Photofrin[®] (λ_{ex} = 507nm), (b) Photogem[®] (λ_{ex} = 501nm)e (c) Photosan[®] (λ_{ex} = 504nm).....37
- Figura 4.3:** Espectros de absorbância dos fotossensibilizadores em diferentes concentrações (0,5 – 20 µg.mL⁻¹) em solução tampão acetato/fosfato/borato 30mM pH 7,4: (a) Photofrin[®], (b) Photogem[®] e (c) Photosan[®]39
- Figura 4.4:** Gráficos de absorbância da banda de Soret versus concentração dos fotossensibilizadores: Photofrin[®] (a) toda a faixa de concentração e (b) ampliação até a concentração de 3 µg.mL⁻¹; Photogem[®] (c) toda a faixa de concentração e (d) ampliação até a concentração de 3 µg.mL⁻¹; Photosan.(e) toda a faixa de concentração e (f) ampliação até a concentração de 3 µg.mL⁻¹40

Figura 4.5: Modelo de curva de titulação ácido-base.....42

Figura4.5: Espectros de absorção no UV-Vis dos fotossensibilizadores na concentração $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM variando o pH na faixa de 6 a 8: (a) Photofrin[®], (c) Photogem[®] e (e) Photosan[®]. Alteração da intensidade de absorção na banda Q de maior energia com o aumento do pH: (b) Photofrin[®], (d) Photogem[®] e (f) Photosan[®]44

Figura 4.6: Espectroscopia de emissão de fluorescência no UV-Vis dos fotossensibilizadores na concentração $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM variando o pH na faixa de 6 a 8: (a) Photofrin[®] ($\lambda_{\text{ex}} = 507$), (c) Photogem[®] ($\lambda_{\text{ex}} = 501$) e (e) Photosan[®] ($\lambda_{\text{ex}} = 504$). Alteração do máximo de emissão de fluorescência com o aumento do pH: (b) Photofrin[®], (d) Photogem[®] e (f) Photosan[®]46

Figura 4.7: Espectros de absorção e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 507\text{nm}$) da solução de Photofrin[®] ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM em relação a concentração de DMPC. (a) e (b) pH 5,0; (c) e (d) pH 7,4; (e) e (f) pH 9,0.....50

Figura 4.7g: Intensidades máximas da emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 507\text{nm}$) da solução de Photofrin[®] ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) ligado ao DMPC em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM em função da concentração de DMPC em pH 5,0, 7,4 e 9,0, respectivamente.....51

Figura 4.8: Resultados de absorbância (a) e emissão de fluorescência (b) da solução de Photofrin[®] ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tampão acetato/fosfato/borato 30 mM) pela variação da concentração de DMPC (μM) nos pHs de 5,0; 7,4 e 9,0.....53

Figura 4.9: Espectros de absorção e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 501\text{nm}$) da solução de Photogem[®] ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão acetato/fosfato/borato em relação a concentração de DMPC. (a) e (b) pH 5,0; (c) e (d) pH 7,4; (e) e (f) pH 9,0.....54

Figura 4.9g: Intensidades máximas da emissão de fluorescência ($\lambda_{ex} = 501\text{nm}$) da solução de Photogem[®] ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) ligado ao fosfolípídeo em tampão acetato/fosfato/borato em função da concentração de DMPC em pH 5,0, 7,4 e 9,0, respectivamente.....55

Figura 4.10: Resultados de absorbância (a) e emissão de fluorescência (b) da solução de Photogem[®] ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$, tampão acetato/fosfato/borato) pela variação da concentração de DMPC (μM) nos pHs de 5,0; 7,4 e 9,0.....56

Figura 4.11: Espectros de absorção e emissão de fluorescência ($\lambda_{ex} = 504\text{nm}$) da solução de Photosan[®] ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão acetato/fosfato/borato em relação a concentração de DMPC. (a) e (b) pH 5,0; (c) e (d) pH 7,4; (e) e (f) pH 9,0.....58

Figura 4.11g: Intensidades máximas da emissão de fluorescência ($\lambda_{ex} = 504\text{nm}$) da solução de Photosan[®] ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) ligado ao fosfolípídeo em tampão acetato/fosfato/borato em função da concentração de DMPC em pH 5,0, 7,4 e 9,0, respectivamente.....59

Figura 4.12: Resultados de absorbância (a) e emissão de fluorescência ($\lambda_{ex} = 504\text{nm}$) (b) da solução de Photosan[®] ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão acetato/fosfato/borato) pela variação da concentração de DMPC (μM) nos pHs de 5,0; 7,4 e 9,0.....59

Figura 4.13: Espectros de absorção e de fluorescência de solução $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Photofrin[®] (tampão acetato/fosfato 30 mM) com variação da concentração de LDL (0-0.04 μM) nos pHs 5,0 (a e b) e 7,4 (c e d). 1* Espectrofotômetro UV-Vis U-2800 Hitachi ; 2* Espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5G Varian).....62

Figura 4.14: Resultados de absorvância **(a)** e emissão de fluorescência **(b)** da solução de Photofrin[®] (10 µg.mL⁻¹, tampão acetato/fosfato/borato 30 mM) pela variação da concentração de LDL (µM) nos pHs de 5,0; 7,4.....63

Figura 4.15: Espectros de absorção e de fluorescência de solução 10 µg.mL⁻¹ de Photogem[®] (tampão acetato/fosfato 30 mM) com variação da concentração de LDL (0-0.04 µM) nos pHs 5,0 **(a e b)** e 7,4 **(c e d)**.....64

Figura 4.16: Resultados de absorvância **(a)** e emissão de fluorescência **(b)** da solução de Photogem[®] (10 µg.mL⁻¹, tampão acetato/fosfato/borato 30 mM) pela variação da concentração de LDL (µM) nos pHs de 5,0; 7,4.....65

Figura 4.17: Espectros de absorção e de fluorescência de solução 10 µg.mL⁻¹ de Photosan[®] (tampão acetato/fosfato 30 mM) com variação da concentração de LDL (0-0.04 µM) nos pHs 5,0 **(a e b)** e 7,4 **(c e d)**.....66

Figura 4.18: Resultados de absorvância **(a)** e emissão de fluorescência **(b)** da solução de Photosan[®] (10 µg.mL⁻¹, tampão acetato/fosfato/borato) pela variação da concentração de LDL (µM) nos pHs de 5,0; 7,4.....67

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Classes principais de lipoproteínas humanas e algumas propriedades.....19

Tabela 4.1: Valores de pK para os fotossensibilizadores calculados a partir do comportamento da banda Q de maior energia e do máximo de emissão de fluorescência ambos pelo pH.....48

Tabela 4.2: Análise das ligações dos derivados de hematoporfirinas com LDL. Tampão acetato/fosfato/borato 30 mM; excitação: 507 nm (Photofrin[®]), 501 nm (Photogem[®]) e 504 nm (Photosan[®]). Entre parêntesis correspondem às análises dos resultados de absorção ótica.....68

Lista de Abreviaturas e Símbolos

DMPC – do inglês, Dimyristoyl phosphatidylcholine

IDL – do inglês, intermediate density lipoprotein

FS – Fotossensibilizador

TFD ou PDT – Terapia fotodinâmica ou do inglês, Photodynamic therapy

VLDL – do inglês, very low-density lipoprotein

LDL – do inglês, low-density lipoprotein

HDL – do inglês, high-density lipoprotein

SUMARIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas e Símbolos	vi
I. INTRODUÇÃO	1
1.1.Câncer	1
1.2.Terapia Fotodinâmica (TFD)	7
1.3.Critérios Básicos para a Eficiência de um Fotossensibilizador	12
1.4.Sistemas Transportadores de Fotossensibilizador	16
1.4.1.Lipossomas	16
1.4.2.Lipoproteínas	18
1.5.Diferentes localizações e efeitos do Fotossensibilizador	22
1.6.Fotossensibilizadores (FSs)	23
II. OBJETIVOS	28
III. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1.Materiais	29
3.1.1.Fotossensibilizadores	29
3.1.2.Lipossomos de DMPC	29
3.1.3.Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) humana	29
3.1.4.Equipamentos	30

3.2.Métodos	30
3.2.1.Análise Espectroscópica do Photofrin [®] , Photogem [®] , Photosan [®]	30
3.2.1.1.Medidas de Absorção Ótica	30
3.2.1.2.Medidas de Emissão de Fluorescência	31
3.2.1.3.Preparo das soluções do Photofrin [®] , Photogem [®] , Photosan [®]	
para a Análise Espectroscópica	31
3.2.2.Estudo da Agregação do Photofrin [®] , Photogem [®] , e do Photosan [®]	31
3.2.3.Estudo do Photofrin [®] , Photogem [®] , e do Photosan [®] em diferentes	
pHs	32
3.2.4.Estudo da interação do Photofrin [®] , Photogem [®] , Photosan [®] com	
DMPC	32
3.2.5.Estudo da interação do Photofrin [®] , Photogem [®] , Photosan [®] com	
LDL	33
IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1.Análise Espectroscópica do Photofrin [®] , Photogem [®] , Photosan [®]	35
4.2.Estudo da Agregação do Photofrin [®] , Photogem [®] , e do Photosan [®]	38
4.3.Estudo do Photofrin [®] , Photogem [®] , e do Photosan [®] em diferentes pHs	41
4.4.Estudo da interação do Photofrin [®] , Photogem [®] , Photosan [®] com DMPC	48
4.5.Estudo da interação do Photofrin [®] , Photogem [®] , Photosan [®] com LDL	60
V. CONCLUSÕES	70
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

I. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Tumor, sinônimo de neoplasma ou blastoma, é o crescimento anormal de tecidos. Células doentes, com algum distúrbio genético, passam a se reproduzir mais rapidamente do que as células normais, levando à formação do tumor. Este pode ser benigno ou maligno. Quando o crescimento do tumor é muito acelerado, desordenado e com tendência a se alastrar a outros órgãos, denomina-se tumor maligno ou câncer.

A palavra câncer é derivada do latim (*cancer*) e significa caranguejo. O nome é decorrente da facilidade com que o crustáceo tem de se aderir firmemente em qualquer lugar, assim como o tumor se adere ao local do corpo humano em que se desenvolve [Simplicio *et al.*, 2002].

Os cânceres são classificados de acordo com os tecidos e os tipos celulares dos quais eles derivam. Os derivados de células epiteliais são denominados de carcinomas, e aqueles derivados do tecido conjuntivo ou de células musculares são denominados de sarcomas. Os que não se enquadrarem em nenhuma dessas duas grandes categorias incluem as várias leucemias, derivadas de células hematopoiéticas, e os cânceres derivados de células do sistema nervoso [Freeman *et al.*, 1999].

As células cancerosas violam as regras mais básicas de comportamento pelos quais os organismos multicelulares são construídos e mantidos e exploram todos os tipos de oportunidades para fazer isso [Alberts *et al.*, 2004].

O corpo dos animais funciona como uma sociedade ou ecossistema cujos integrantes são as células, que reproduzem por divisão celular e organizam-se em conjuntos que colaboram entre si, os tecidos. Deste modo, para coordenarem este

comportamento, as células enviam, recebem e interpretam um conjunto muito sofisticado de sinais que servem para o controle social que diz a cada uma como devem atuar. Disso resulta que cada célula comporta-se de uma maneira socialmente responsável, repousando, dividindo-se ou morrendo, quando necessário, para o bem estar do organismo. As alterações moleculares que perturbam essa harmonia são problemáticas para a sociedade multicelular. A cada dia, em cada corpo humano com mais de 10^{14} células, bilhões de células sofrem mutações que podem desregular os controles sociais. Mais perigoso ainda, uma mutação pode dar certa vantagem seletiva para uma célula, possibilitando que ela se divida mais vigorosamente que suas vizinhas e venha a se tornar a fundadora de um clone mutante que passe a crescer. Uma mutação que leve um dos indivíduos que participam da cooperação a ter este tipo de comportamento egoísta pode comprometer o futuro de todo o conjunto. Os ciclos repetidos de mutação, de competição e seleção natural, ocorrendo em populações de células somáticas só pioram a situação. Esses são os ingredientes básicos do câncer, uma doença nas quais certos clones mutantes de algumas células passam a prosperar à custa das células vizinhas e, ao fim, leva a completa destruição da sociedade celular [Alberts *et al.*, 2004]. Entretanto, só uma fração diminuta das células corporais que sofrem mutação leva ao câncer, pois os tumores não surgem como resultado de eventos genéticos únicos, mas sim, resultam de processos múltiplos, nos quais devem surgir várias mutações em genes específicos dentro de uma única célula para que ela se torne cancerosa. Algumas destas mutações são transmitidas pelos genitores através da linhagem germinativa. Outras surgem *de novo* na linhagem celular somática de uma determinada célula [Freeman *et al.*, 1999; Guyton *et al.*, 1997].

Dois tipos gerais de mutações estão associados aos tumores: mutações oncogênicas e mutações em genes supressores tumorais. Os genes que codificam proteínas que fazem o controle positivo do ciclo celular ou bloqueiam a apoptose podem tipicamente serem mutados para se tornar oncogenes. Estes alelos promotores de tumor são mutações de *ganho de função*. Por outro lado, os genes que codificam proteínas que controlam negativamente o ciclo celular ou regulam positivamente a apoptose são encontrados na classe de supressores tumorais. Neste caso, os alelos promotores de tumor são mutações de *perda de função* [Freeman *et al.*,1999].

Os oncogenes compreendem um grupo cujos produtos têm papéis importantes na regulação de atividades bioquímicas dentro das células, inclusive as atividades relacionadas com a divisão celular. Os produtos dos oncogenes têm papéis importantes na regulação de atividades celulares. Conseqüentemente, uma mutação em um destes genes pode perturbar o balanço bioquímico na célula e colocá-la no caminho de se tornar cancerosa. Os estudos de muitos tipos diferentes de câncer humano demonstraram que os oncogenes celulares mutantes estão associados ao desenvolvimento de um estado canceroso. Devido a este defeito, a proteína mutante é mantida em um modo ativo de sinalização, transmitindo uma informação que estimula as células a se dividirem de modo descontrolado. As mutações em oncogenes celulares que contribuem para a formação de tumores são raramente herdadas da linhagem germinativa. A grande maioria ocorre espontaneamente nas células somáticas durante o curso das divisões celulares. Entretanto, todo o desenvolvimento de um estado canceroso em geral requer mutações adicionais, e tipicamente estas mutações afetam genes que estão normalmente envolvidos em conter o crescimento celular. Estas mutações definem, portanto, uma classe de genes relacionados ao câncer, os

antioncogenes, ou, como são mais frequentemente chamados genes supressores tumorais. Esses genes foram inicialmente descobertos pela análise de cânceres raros onde a predisposição para desenvolver o câncer segue um padrão dominante de herança. Esta predisposição é devida à heterozigose para uma mutação herdada de perda de função no gene supressor tumoral. O câncer só se desenvolve se ocorrer uma segunda mutação nas células somáticas e se esta mutação inativar a função do alelo tipo selvagem do gene supressor tumoral. Assim, o desenvolvimento do câncer requer duas mutações de perda de função, isto é, dois eventos inativadores, um em cada uma das duas cópias do gene supressor tumoral [Snustad *et al.*, 2001].

Estatísticas revelam que cerca de 1% de todos os cânceres são hereditários. Dentre esses mais de 20 síndromes diferentes foram identificadas e em quase todas, o defeito subjacente está em um gene supressor tumoral e não em um oncogene. As proteínas codificadas por estes genes supressores tumorais, tais como o pRB (regulação do ciclo celular), p53 (regulação do ciclo celular e apoptose), pAPC (regulação da renovação celular do epitélio do IG), pBRCA1 e pBRCA2 (reparo do DNA danificado), funcionam em diversos processos celulares, incluindo divisão celular, diferenciação, morte celular programada e reparo de DNA [Nelson, 2002].

A proteína supressora tumoral p53 codificada pelo gene TP53, é a de maior relevância. As mutações herdadas no TP53 levam a uma condição dominante rara na qual qualquer um dos vários tipos de câncer pode se desenvolver. As mutações somáticas que inativam ambas as cópias do gene TP53 também estão associadas a uma variedade de cânceres. De fato, essas mutações são encontradas na maioria de todos os tumores humanos. A perda de função da proteína p53 é, portanto, uma etapa fundamental na carcinogênese. Essa proteína possui um papel essencial nas respostas

celulares ao estresse. Uma vez ativada, ela estimula a transcrição de genes cujos produtos param o ciclo celular, permitindo assim que o DNA danificado seja reparado, ou ativa outro grupo de genes cujos produtos levam a célula à morte por um processo chamado apoptose [Alberts *et al.*, 2004]

Um fator relevante na resposta que pára o ciclo celular é a proteína p21 que é codificada pela ativação de um gene pelo fator de transcrição p53. Essa proteína inibe os complexos ciclina-proteína CDK responsável pela progressão da divisão celular [Freeman *et al.*, 2001]

A inativação mutacional de vários genes supressores tumorais é caracterizada na maioria das formas de câncer. Dois eventos mutacionais são necessários para eliminar ambas as cópias funcionais de um gene supressor tumoral dentro de uma célula. As proteínas codificadas por esse gene têm papéis fundamentais na regulação do ciclo celular [Guyton *et al.*, 2000].

Na maioria dos casos de câncer, a formação de um tumor maligno não é atribuível à ativação descontrolada de um único proto-oncogene ou à inativação de um único gene supressor tumoral. A formação, crescimento e metástase de um tumor dependem do acúmulo de mutações em vários genes diferentes. Assim, as vias genéticas do câncer são diversas e complexas [Snutad *et al.*, 2001].

As mutações nos genes supressores tumorais, como as mutações em oncogenes, atuam direta ou indiretamente para promover o ciclo celular ou bloquear a apoptose. Os cânceres se desenvolvem por um acúmulo de mutações somáticas em proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Tipos diferentes de câncer estão associados a mutações em genes diferentes [Freeman *et al.*, 2001; Snutad *et al.*, 2001].

A probabilidade de mutações pode ser aumentada por muitas vezes, quando a pessoa é exposta a determinados fatores químicos, físicos ou biológicos. Entre os agentes mutagênicos que causam câncer, incluem-se os carcinógenos químicos, tais como aminas aromáticas, nitrosaminas e agentes alquilantes (que, tipicamente, causam uma alteração localizada simples na seqüência de nucleotídeos), varias formas de radiação – luz UV e radiações ionizante, como o raio-X (que caracteristicamente causam quebras cromossômicas e translocações) - e vírus (que introduzem DNA exógeno nas células)[Guyton *et al.*,1997; Alberts *et al.*,2004]..

Na população humana, o câncer é responsável por grande parte do sofrimento humano. Todos os anos cerca de 7 milhões de pessoas morrem de câncer no mundo. No Brasil, houve 141 mil mortes (ou 13,7% do total de óbitos) por câncer só em 2004. As mortes por conta do câncer de próstata aumentaram 95% entre 1979 e 2004. Entre as mulheres o câncer que mais provoca mortes é o de mama. Já em relação aos homens é o de pulmão [INCA, 2004].

Atualmente, existe apenas uma possibilidade de cura para o câncer: matar as células cancerosas. Entre as terapias convencionais do câncer estão a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, que podem ser usados de forma isolada ou combinadas. Embora nos últimos anos estas técnicas tenham sofrido um desenvolvimento substancial, permitindo o aumento do tempo de vida dos pacientes com câncer, têm eficiência limitada e resultam em sérios efeitos colaterais, assim como a perda de tecido em funcionamento normal. Diante disso, alternativas estão sendo propostas na área de oncologia, com o intuito de aumentar a seletividade do tratamento e diminuir esses efeitos. Dentre estas alternativas, destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD ou do inglês

PDT – *photodynamic therapy*), uma modalidade relativamente nova no tratamento de câncer. [Simplicio *et al.*,2002 ; Sharman *et al.*, 2004]

1.5. Terapia Fotodinâmica (TFD)

A luz tem sido utilizada no tratamento de doenças desde a antiguidade, porém somente na segunda metade do século XX passou a ser aplicada de maneira significativa na medicina, sendo uma destas utilizações a Terapia Fotodinâmica [Schuitmaker, *et al.*, 1996; Ackroyd, *et al.*, 2001]

Os primeiros experimentos envolvendo morte celular através da utilização de luz e fotossensibilizadores foram relatados em 1900 por Raab [Raab, 1900]. No ano seguinte foi relatada a administração sistêmica de fotossensibilizadores em humanos para o tratamento de epilepsia, pelo médico francês J. Prime, que acabou induzindo dermatites nas áreas expostas ao sol [Prime, 1901]. Essa descoberta levou, em 1903 , à primeira aplicação de fotossensibilizadores no tratamento de câncer por Tappernier e Jesionek, que usaram eosina tópica e luz branca no tratamento de tumores de pele [Von Tappernier e Jesionek, 1903]. Entretanto, essa descoberta foi praticamente esquecida até a década de 60, quando Lipson e Baldes demonstraram que os fotossensibilizadores, no caso derivados de hematoporfirinas, poderiam ser utilizados na localização de tumores [Lipson e Baldes, 1960]. Em 1975, Dougerty e colaboradores relataram o primeiro caso bem sucedido de cura de tumores em animais utilizando derivado de hematoporfirina (HpD) e fonte de luz vermelha [Dougerty *et al.* ,1975].

Em 1976, Kelly e Snell realizaram o primeiro estudo de aplicação de TFD em humanos e obtiveram resultados positivos ao tratarem câncer na bexiga com hematoporfirina e luz branca. Neste mesmo ano, Weishaupt e colaboradores postularam

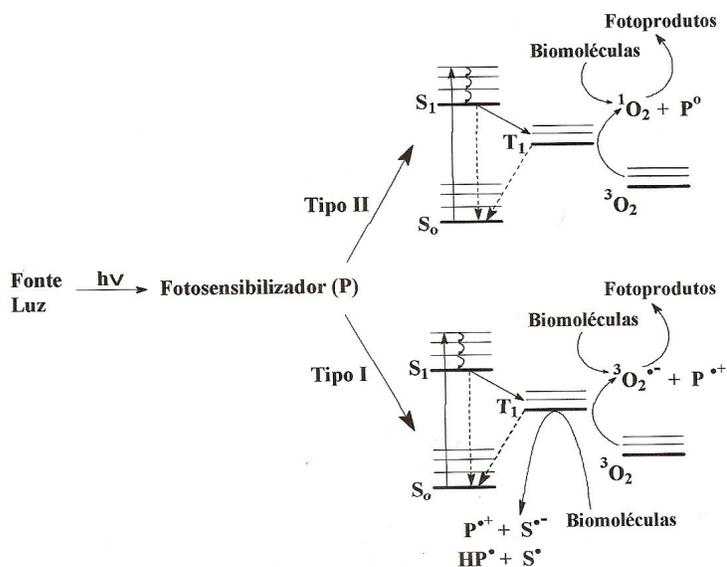
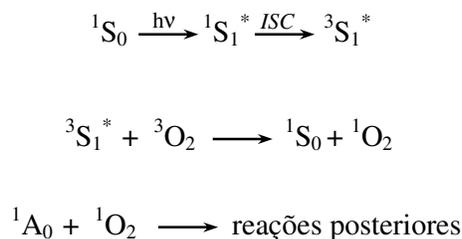


Figura 1.1: Mecanismo de fotoxidação de biomoléculas. Mecanismo (tipo I e II) de geração de espécies reativas de oxigênio pela combinação de luz, fotossensibilizador e oxigênio no estado fundamental (3O_2). O fotossensibilizador no estado siglete fundamental (S_0) é irradiado com luz gerando fotossensibilizador no estado siglete excitado (S_1). O S_1 pode decair para o estado tripleto excitado (T_1) gerando radical superóxido ($^3O_2^{\cdot-}$) (mecanismo tipo I) e/ou oxigênio singlete (1O_2) (mecanismo tipo II). Estas espécies reativas de oxigênio podem causar danos em biomoléculas das células tumorais [Silva, 2003; Ribeiro, 2005].

Em geral, processos de transferência de elétrons tendem a ser muito rápidos devido à sobreposição dos orbitais envolvidos que durante a formação do complexo excitado é máxima. Na natureza exata do processo, onde serão formados $S^{\cdot+}$ e $A^{\cdot-}$ ou $S^{\cdot-}$ e $A^{\cdot+}$ ou S^{\cdot} e A (Esquema 1.1), dependerão das propriedades redox de $^3S^*$ e de 1A . Os radicais majoritários dessa reação interagem com o oxigênio molecular produzindo uma

mistura de espécies reativas de oxigênio, assim como $\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$, O_2^- e H_2O_2 , que podem oxidar uma grande variedade de biomoléculas [Ochsner, 1997; Bonnet, 1995].

No mecanismo *Tipo II*, acontece a transferência de energia do FS no estado excitado triplete para o oxigênio molecular no seu estado fundamental, gerando oxigênio singlete, que é um agente altamente citotóxico, através de um processo de transferência de energia não radioativo (Esquema 1.2).



Esquema 1.2: Esquema típico para reações do Tipo II (Transferência de Energia).

O oxigênio singlete é como são conhecidos os três estados eletronicamente excitados (${}^1\Delta_x$, ${}^1\Delta_y$, ${}^1\Sigma_g$) imediatamente superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental (${}^3\Sigma_g$). Segundo a teoria do orbital molecular (TOM), a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares π -antiligantes degenerados (π_x^* e π_y^*). Esses elétrons tendem a possuir o mesmo estado de spin de forma a produzir multiplicidade máxima e assim um estado de mais baixa energia. Essa é a razão pela qual o estado fundamental do oxigênio molecular ser triplete. Nesse caso, os estados que possuem energia intermediária (${}^1\Delta_x$, ${}^1\Delta_y$) são os responsáveis pela reatividade química do oxigênio, pois estes estados têm um tempo de meia-vida considerável quando comparado com o estado de mais alta

energia ($^1\Sigma_g$). Os estados $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ são degenerados e possuem uma configuração eletrônica onde cada elétron ocupa um dos orbitais antiligantes π^* que se encontram em planos mutuamente perpendiculares [Machado, 2000].

Por serem degenerados, os estados $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ são representados como sendo o estado $^1\Delta_g$. O orbital molecular vazio no estado $^1\Delta_g$ confere ao oxigênio singlete um caráter eletrofílico, que favorece sua participação mais efetiva em reações químicas, principalmente quando os substratos possuem sítios ricos em elétrons [Machado, 2000].

Existem vários fatores que influenciam o tipo de mecanismo fotodinâmico envolvido. O mecanismo da reação depende do meio, do fotossensibilizador, do tempo de meia-vida do oxigênio singlete e da estabilidade dos radicais gerados. Experimentos mostram que a reação pelo mecanismo Tipo I é favorecida em meios polares, porque existe a estabilização do par de radicais formados e inibição da reação de transferência de elétrons reversa. Em geral, baixas concentrações de oxigênio e estruturas moleculares facilmente oxidadas ou reduzidas também facilitam reações do Tipo I. A reação pelo mecanismo Tipo II é favorecida em meios hidrofóbicos onde o tempo de meia-vida e a solubilidade do oxigênio singlete são altos. Este mecanismo é favorecido pela elevada concentração de oxigênio, já que necessitam diretamente deste para acontecer [Bonnett, 1995].

Investigações experimentais geralmente revelam que ambos os tipos de mecanismo acontecem nas células e tecidos. O mecanismo de ação do FS pode mudar do Tipo II para o Tipo I, como resultado da diminuição da oxigenação da neoplasia [Sobolev *et al.*, 2000; Ochsner, 1997; Howe *et al.*, 1998].

Ácidos nucleicos, enzimas, membranas celulares, mitocôndrias, lisossomos e núcleos são os maiores alvos biológicos dos radicais produzidos e do oxigênio singlete.

Eles são rapidamente atacados e provocam a liberação de uma grande variedade de produtos patológicos, como as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucócitos. A ativação do sistema complementar e a infiltração de células sanguíneas imunologicamente ativas na região do tumor aumentam o efeito prejudicial desses intermediários iniciando a necrose do tumor. No entanto, acredita-se que a completa erradicação do tumor, acontece devido ao dano causado ao epitélio vascular, que leva a morte do tumor devido à hipoxia, ou seja, causada pela deficiência na oxigenação pelo impedimento de circulação livre da hemoglobina. [Machado, 2000; Howe *et al.*, 1998; Konan *et al.*, 2002]

1.3. Critérios Básicos para a Eficiência de um Fotossensibilizador

Na escolha de um fotossensibilizador deve-se levar em conta as características gerais necessárias deste, para que tenha eficiência como agente terapêutico em terapia fotodinâmica. Essas características são apresentadas em seguida.

O fotossensibilizador deve possuir alto índice de pureza e composição química definida, simplificando assim, os estudos de interação biológica e a interpretação da relação dose-resposta. Sua síntese deve ser fácil, de alto rendimento e com boa reprodutibilidade. Deve ter baixa ou nenhuma toxicidade intrínseca, ser retido preferencialmente pelos tecidos tumorais e ser rapidamente eliminado dos tecidos após o tratamento. É importante que tenha estabilidade cinética e termodinâmica, para conferir a substância um adequado tempo de meia vida necessário às reações de transferência de elétrons (mecanismo tipo I) e as reações de transferência de energia (mecanismo tipo II) [Simplicio *et al.*, 2002; Konan *et al.*, 2002; Bonnet, 1995].

Quanto às características fotofísicas favoráveis, um fator importante é o comprimento de onda necessário à foto-excitação do composto na região do visível. Quanto maior o comprimento de onda da radiação incidente, maior seu grau de penetração no tecido. Radiações de comprimento de onda menor sofrem um maior espalhamento e a presença de cromóforos endógenos, que absorvem em comprimento de onda menores, como a hemoglobina, fazem com que haja uma menor penetração da radiação. A eficiência da TFD depende diretamente do coeficiente de transmissão do meio de propagação da radiação. Com o aumento do coeficiente, mais alta é a possibilidade do tratamento de tumores maiores e mais profundos. Portanto, os fotossensibilizadores desenvolvidos para o uso em TFD devem possuir forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível (640-700nm). Entretanto, os valores de comprimento de onda não podem ser muito altos por três motivos: (i) a energia do estado triplete do fotossensibilizador deve ser suficientemente alta para que seja possível a transferência de energia do estado triplete do fotossensibilizador para o oxigênio no estado fundamental; (ii) poderá ocorrer uma redução do potencial de oxidação do fotossensibilizador, tornando-o menos estável cineticamente e deixando o composto sujeito à decomposição estimulada pela radiação, fenômeno denominado como fotobranqueamento; (iii) acima de 800nm ocorre absorção da radiação pela água, o que restringe o comprimento de onda a este limite. Os parâmetros importantes que caracterizam o fotossensibilizador para aplicações terapêuticas são, portanto, o rendimento quântico (Φ_T), o tempo de meia-vida (τ_T) e a energia (E_T) do estado triplete [Simplicio *et al.*, 2002; Bonnet, 1995].

A relação entre o caráter hidrofílico e hidrofóbico de um fotossensibilizador influencia diretamente o estado de agregação do mesmo e também no seu transporte e

incorporação pelas células. Moléculas de fotossensibilizadores tendem a se agregarem ao serem colocadas em um meio com a constante dielétrica incompatível com seu caráter hidrofílico/hidrofóbico, formando estruturas altamente organizadas que são classificadas de acordo com a orientação do dipolo de transição induzido do monômero constituinte [Kessel *et al.*, 1992].

Na literatura é descrito que derivados de hematoporfirinas apresentam dois tipos de agregados formados em solução aquosa: agregado-J e agregado-H. Os agregados-J (lado a lado) apresentam os agregados “tipo linear” e os agregados-J (face a face) apresentam os agregados “tipo sanduíche” (Figura 1.2) [Menezes, 2006].

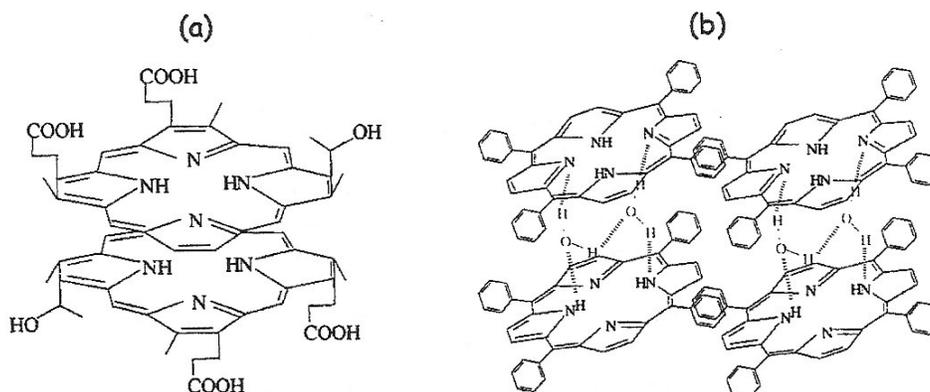


Figura 1.2: Estrutura de agregados de porfirinas com conformação face a face (a) e lado a lado (b).

As propriedades espectrais típicas intrínsecas dos agregados do fotossensibilizador com relação aos monômeros são: o deslocamento e o alargamento da banda para o vermelho (agregado-J) e para o azul (agregado-H), a diminuição do tempo de meia-vida do estado triplete e, portanto, diminuição do rendimento quântico da

formação do oxigênio singlete devido à dissipação de energia por conversão interna, perdendo assim, parte de sua capacidade fotodinâmica. [Kessel *et al.*, 1992; Menezes, 2006].

Se o objetivo é empregar um fotossensibilizador menos hidrossolúvel, pode-se evitar a agregação por meio da introdução de substituintes polares nas moléculas do fotossensibilizador ou administrando-os distribuídos em suspensões de microfases hidrofóbicas tais como vesículas, micelas e lipossomas [Simplicio *et al.*, 2002; Konan *et al.*, 2002; Uzdensky *et al.*, 2004].

O ideal é que os fotossensibilizadores sejam bastante seletivos às células tumorais, para que possa ser administrado em baixas doses e assim diminuir a fotossensibilização das células de tecidos saudáveis. A aplicação terapêutica do fotossensibilizador se faz na forma de administração intravenosa de solução aquosa. Isso é um fator limitante devido à propensão da difusão simples que rapidamente remove o fotossensibilizador da corrente sanguínea. Sendo assim, a concentração de fotossensibilizador no tumor fica insuficiente. Por isso, os principais responsáveis pela distribuição seletiva dos fotossensibilizadores são as proteínas plasmáticas.

Após a administração *in vivo*, muitos fotossensibilizadores associam-se com várias proteínas plasmáticas, principalmente a albumina e as lipoproteínas, encontrando-se pouca concentração de fotossensibilizador na forma livre. A natureza dessa interação depende das características do fotossensibilizador e da proteína plasmática envolvida. Os fotossensibilizadores mais hidrofílicos tendem a associar-se com albuminas, enquanto que os mais hidrofóbicos com as lipoproteínas, principalmente a lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Esses sistemas transportadores podem levar ao aperfeiçoamento da ação fotodinâmica, pois, distribuem mais seletivamente os fotossensibilizadores, resultando em aumento do acúmulo do mesmo no tumor. Devido a isso, muitos pesquisadores investigam os meios de realçar a associação dos fotossensibilizadores com as proteínas plasmáticas. [Sharman *et al.*, 2004; Cunderlíková *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 1998, Foley *et al.*, 1997; Candide *et al.*, 1986]

1.4. Sistemas Transportadores de Fotossensibilizador

1.4.1. Lipossomas

Lipossomas são vesículas de fosfolípídeos, uni- ou multi-lamelares, que apresentam uma natureza particular: as lamelas são constituídas de bicamadas de fosfolípídeos encapsulando um compartimento aquoso, cuja organização molecular permite a incorporação de drogas hidrofóbicas em sua matriz e hidrofílicas na região próxima à interface das lamelas e na fase aquosa. Seus principais componentes são substâncias existentes no corpo em grande quantidade (fosfolípídeo e colesterol), lhes garantido uma boa biocompatibilidade e alta afinidade por membranas celulares. Por causa disso, os lipossomas são considerados bons transportadores de drogas para as células (Figura 1.3a). [Sobolev *et al.*; 2000; Massing *et al.*, 2000; Derycke, 2004].

O primeiro grande passo no estudo de vesículas veio do trabalho de Alec Bangham e colaboradores [Bangham, 1965], que em 1965, caracterizaram um sistema de vesículas fosfolípídica ao qual, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomas [Sesse *et al.*, 1968]. Após este trabalho, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas. Em 1971, Gregory

Gregoriadis propôs pela primeira vez a utilização de lipossomas como sistema transportador de drogas [Gregoriadis, 1971]. Na década de 70 e início de 80, houve uma verdadeira euforia pelo potencial de aplicação destas vesículas nas indústrias farmacêuticas e cosméticas. Atualmente, os lipossomas ainda são largamente utilizados [Santos *et al.*, 2002].

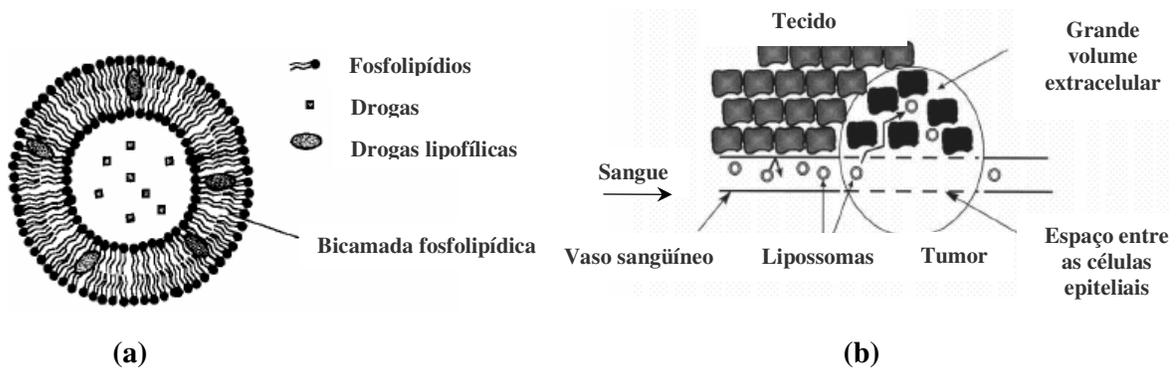


Figura 1.3: (a) Estrutura de um lipossoma de bicamada fosfolipídica. (b) Esquema de circulação de lipossomas na corrente e sua distribuição para os tecidos [Massing *et al.*, 2000].

O primeiro grande passo no estudo de vesículas veio do trabalho de Alec Bangham e colaboradores [Bangham *et al.*, 1965], que em 1965, caracterizaram um sistema de vesículas fosfolipídica ao qual, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomas [Sessa *et al.*, 1968]. Após este trabalho, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas. Em 1971, Gregory Gregoriadis propôs pela primeira vez a utilização de lipossomas como sistema transportador de drogas [Gregoriadis, 1971]. Na década de 70 e início de 80, houve uma verdadeira euforia pelo potencial de aplicação destas vesículas nas indústrias

farmacêuticas e cosméticas. Atualmente, os lipossomas ainda são largamente utilizados [Santos *et al.*, 2002].

Alguns trabalhos têm demonstrado que este tipo de transportador é ideal para uso em TFD, pois seu emprego tem proporcionado aumento na eficiência fotodinâmica dos fotossensibilizadores. Um dos motivos seria a diminuição da agregação de fotossensibilizadores hidrofóbicos, onde o lipossoma o solubiliza e o mantém na forma monomérica. Outro motivo seria a diminuição do foto-branqueamento permitindo um longo tempo de circulação do fotossensibilizador encapsulado no corpo. Sendo uma partícula de tamanho reduzido, o lipossoma se difunde através da membrana vascular mais permeável da região do tumor e atinge assim, as células tumorais, aumentando a seletividade (Figura 1.3b) [Koman *et al.*, 2002]. Entretanto, em muitos casos, a incorporação de fotossensibilizadores em lipossomas aumenta apreciavelmente a eficiência fotodinâmica. Acredita-se que esse aumento seja devido ao fato de que, uma vez no sistema circulatório, os lipossomas podem servir como doadores, por transferência direta, de fotossensibilizadores para lipoproteínas plasmáticas, estes sim mais seletivos como será descrito mais adiante. [Bourré *et al.*, 2003, Derycke *et al.*, 2004]

1.4.2. Lipoproteínas

O colesterol e os triacilglicerídeos são transportados no plasma na forma de partículas lipoprotéicas. Diferentes combinações de lipídeos e apoproteínas produzem partículas de densidades diferentes, que podem ser separadas entre si por ultracentrifugação. As lipoproteínas são classificadas de acordo com a densidade

crescente: quilomícrons, quilomícrons remanescentes, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL, do inglês *very low-density lipoprotein*), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL, do inglês *intermediate density lipoprotein*), lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low-density lipoprotein*) e lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês *high-density lipoprotein*) (Tabela 1.1) [Nelson, 2002].

Tabela 1.1: Classes principais de lipoproteínas humanas e algumas propriedades.

Lipoproteína e Apoproteínas	Densidade (g/ml)	Composição (% em peso)				
		Proteína	Fosfolipídios	Colesterol livre	Esteres do colesterol	Triacilgliceróis
Quilomicrons ApoC-II ApoC-III e ApoE	< 1,006	2	9	1	3	85
VLDL ApoC-II ApoC-III ApoE e ApoB-100	0,95 - 1,006	10	18	7	12	50
LDL Apo B-100	1,006 – 1,063	23	20	8	37	10
HDL ApoA-I ApoC-II ApoC-III e ApoE	1,063 – 1,210	55	24	2	5	4

Fonte: Nelson, 2002

A lipoproteína é uma partícula constituída de uma parte central de lipídios essencialmente apolares, circundada por uma capa de lipídios polares e apoproteínas (Figura 1.4a). Cada classe de lipoproteína tem uma função específica, determinada por

seu lugar de síntese, composição lipídica e conteúdo de apoproteínas. Essas partes protéicas agem como sinalizadoras, tanto dirigindo a lipoproteína para tecidos específicos (células-alvo), como ativando enzimas que agem sobre elas, tais como as lípases e a colesterol-esterase (Figura 1.4c) [Stryler *et al.*, 1995; Nelson *et al.*, 2002; Markku *et al.*, 2000].

A proliferação descontrolada das neoplasias demanda uma quantidade grande de colesterol para o metabolismo de membranas, assim estas células expressam um número bastante elevado de receptores de lipoproteínas quando comparado às células normais, principalmente receptores de LDL (Figura 1.4b) que são as responsáveis pela destinação fisiológica de colesterol para as células em duplicação. Isso faz do LDL e das outras lipoproteínas (VLDL e HDL), extremamente atrativas para o transporte e entrega dos FS nas células de tumores [Valduga *et al.*, 1999; Kader *et al.*, 2002].

As vantagens do uso de lipoproteínas, como o LDL, na distribuição de fotossensibilizadores são: (i) por serem componentes naturais, as lipoproteínas escapam do reconhecimento pelo sistema imunológico, tendo um longo tempo de circulação no corpo; (ii) sendo uma partícula de tamanho reduzido, se difunde através da membrana vascular; (iii) possui mecanismo de endocitose mediado por receptor de apoproteínas presentes nas células, justificando a especificidade; e (iv) seu núcleo apolar constitui um excelente domínio para FS hidrofóbicos, que são protegidos do sangue durante o transporte [Konan *et al.*, 2001].

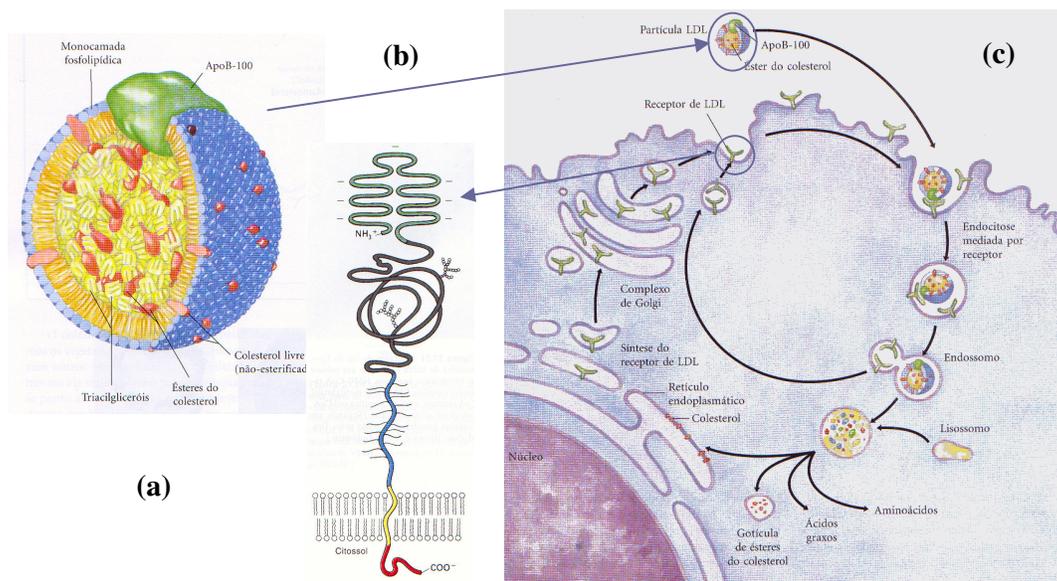


Figura 1.4: (a) Estrutura de uma lipoproteína de baixa densidade (LDL); (b) Estrutura do receptor de LDL; (c) Mecanismo de captura de LDL por endocitose mediada por receptores [Nelson, 2002].

Vários estudos mostraram que a utilização da LDL como transportador realça a eficiência e a seletividade do fotossensibilizador. Acredita-se que as LDL sejam importantes no transporte dos fotossensibilizadores mais hidrofóbicos [Konan *et al.*, 2002; Kader *et al.*, 2002].

A interação entre o FS e o LDL pode acontecer na matriz da apoproteína ou no núcleo lipídico. Os FS muito hidrofóbicos são espontaneamente incorporados no núcleo lipídico da lipoproteína, sem mudar as propriedades físicas ou biológicas da partícula, isto é, sem alterar o reconhecimento da LDL pelo receptor de LDL. Por outro lado, quando o FS se liga a apoproteína, pode levar a mudança conformacional desta,

impedindo o seu reconhecimento pelo receptor, prejudicando a especificidade [Sharman *et al.*, 2004; Konan *et al.*, 2002].

Apesar da LDL ser a mais importante lipoproteína do sistema de distribuição de FS há trabalhos mostrando bons resultados também com VLDL e HDL. A melhor eficiência desses sistemas é dependente do FS utilizado. Porém, todos os resultados foram superiores à utilização simples de soluções na administração do FS.

1.5. Diferentes localizações e efeitos do Fotossensibilizador

O modo de distribuição do fotossensibilizador define o local preferencial de seu depósito nas neoplasias. Quando a distribuição é assistida pela albumina ou apresenta-se na forma livre, o fotossensibilizador acumula-se no estroma vascular do tumor. Enquanto que, quando distribuído pelos lipossoma e LDL, o fotossensibilizador se encontra em sítios intracelulares, como a membrana mitocôndrial e outras endomembranas. Desta forma podem resultar em modos diferentes do controle do tumor. Quando há um acúmulo de fotossensibilizador no estroma vascular, a TFD causa dano da matriz extracelular, induzindo regressão do tumor por hipóxia. Porém, pode haver formação de nova vascularização antes que todas as células tumorais necrosem, levando a nova proliferação das células tumorais. Já com os fotossensibilizadores distribuídos em regiões intracelulares, induz morte direta das células tumorais, não havendo reincidência do tumor. [Sharman *et al.*, 2004; Cunderlíková *et al.*, 2000].

1.6. Fotossensibilizadores (FSs)

Os compostos mais usados em TFD são os compostos derivados da porfina que é esqueleto básico de uma ampla variedade de porfirinas, clorinas e ftalocianinas. As porfirinas contêm quatro anéis pirrólicos ligados entre si por átomos de carbono em um sistema altamente conjugado, diferindo entre si apenas quanto à posição dos seus substituintes no anel. A Figura 1.5 mostra a estrutura básica da porfina (porfina). Os quatro anéis pirrólicos são numerados pelos algarismos romanos de I a IV e os quatro carbonos das metinas (ou posição meso) são identificados pelas letras α , β , γ e δ . [Carvalho, 2001; Menezes, 2006].

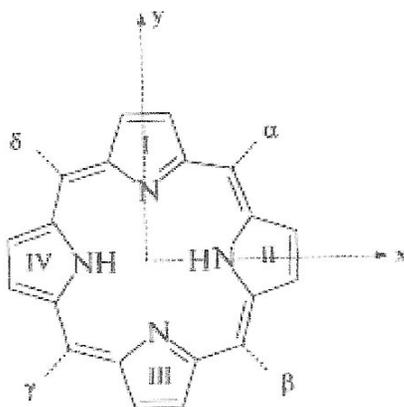


Figura 1.5: Estrutura básica da porfina.

A molécula de porfina e seus derivados químicos compreendem uma classe muito importante de moléculas que estão presentes em muitos sistemas biológicos, desempenhando papéis vitais no funcionamento destes, como a fotossíntese (clorofila), a transferência de elétrons (citocromos), bem como o transporte (hemoglobina) e armazenamento (mioglobina) de oxigênio [Darwent *et al.*, 1982, Menezes, 2006].

Apesar dos diversos tipos de compostos fotossensíveis estarem sendo intensamente investigados, os fotossensibilizadores ainda mais utilizados em estudos clínicos em TDF são os derivados de hematoporfirinas que são considerados fotossensibilizadores de primeira geração. Entre os fotossensibilizadores de primeira geração se destacam o Photofrin[®] (de origem americana), o Photogem[®] (de origem russa) e o Photosan[®] (de origem alemã), que são compostos por uma mistura complexa de derivados de hematoporfirinas com até oito unidades de porfirina unidas por ligações éter ou éster, formando monômeros, dímeros e oligômeros. Estes são produzidos a partir de hemoglobina do sangue de animais e humanos (Figura 1.6).

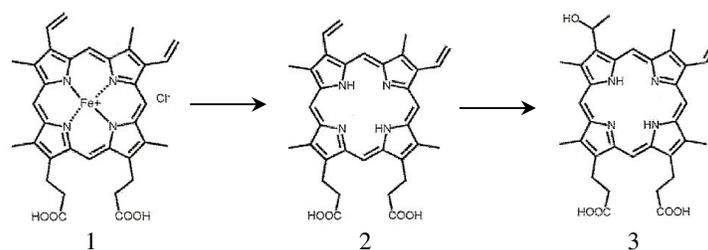


Figura 1.6: Síntese da hematoporfirina. 1: Heme; 2: protoporfirina; 3: hematoporfirina. [De-Yu Xu, 2006].

Os espectros de absorção eletrônica destes derivados de hematoporfirinas contêm cinco bandas de absorção, sendo uma banda intensa na região de 370nm conhecida como banda de Soret e quatro bandas de menor intensidade em comprimentos de onda maiores conhecidas como bandas-Q [Simplicio *et al.*, 2002; Cunderlíková *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2000].

O Photofrin[®] produzido pela QLT Inc. e atualmente vendido pela Axcan Scandipharm Inc. foi o primeiro a ser aprovado pela FDA para o tratamento de câncer através da TFD. Este é largamente empregado no tratamento de uma variedade de tumores tanto nos Estados Unidos quanto na Europa e Japão [Dougherty, 1993]. Sua estrutura química está apresentada na Figura 1.7.

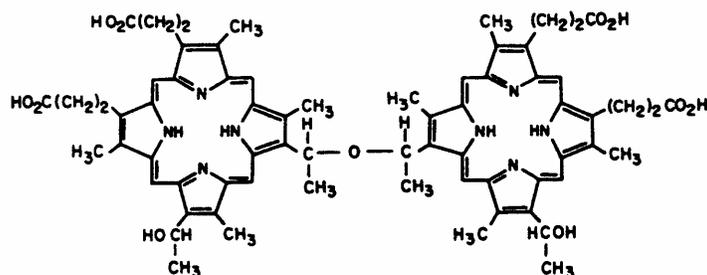


Figura 1.7: Estrutura química do Photofrin[®], evidenciando a formação de uma ligação tipo éter entre duas unidades de porfirina [Carvalho, 2001].

O Photogem[®] é um fotossensibilizador de origem russa, produzido pelo Instituto de Alta Tecnologia Química de Moscou, análogo ao Photofrin[®] em termos de estrutura, características físicas e químicas, propriedades terapêuticas e de diagnóstico. A estrutura monomérica da Photogem[®] está apresentada na Figura 1.8. No Brasil, o Photogem[®] é aprovado pela ANVISA para uso clínico e tem sido utilizado pela equipe do Dr. Guilherme Cestari, médico do Hospital Amaral de Carvalho em Jaú – SP que foi o pioneiro da implantação da TFD no país e pela equipe da Profa. Dra. Cacilda da Silva

Souza, médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – SP [Ribeiro, 2005].

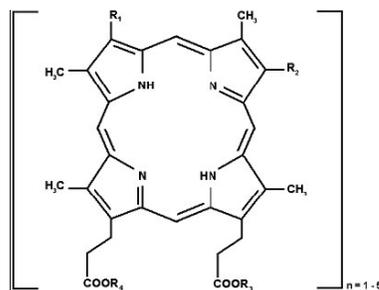


Figura 1.8: Estrutura monomérica do Photogem[®], onde onde os radicais R₁ e R₂ podem ser - CH(OH)CH₃, - CH=CH₂ ou a própria estrutura monomérica da porfirina e os radicais R₃ e R₄, H ou a própria estrutura monomérica da porfirina, podendo formar dímeros, trímeros e oligômeros [Menezes, 2006].

O Photosan[®], de origem alemã, é aprovado para uso clínico em TFD pela União Européia desde agosto de 2002 e é utilizado no tratamento de diferentes tipos de câncer de pele e da membrana mucosa. Sua estrutura básica é análoga a estrutura monomérica do Photogem[®] (Figura 1.8).

Esses fotossensibilizadores de primeira geração apresentam algumas desvantagens como a fotossensibilidade prolongada da pele (2,5 a 3 meses), baixa eficiência por absorverem radiação de baixa penetração nos tecidos e um tempo longo necessário (24-72 hs) entre a administração do fotossensibilizador e o acúmulo máximo seletivo deste nas células alvos. Na busca de se sanar esses inconvenientes, o sistema transportador de fotossensibilizadores têm recebido especial atenção devido aos resultados que mostra melhorias na seletividade e eficiência da TFD, bem como redução

de efeitos colaterais como hipersensibilidade da pele. Novos fotossensibilizadores, os de segunda geração, vêm sendo desenvolvidos e estudados no intuito de resolver também esses problemas. [Ivanov *et al.*, 2000; Konan *et al.*, 2002; Nishiyama *et al.*, 2006].

II. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo investigar as alterações espectrais do Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®], que são fotossensibilizadores de primeira geração derivados de hematoporfirinas; pela interação com lipossomas do tipo DMPC e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) humana. Essas interações são analisadas pela influência de diferentes pHs e concentrações de DMPC e de LDL. Para isso utilizam-se técnicas espectroscópicas de absorção na região espectral UV e visível, bem como de emissão de fluorescência.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Fotossensibilizadores

O Photofrin[®], o Photogem[®] e o Photosan[®] foram obtidos através de importação pelo laboratório de Biofotônica do Grupo de ótica sob supervisão do Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato do Instituto de Física de São Carlos-USP. Foram preparadas soluções estoque de 5 mg.mL⁻¹ dos fotossensibilizadores em tampão composto por acetato, fosfato e borato, ajustado nos pHs 5,0; 7,4 e 9,0.

3.1.2. Lipossomos de DMPC

- ✓ Dimiristoil L- α -fosfatidilcolina (DMPC), Sigma;
- ✓ Clorofórmio, Merck;
- ✓ Tubos de ensaio de 5mL;
- ✓ Gás N₂, White Martins;
- ✓ Tampão acetato/fosfato/borato de concentração 30 μ M;
- ✓ Agitador vórtex;
- ✓ Extrusor com membrana e filtros de 100 μ m.

3.1.3. Lipoproteína de Baixa Densidade (LDL) humana

- ✓ Plasma humano de sangue recém-coletado;
- ✓ Tubos de ultracentrífuga Beckman ultraclear;

- ✓ Membrana de diálise (21 mm), Espectrafor;

3.1.4. Equipamentos

- ✓ pHmetro, Digimed modelo DM-20;
- ✓ Ultracentrífoga, Beckman modelo L-80;
- ✓ Rotor SW41 Ti;
- ✓ Espectrofotômetro UV-vis, Hitachi modelo U-2800;
- ✓ Espectrofotômetro UV-vis-NIR, Varian modelo Cary 5G;
- ✓ Espectrofluorímetro, Hitachi modelo F-2500.

3.2. Métodos

3.2.1. Análise Espectroscópica do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®]

A metodologia empregada neste trabalho constitui-se da análise dos espectros de absorção e de fluorescência do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®] em diferentes condições.

3.2.1.1. Medidas de Absorção Ótica

As medidas foram efetuadas nos Espectrofotômetro UV-vis, Hitachi modelo U-2800 e Espectrofotômetro UV-vis-NIR, Varian modelo Cary 5G. Utilizou-se para as medidas, cubeta de quartzo com as quatro faces polidas e com caminho ótico de 1,0 e 0,5. Os espectros foram monitorados na faixa de 250-800nm.

3.2.1.2. Medidas de Emissão de Fluorescência

As medidas foram efetuadas no Espectrofluorímetro, Hitachi modelo F-2500. Os parâmetros utilizados: (i) Ganho da fotomultiplicadora de 700W; (ii) Fenda de excitação de 5.0; (iii) Fenda de emissão de 10.0; (iv) Velocidade de varredura de 300nm/min; (v) Comprimento de onda de excitação de 507nm para o Photofrin[®], de 501nm para o Photogem[®] e de 504nm para o Photosan[®]; e (vi) Emissão foi detectada na faixa de 530 a 730nm

3.2.1.3. Preparo das soluções do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®] para a Análise Espectroscópica

Para a análise do perfil dos espectros de absorção e de emissão do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®] utilizou-se soluções de concentração 10 µg.mL⁻¹ preparadas em tampão acetato/fosfato/borato em pH 7,4. No espectro de absorção determinou as bandas características de cada fotossensibilizador, banda de Soret e as quatro bandas Q, e o comprimento de onda de excitação utilizado para obtenção dos espectros de emissão. Nos espectros de emissão de fluorescência obtiveram-se duas bandas para cada fotossensibilizador.

3.2.2. Estudo da Agregação do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®]

Para investigar a agregação dos fotossensibilizadores e determinar em qual concentração estes obedecem a Lei de Lambert-Beer, ou seja, conserva a linearidade da absorbância em função da concentração, preparou-se soluções de Photofrin[®],

Photogem[®] e Photosan[®] nas concentrações de 0,5 a 20,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em tampão composto por acetato, fosfato e borato (30 mM) Mediu-se a absorbância de cada concentração dos fotossensibilizadores na região de 250 a 800nm. Analisando os valores experimentais, obtiveram-se gráficos de absorbância em função da concentração dos fotossensibilizadores para verificar a que concentrações estes perdem a linearidade, o que implica possível agregação.

3.2.3. Estudo do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®] em diferentes pH

Utilizou-se para esse estudo soluções de Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®] 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ em tampão composto por acetato, fosfato e borato (30 mM) com os pHs variando entre 6 e 10.

3.2.4. Estudo da interação do Photofrin[®], Photogem[®], Photosan[®] com DMPC

Para a preparação das vesículas lipossomais, 2mg de fosfolipídios do tipo dimeristoil fosfatidilcolina (DMPC) foram solubilizados em 1mL de clorofórmio, em tubo de ensaio. Esta solução foi seca utilizando-se jato nitrogênio gasoso sob rotação lenta do tubo de ensaio e, posteriormente, colocada em dessecador à vácuo durante duas horas. Com este procedimento obteve-se um filme seco de lipídio. Em seguida, este filme foi hidratado com 1 mL de solução tampão acetato/fosfato/boratos pHs 5,0;7,4 e 9,0 sob agitação vigorosa com vórtex. A suspensão foi então colocada em banho de ultra-som por 30 minutos para diminuir o tamanho das vesículas lipossomais. Para uniformizar esse tamanho foi realizada uma extrusão numa extrusora Avanti Polar Lipids, Inc. com membrana e filtros contendo poros de 100 μm .

Estando prontas as vesículas lipossomais, preparou-se soluções de contendo Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®] na concentração de 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ e com concentrações de DMPC variando de 0 a 400 μM , em tampão acetato/fosfato/borato nos pH 5,0; 7,4 e 9,0. Realizaram-se as medidas espectroscópicas dessas soluções após 30 minutos de incubação no escuro.

3.2.5. Estudo da interação do Photofrin[®], Photogem[®], Photosan[®] com LDL

As lipoproteínas foram isoladas do plasma humano por ultracentrifugação de gradiente de densidade (Figura 3.1). Primeiramente, separou-se o plasma do sangue recém-coletado por centrifugação a 16800 g por 15 minutos. Em seis tubos de centrífuga adicionaram-se 3,0 mL de plasma ajustando-se a densidade para 1,210 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pela adição de 0,612 g de KBr em cada tubo. Em seguida, preparou-se o gradiente de densidade em cada tubo adicionando-se 3,0; 3,0 e 2,5 mL de soluções de KBr de densidades 1,006; 1,020 e 1,065 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, previamente preparadas, em ordem decrescente de densidade. Centrifugou-se a 147000 g por 24 horas a 4,0 °C. Removeram-se então, dos seis tubos frações de um em um mililitros. Para determinar qual lipoproteína está presente em cada fração, realizou-se medidas de refração. A LDL se encontra na fração com densidade de 1,020 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [Malesys *et al.*, 1995]. Determinou-se a concentração de LDL obtida por absorvância ($\epsilon_{234\text{nm}} = 29500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

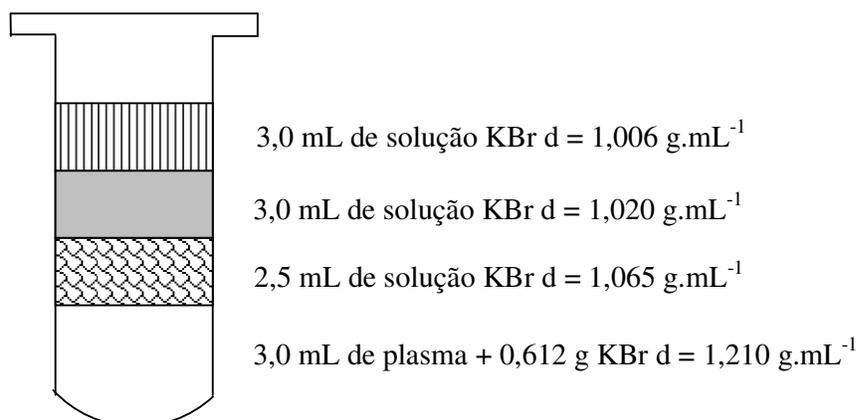


Figura 3.1: Separação de amostras centrifugadas por 24 horas a $4,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e 147000 g .

Com a LDL isolada, devido a alta concentração de sal da solução, dializou-se esta contra o tampão acetato/fosfato/borato $30 \text{ } \mu\text{M}$, efetuando troca de tampão a cada 2 hs. O termino da dialize foi determinado por medida de condutância da solução. Em seguida, preparou-se soluções de Photofrin[®], Photogem[®], Photosan[®] na concentração de $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e com concentrações de LDL variando de 0 a $0,04 \text{ } \mu\text{M}$, em tampão acetato/fosfato/borato nos pHs 5,0; 7,4 e 9,0. Essas soluções foram incubadas por 12 hs no escuro antes de serem realizadas as medidas espectroscópicas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Análise Espectroscópica do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®]

Os espectros de absorção de porfirinas e seus derivados é a característica mais comum e importante, e está correlacionado com muitas propriedades físico-químicas. As porfirinas apresentam uma forte deslocalização de elétrons π , a qual é responsável pelo caráter aromático do núcleo porfirínico, resultando numa pequena diferença de energia entre o HOMO (orbital preenchido de maior energia) e LUMO (orbital vazio de menor energia), e, conseqüentemente, no aumento das densidades das bandas de absorção na região do visível e do ultravioleta. As bandas do visível, em geral, são oriundas de transições $\pi-\pi^*$ e transições $n-\pi^*$, no caso de porfirinas substituídas com grupos carbonílicos. Os derivados de hematoporfirinas, por serem porfirinas não metaladas, apresentam uma banda mais intensa designada como banda de Soret e quatro bandas de menor intensidade, chamadas de bandas Q. A primeira banda Q de maior energia identificada como banda IV, a segunda como III, a terceira como II e a última, de menor energia, como I [Kalyanasundaram, 1992]. Esta situação ocorre pH superiores ao pK dos nitrogênios pirrólicos. Para pH inferiores a este pK, há um aumento da simetria do anel porfirínico, resultando em apenas duas bandas Q, uma envolvendo níveis vibracionais fundamentais dos orbitais π e π^* (transição de menor energia) e a outra seria uma transição vibrônica envolvendo o nível vibracional $v=1$ do estado eletrônico π^* .

Os espectros de absorção dos derivados de hematoporfirina, Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®], na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução tampão composta por acetato, fosfato e borato (doravante será denominado tampão acetato/fosfato/borato)

30 mM pH 7,4, estão apresentados na Figura 4.1. Estes apresentam o máximo de absorção das bandas com valores muito próximos. O máximo de absorção da banda de Soret para o Photofrin[®] (Figura 4.1 a) e o Photogem[®] (Figura 4.1 b) ocorre em 368 nm e para o Photosan[®] (Figura 4.1 c) em 362 nm. As quatro bandas Q apresentam máximos de absorção em 507, 540, 570 e 620nm, 501, 534, 563 e 615nm e 504, 537, 565 e 615nm, para o Photofrin[®], Photogem[®], Photosan[®], respectivamente.

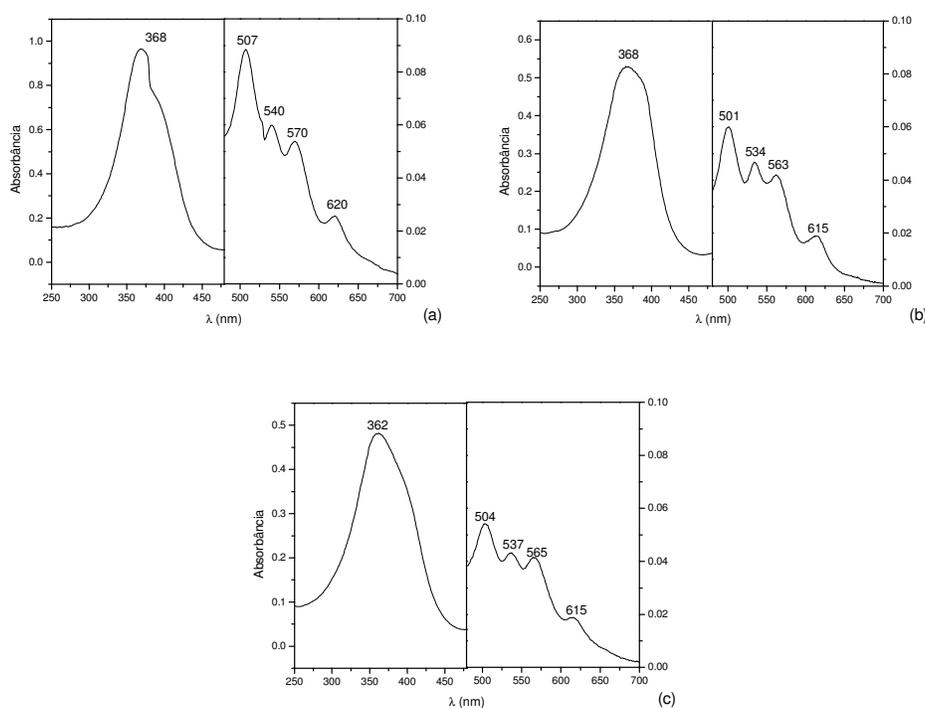


Figura 4.1: Espectros de absorção na região do UV-vis de soluções $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos fotossensibilizadores em tampão acetato/fosfato /borato 30mM, em pH 7,4: (a) Photofrin[®] (Espectrofotômetro UV-Vis U-2800 Hitachi) (b) Photogem[®] e (c) Photosan[®] (Espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5G Varian).

O comprimento de onda de excitação para a obtenção do espectro de emissão de fluorescência dos fotossensibilizadores foi previamente determinado através do espectro de absorção e confirmado através dos espectros de excitação. Os fotossensibilizadores podem ser excitados em comprimento de onda onde apresentam bandas de absorbância. Entretanto, na concentração estudada, o comprimento de excitação escolhido para cada fotossensibilizador foi o referente à primeira banda Q, pois nesse comprimento de onda a absorbância da solução é menor do que 0,1, minimizando-se assim o efeito filtro.

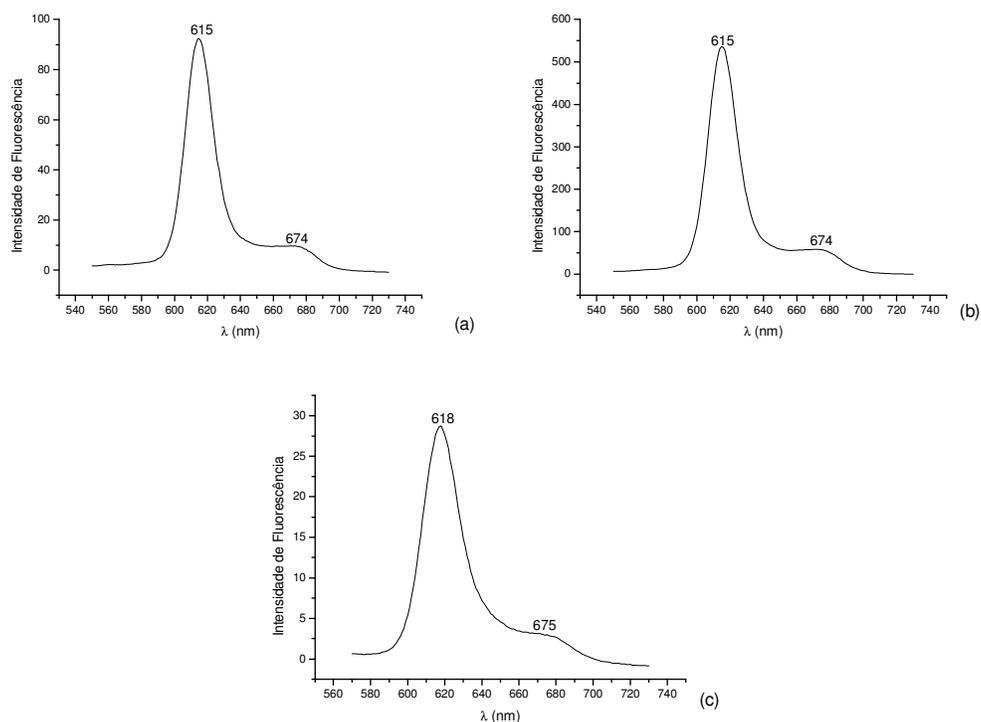


Figura 4.2: Espectros de emissão de fluorescência de soluções $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos fotossensibilizadores em tampão acetato/fosfato /borato 30 mM, em pH 7,4: **(a)** Photofrin® ($\lambda_{\text{ex}} = 507\text{nm}$), **(b)** Photogem® ($\lambda_{\text{ex}} = 501\text{nm}$) e **(c)** Photosan® ($\lambda_{\text{ex}} = 504\text{nm}$).

Os espectros de emissão de fluorescência dos fotossensibilizadores têm perfis bastante semelhantes, e apresentam duas bandas característica, sendo uma de maior

intensidade em 615nm para o Photofrin[®] (Figura 4.2 a) e Photogem[®] (Figura 4.2 b) e com um pequeno deslocamento para 618nm para o Photosan[®] (Figura 4.2 c), e outra de menor intensidade em 674 e 675nm, respectivamente, como apresentado nas Figura 4.2a, 4.2b e 4.2c.

4.2. Estudo da Agregação do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®]

A agregação tende a diminuir o potencial terapêutico dos fotossensibilizadores [Margalit, 1984]. Isso acontece devido à diminuição do tempo de meia-vida dos estados excitados siglete e triplete do fotossensibilizador, levando a redução do rendimento quântico da excitação do oxigênio molecular ao oxigênio siglete e, portanto, diminuição da eficiência fotodinâmica dos sensibilizadores [Daziano *et al.*, 1996; Crouch *et al.*,1990].

Para investigar a ocorrência de agregação, obteve-se os espectros óticos (Figura 4.3) de soluções contendo diferentes concentrações de Photofrin[®], Photogem[®] ou Photosan[®], preparadas em tampão fosfato/acetato/borato 30mM pH 7,4. A faixa de concentração estudada foi de 0,5 – 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

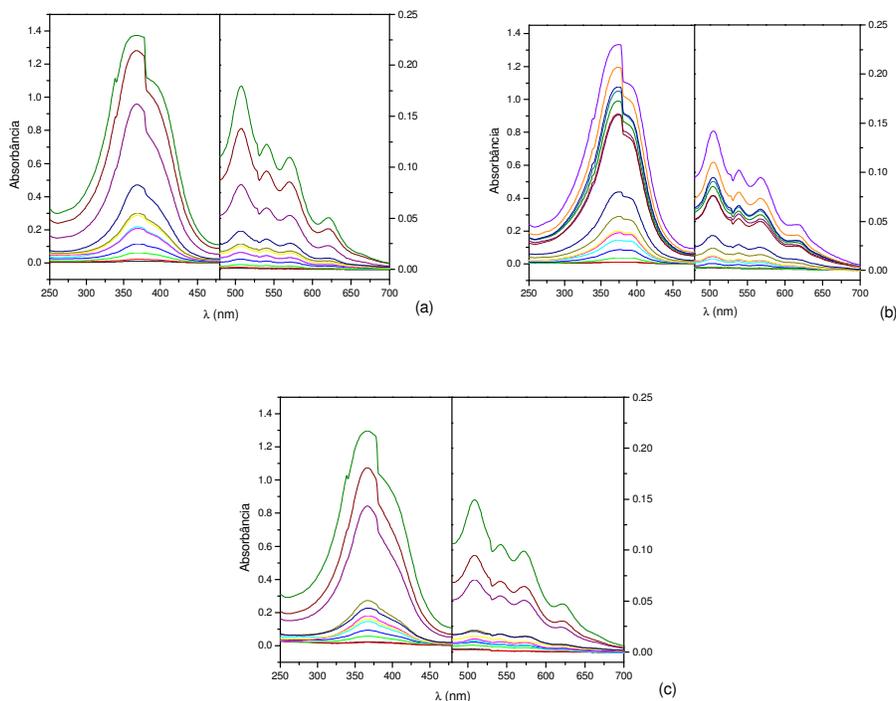


Figura 4.3: Espectros de absorvância dos fotossensibilizadores em diferentes concentrações ($0,5 - 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em solução tampão acetato/fosfato/borato 30mM pH 7,4: **(a)** Photofrin[®], **(b)** Photogem[®] e **(c)** Photosan[®].

Na Figura 4.4 está apresentada a relação entre os valores de absorvância na banda de Soret em função da concentração dos fotossensibilizadores. Pode se verificar nos gráficos, que até a concentração de aproximadamente $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ temos a linearidade do gráfico a para os três fotossensibilizadores, estando de acordo com a lei de Lambert-Beer. Acima dessa concentração temos o desvio dessa linearidade, que é indício de que os fotossensibilizadores estão em formas agregadas distintas. Mais adiante serão apresentadas evidências que caracterizam os espectros de formas desagregadas através dos experimentos de interação dos fotossensibilizadores com lipossomos e lipoproteínas, os quais apresentam regiões hidrofóbicas. Pode-se adiantar que os espectros observados a pH 7, mesmo em soluções diluídas (abaixo de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$), são de derivados de hematoporfirinas agregados. Desta forma a região linear ($0-3 \mu\text{g mL}^{-1}$)

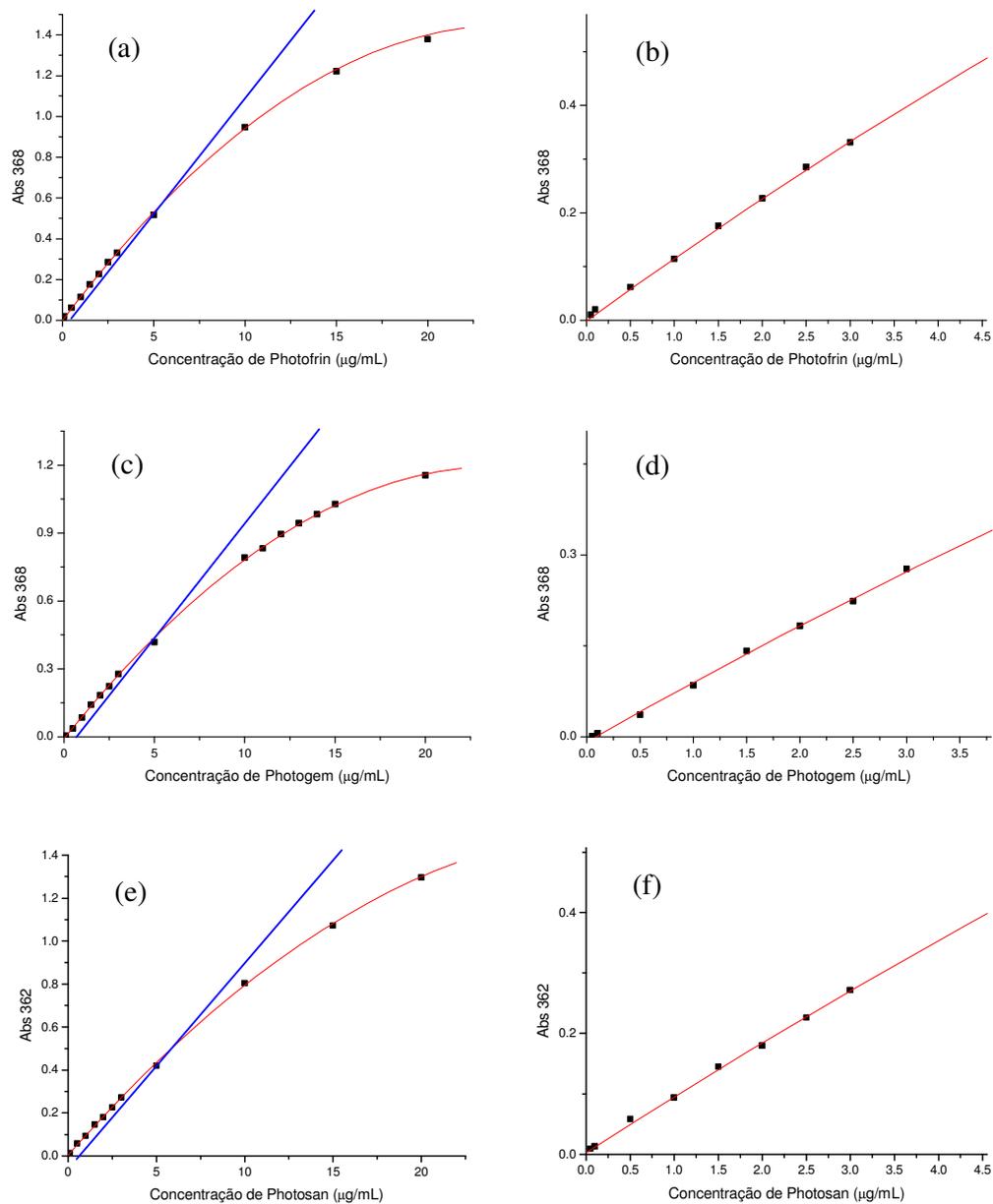


Figura 4.4: Gráficos de absorbância da banda de Soret versus concentração dos fotossensibilizadores: Photofrin[®] (a) toda a faixa de concentração e (b) ampliação até a concentração de $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Photogem[®] (c) toda a faixa de concentração e (d) ampliação até a concentração de $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Photosan.(e) toda a faixa de concentração e (f) ampliação até a concentração de $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

poderá ser interpretadas como os fotossensibilizadores estejam como dímeros e trímeros, que não estão ocasionando desvios de linearidade, pois o método espectroscópico de absorção não é sensível o suficiente para identificar a formação destes agregados menores. Enquanto que, passando dessa faixa de concentração, tem-se a perda da linearidade pela formação de agregados maiores [Margalit *et al.*, 1984].

4.3. Estudo do Photofrin[®], Photogem[®], e do Photosan[®] em diferentes pH

Estudos têm relatado a acumulação preferencial dos fotossensibilizadores nos tecidos tumorais. Entretanto, o mecanismo com que isso acontece ainda não está totalmente esclarecido. Vários fatores possíveis estão sendo sugeridos, incluindo a especificidade celular e a característica extracelular do tumor. A maior diferença entre o tecido tumoral e o tecido normal são a exigência nutricional e metabolismo dessas células. O oxigênio para suprir o rápido crescimento das células tumorais é geralmente insuficiente. Assim a glicose é em parte usada via metabolismo anaeróbico, o que leva a formação de ácido láctico. O excesso de ácido láctico produzido pela célula é transportado para o meio extracelular. Conseqüentemente, o pH do fluído intersticial dos tecidos tumorais é mais baixo quando comparado ao do tecido normal. Essa pequena mudança do pH extracelular pode levar a mudança do equilíbrio entre as várias espécies iônicas do fotossensibilizador. A protonação de vários fotossensibilizadores está correlacionada com o aumento da lipofilicidade dos mesmos, o que leva ao aumento de sua difusão pela membrana celular e, portanto, aumento de sua concentração no interior da célula. [Cunderlíková *et al.*, 1999 e 2000; Braut *et al.*, 1990].

Desta forma a pesquisa das espécies que são predominantes em diferentes valores de pH é de grande interesse, pois possibilita elucidar seu papel na retenção seletiva dos fotossensibilizadores pelas células tumorais [Mojzisova *et al.*, 2007].

Os derivados de hemotopofirina possuem grupos susceptíveis ao equilíbrio de protonação \rightleftharpoons desprotonação em sua estrutura, que levam a mudança da carga líquida da molécula. Esta relação é devida ao estado de protonação dos nitrogênios imino (-N=) e pirrólico (-N-) do núcleo tetrapirrólico. No caso dos derivados da hemotopofirinas os grupos carboxílicos ligados ao anel central serão grupos relevantes, desde que não estejam comprometidos na formação dos derivados de hemotopofirinas. O equilíbrio ácido-base poderá levar à formação de diferentes espécies com diferentes cargas em função do pH apresentado diferentes propriedades físico-químicas e que poderão coexistir simultaneamente na solução [Cunderlíková *et al.*, 1999].

A análise das diferentes espécies iônicas pode ser descrita na curva de titulação modelo da Figura 4.5.

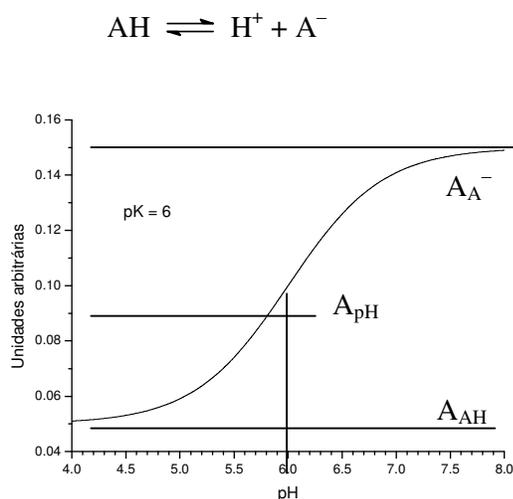


Figura 4.5: Modelo de curva de titulação ácido-base.

A curva de titulação modelo tem o comportamento da equação 1. A partir dessa equação é possível obter o valor de pKa para o sistema de protonação/desprotonação de moléculas com estruturas porfirínicas.

$$A_{\text{pH}} = A_{\text{AH}} + \Delta A_{\text{máx}} \frac{10^{-\text{pK}}}{10^{-\text{pH}} + 10^{-\text{pK}}} \quad (1)$$

onde, A_{pH} é o valor da absorvância da solução em um determinado valor de pH, A_{AH} é a absorvância da espécie protonada e $\Delta A_{\text{máx}} = A_{\text{A}^-} - A_{\text{AH}}$, sendo A_{A^-} a absorvância da espécie desprotonada e $\text{pK} = -\log K$. Ao assumir-se mais de um grupo ácido, basta considerar que o A_{AH} é a absorvância da molécula com todos os grupos protonados na faixa de pH analisada e para cada grupo ácido adiciona-se parcelas similares à segunda da equação (1). Ao se empregar outro tipo de técnica espectroscópica (ex. fluorescência), no qual a intensidade do seu sinal seja proporcional às concentrações de cada espécie em equilíbrio, empregaram-se equações similares.

Nesse trabalho realizou-se estudo espectroscópico por absorção e emissão de fluorescência das soluções de Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®] concentração 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em tampão acetato/fosfato/borato variando o pH na faixa de 6 a 8. O estudo foi realizado nesta faixa, pois é uma faixa de pH importante para sistemas biológicos.

A Figura 4.5 apresenta os espectros de absorção do Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®], onde é possível observar um aumento considerável na absorvância conforme se aumenta o pH. Isso acontece porque em soluções ácidas existe o predomínio de espécies

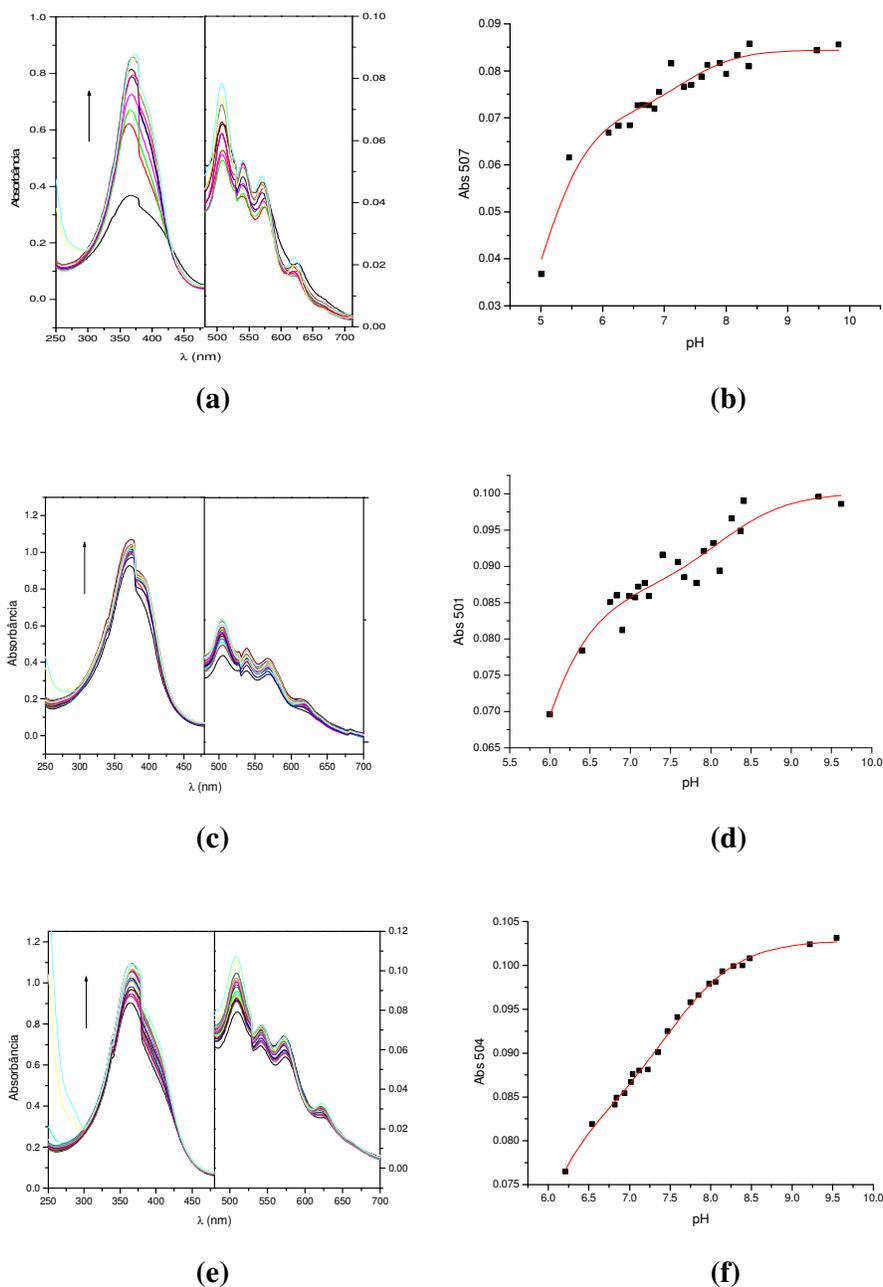


Figura 4.5: Espectros de absorção no UV-Vis dos fotossensibilizadores na concentração $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM variando o pH na faixa de 6 a 8: (a) Photofrin[®], (c) Photogem[®] e (e) Photosan[®]. Alteração da intensidade de absorção na banda Q de maior energia com o aumento do pH: (b) Photofrin[®], (d) Photogem[®] e (f) Photosan[®].

agregadas que levam a diminuição da absorção. O aumento da agregação é devido ao equilíbrio ácido-base que leva à formação de espécies de caráter neutro mais susceptíveis à agregação facilitada também pela estrutura planar dos anéis porfínicos. Com o aumento do pH foi observada uma diminuição gradativa da agregação. Não foi observada nenhuma mudança no perfil dos espectros além das mudanças de intensidade de absorção.

Nas Figuras 4.5 b, c e d é mostrado a alteração da intensidade de absorção na banda Q de maior energia com o aumento do pH. Podemos observar que existe um salto na faixa de pH de 5-6.5, onde temos a maior desagregação. Após esse valor a desagregação é mais gradativa, porém não foi possível chegar à máxima desagregação nessa faixa de pH.

Nos espectros de fluorescência (Figura 4.6), pode-se observar para todos fotossensibilizadores o comportamento similar ao observado pelos espectros de absorção. Aumento da intensidade de fluorescência com o aumento do pH. No caso do Photofrin[®] (Figura 4.6 a) e do Photosan[®] (Figura 4.6 e), ainda se observa um pequeno deslocamento para comprimentos de onda maiores, de 3 e 2 nm, respectivamente. Esse comportamento é atribuído à formação de espécies de caráter mais hidrofóbico em valores de pH baixos, e a desagregação progressiva com o aumento do pH, que pode ser observado também nas Figuras 4.6 b e f, que representa a intensidade máxima de fluorescência em função do pH.

Os espectros tanto de absorção quanto de emissão indicam modificação das moléculas. Para a melhor análise dos dados foram precisos considerar-se dois valores de pK (Tabela 4.1). Um dos valores de pK, 4,9 para o Photofrin[®], 5,4 para o Photogem[®] e 5,1 para o Photosan[®] é compatível a grupos carboxílicos [Mojzisova *et al*, 2007]. A

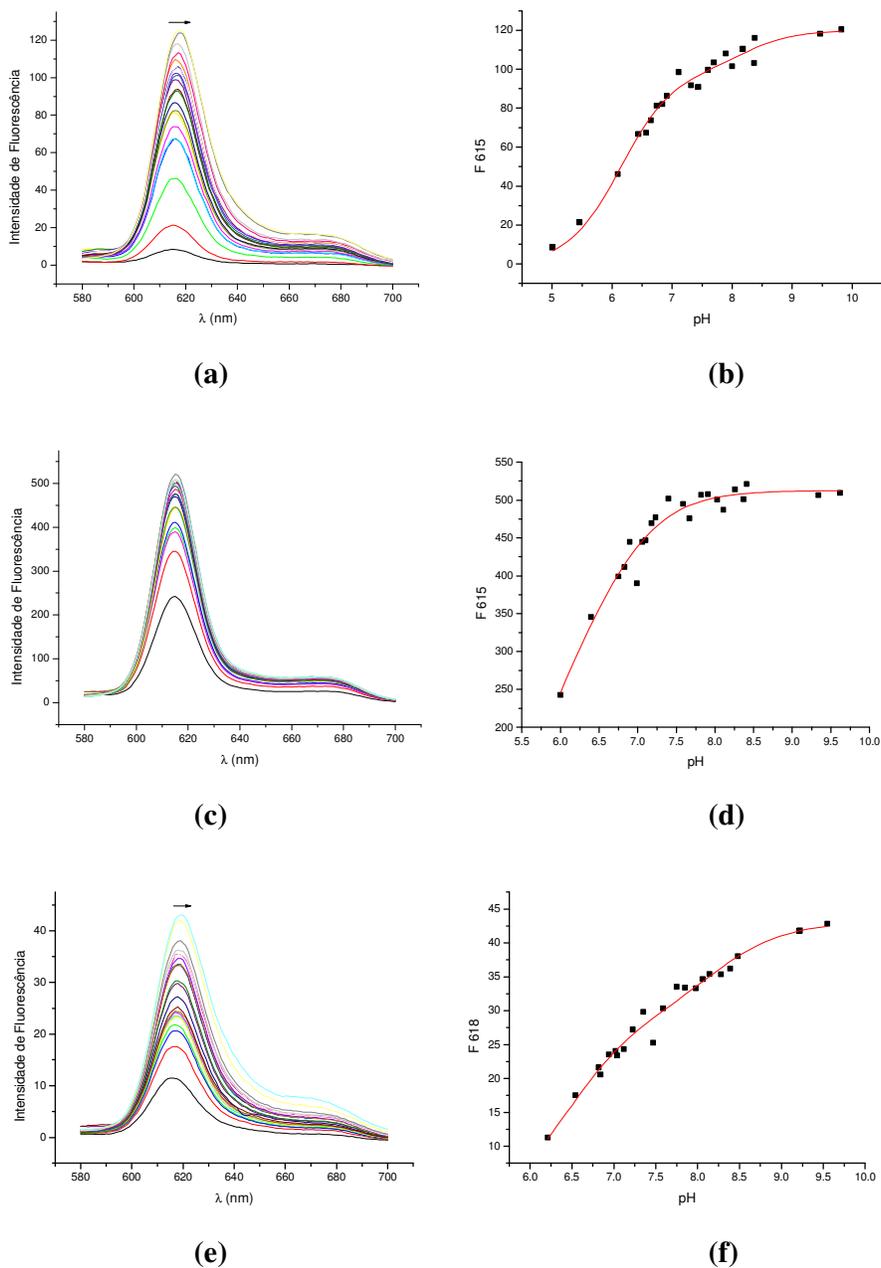


Figura 4.6: Espectroscopia de emissão de fluorescência no UV-Vis dos fotossensibilizadores na concentração $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM variando o pH na faixa de 6 a 8: (a) Photofrin[®] ($\lambda_{\text{ex}} = 507$), (c) Photogem[®] ($\lambda_{\text{ex}} = 501$) e (e) Photosan[®] ($\lambda_{\text{ex}} = 504$). Alteração do máximo de emissão de fluorescência com o aumento do pH: (b) Photofrin[®], (d) Photogem[®] e (f) Photosan[®].

necessidade do emprego de duas constantes pode significar que o fator predominante é o equilíbrio agregação/desagregação que ocorre de uma forma progressiva. A desprotonação dos grupos carboxílicos periféricos são inferidos de forma indireta através do equilíbrio de agregação pois os grupos funcionais não estão conjugados com o anel central.

Assumindo-se esta condição, as variações de posições e número de linhas dos espectros das hematoporfirinas seriam sensíveis ao equilíbrio de desprotonação do nitrogênio imino do anel porfirínico, mas relativamente insensíveis à protonação dos grupos carboxílicos periféricos. Finalmente, se os valores de pK foram muito próximos, a curva de titulação não pode revelar quantos pontos de inflexão existem para determinar os valores de pK [Cunderlíková *et al.*, 1999]. Uma evidência de que se trata do equilíbrio de desprotonação de grupos carboxílicos é que abaixo das curvas de titulação empregando-se a fluorescência é que há uma supressão intensa que significa a agregação. Apesar de se ter na literatura de que os hidrogênios ligados aos nitrogênios imino e pirrólico do anel porfirínico tem valores de pK 4,7 e 2,9, respectivamente [Brault *et al.*, 1990], tanto a desprotonação dos grupos imínicos bem como a protonação dos nitrogênios pirrólicos aumentariam a simetria do anel o que mudaria o padrão de quatro linhas das bandas Q para um padrão de duas linhas. De qualquer forma a protonação do grupo pirrólico não seria observada na faixa de pH estudada. Por outro lado um deslocamento hipsocrômico da banda de Soret (para comprimentos de onda menores) com a acidificação é uma evidência da formação de agregados do tipo face-a-face que seria favorável somente se a carga líquida fosse neutra. Se for assumido que o pK obtido tivesse relação com o hidrogênio imínico, acima do pK teríamos que ter, além do deslocamento batocrômico da banda de Soret (para comprimentos de onda

maiores) com a alcalinização, seria observado a transformação da banda Q para um conjunto de duas bandas. Assim, torna-se mais viável considerar que a agregação em pH abaixo do pK deve-se à neutralização da carga negativa do propionato sem afetar a carga do anel. Qualquer alteração de carga adicional ocorre com a protonação dos nitrogênios pirrólicos, resultando em uma carga positiva no anel porfínico.

Tabela 4.1: Valores de pK para os fotossensibilizadores calculados a partir do comportamento da banda Q de maior energia e do máximo de emissão de fluorescência ambos pelo pH.

Sensibilizador	UV-vis		Emissão de Fluorescência	
	pK ₁	pK ₂	pK ₁	pK ₂
Photofrin [®]	4,9	7,3	6,0	8,0
Photogem [®]	5,4	8,0	5,7	6,6
Photosan [®]	5,1	7,5	6,4	8,0

4.4. Estudo da interação do Photofrin[®], Photogem[®], Photosan[®] com DMPC

A literatura mostra um aumento considerável no potencial terapêutico de alguns fotossensibilizadores quando são encapsulados em lipossomas. Isso se deve, em parte, a uma diminuição da agregação do fotossensibilizador, da melhor penetração nas células tumorais, e principalmente, da redistribuição do fotossensibilizador nas proteínas plasmáticas, como a albumina e as lipoproteínas [Bourré *et al*, 2003; Frolov *et al*, 1990; Derycke *et a*, 2004] sem a interação com as membranas se o transporte intravenoso ocorresse de forma livre. Sendo assim, neste trabalho, estudou-se a interação do Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®] em concentração de 10µg mL⁻¹ em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM, em pH 5,0; 7,4 e 9,0, com diferentes concentrações de

DMPC. Os valores de pH foram escolhidos considerando-se a presença de espécies protonadas, pH 5,0, e desprotonadas, pH 9,0 e o pH 7,4 como simulando as condições homeostáticas de pH.

Nos resultados de absorção e emissão de fluorescência (Figura 4.7) do Photofrin[®] observa-se que com o aumento da concentração de DMPC leva a um aumento da intensidade de absorção e emissão do fotossensibilizador. Na absorção, para pH 5,0 (Figura 4.7 a) nota-se os deslocamentos hipsocrômicos (para o vermelho) de 37 nm da banda de Soret, de 3 nm da QII e de 5 nm da banda QI. Para as bandas QIV e QIII existe o deslocamento batocrômico (para o azul) de 3 nm. Alterando-se o valor de pH para 7,4 (Figura 4.7 c) a banda de Soret desloca de 11 nm, enquanto que as bandas QIV e QIII deslocam de 3 nm, todas para o vermelho. Nesse pH as bandas QII e QI tem um deslocamento para o azul de 3 nm. Aumentando-se para pH 9,0 (Figura 4.7 e) os deslocamentos hipsocrômicos são de 37 nm para a banda de Soret; de 4 nm para as bandas QIV e QIII. O deslocamento batocrômico de 1 nm para as bandas QII e QI foram observadas. Na emissão de fluorescência (Figura 4.7 b, d, f) pode se observar um deslocamento do máximo de emissão com o aumento da concentração de DMPC, nos diferentes pHs (5,0; 7,4 e 9,0). Nesses pHs ocorre o deslocamento de 615nm, sem adição de DMPC, para 630 nm com adição 50 μ M de DMPC. A partir dessa concentração de DMPC não se observa mais deslocamento, apenas aumento da intensidade de fluorescência. Nos diferentes pHs, 5,0; 7,4 e 9,0, como já foi discutido anteriormente, o Phtotofrin[®] encontra-se em diferentes estados de agregação.

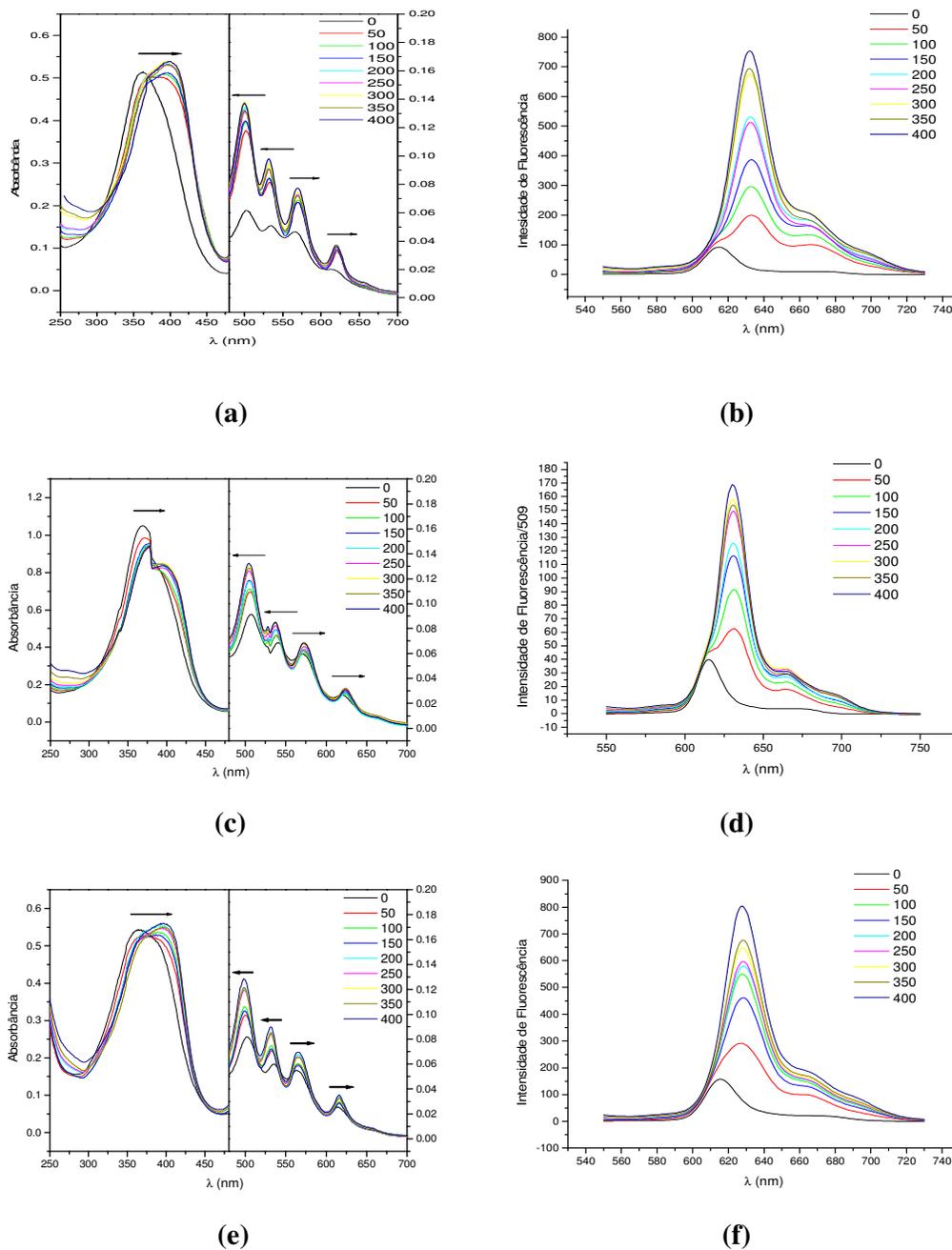


Figura 4.7: Espectros de absorção e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 507\text{nm}$) da solução de Photofrin[®] ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM em relação a concentração de DMPC. (a) e (b) pH 5,0; (c) e (d) pH 7,4; (e) e (f) pH 9,0.

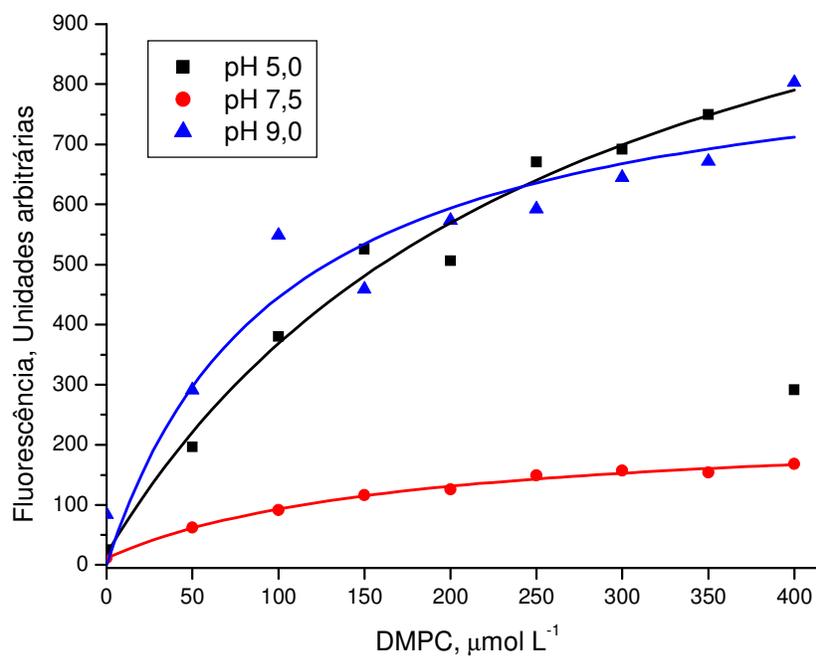


Figura 4.7g: Intensidades máximas da emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 507\text{nm}$) da solução de Photofrin[®] ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) ligado ao DMPC em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM em função da concentração de DMPC em pH 5,0, 7,4 e 9,0, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 4.8, em meio ácido (pH 5,0), onde o fotossensibilizador está mais agregado do que em relação a pH maiores (7,4; 9,0), a adição de pequenas quantidades de DMPC causa um maior deslocamento no equilíbrio agregação/desagregação pela difusão de grande quantidade de fotossensibilizador para a fase lipídica, desagregando-o. Isso faz com que mude drasticamente a intensidade de absorção. No entanto, a partir de dada concentração do lipossoma a intensidade de absorção e de emissão tende a crescer mais lentamente até ser quase constante, levando a crer que grande parte do fotossensibilizador, presente no meio aquoso, interagiu com os lipossomos. Conforme se aumenta o pH, como o fotossensibilizador já se encontra no meio aquoso menos agregado, a difusão para a meio lipídico acontece mais eficientemente. A análise dos dados no máximo da intensidade de fluorescência no comprimento de onda correspondente à forma ligada ao DMPC (Figura 4.7g), obteve-se uma constante de interação do Photofrin[®] ao DMPC de 0,0041 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 5,0, 0,0071 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 7,4 e 0,0100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 9,0, respectivamente corroborando a tendência citada. Neste caso foi considerada uma única constante, portanto um comportamento hiperbólico da concentração do derivado de hematoporfirina ligado em função da concentração do fosfolípido. Entretanto, é conveniente ressaltar-se que, em condições da existência de agregados, a constante obtida apresenta a influência da(s) constante(s) de dissociação. Assim, somente em pH 9,0 teremos uma constante típica de interação.

Nos resultados de absorção e emissão do Photogem[®] (Figura 4.9) observa-se o mesmo comportamento discutido para o Photofrin[®], já que esses fotossensibilizadores são similares. O aumento da concentração de DMPC também leva a um aumento da intensidade de absorção e emissão do fotossensibilizador. Entretanto,

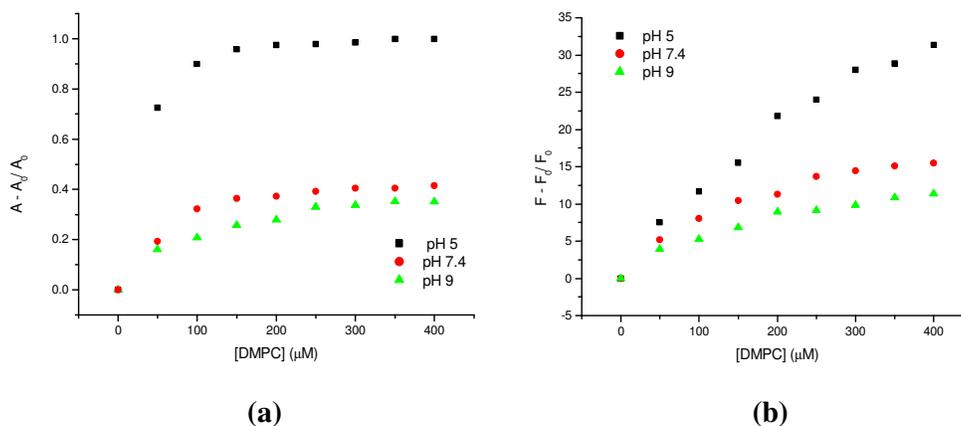


Figura 4.8: Resultados de absorvância (a) e emissão de fluorescência (b) da solução de Photofrin[®] (10 µg.mL⁻¹, tampão acetato/fosfato/borato 30 mM) pela variação da concentração de DMPC (µM) nos pHs de 5,0; 7,4 e 9,0.

nos resultados de absorção em pH 5,0 (Figura 4.9 a) têm-se um menor deslocamento hipsocrômico (para o vermelho) da banda de Soret de 27 nm. Para as bandas QIV e QIII existe um deslocamento batocrômico (para o azul) de 3 nm. Para as bandas QII e QI existe um deslocamento para o vermelho de 3 e 8 nm, respectivamente. No pH 7,4 (Figura 4.9 c) a banda de Soret desloca de 30 nm, enquanto que as bandas QII e QI deslocam de 4 nm, todas para o vermelho. Nesse pH as bandas QIV e QIII tem um deslocamento para o azul de 3 nm. Aumentando-se do pH para 9,0 (Figura 4.9 e) os deslocamentos hipsocrômicos são de 17 nm para a banda de Soret; de 6 nm para as bandas QII e QI. O deslocamento batocrômico de 8 nm para as bandas QII e QI foram observadas. Nos espectros de emissão nos diferentes pHs (Figura 4.9 b, d, f), observa-se um deslocamento do máximo de emissão de 615 nm para ~ 628 nm. Entretanto, o máximo de emissão só é deslocado com concentrações superiores a 150 µM de DMPC, independentemente do valor de pH estudado, indicando que a quantidade de sensibilizador transferido para o meio hidrofóbico só se torna significativo acima desta concentração de DMPC.

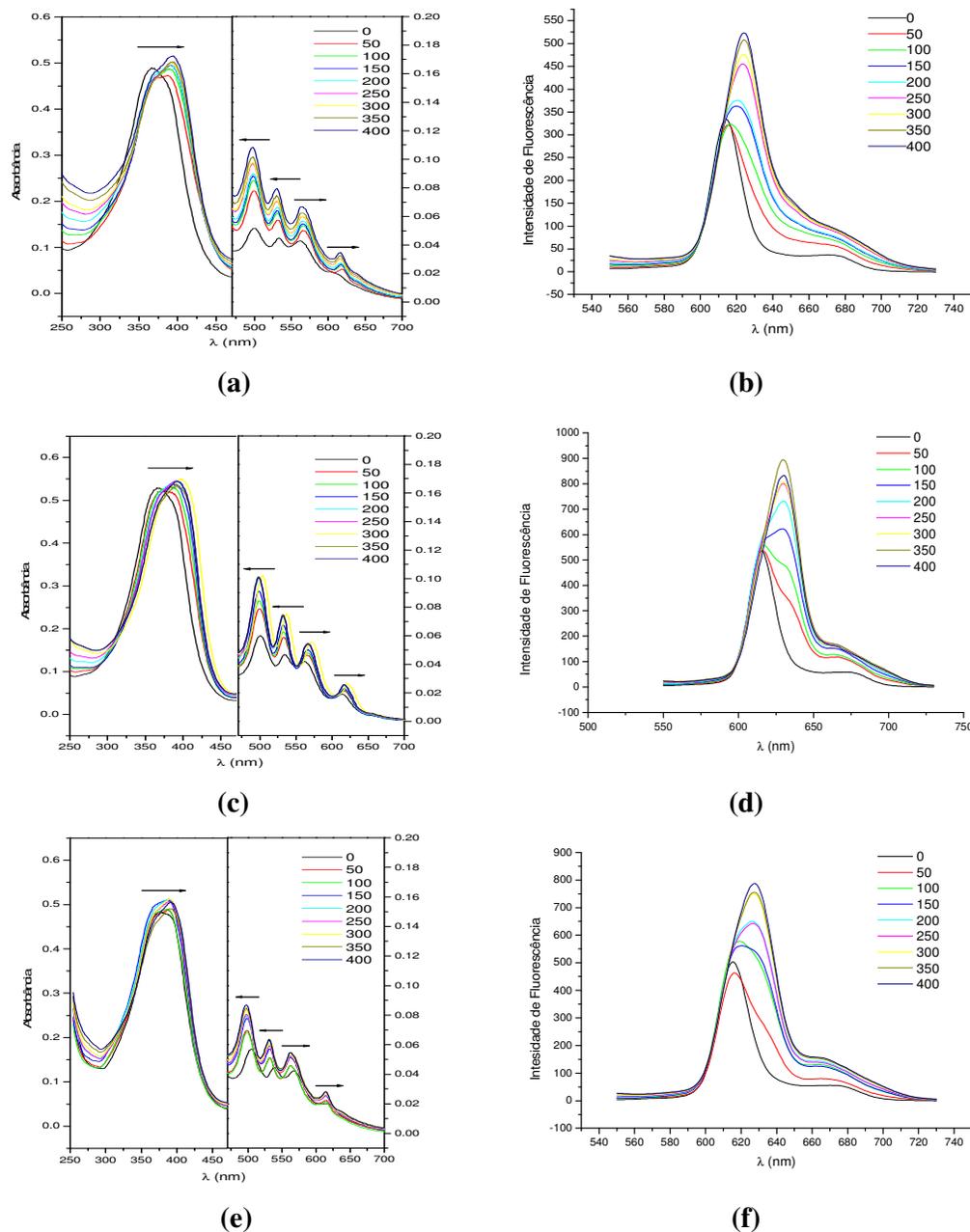


Figura 4.9: Espectros de absorção e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 501\text{nm}$) da solução de Photogem[®] ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão acetato/fosfato/borato em relação a concentração de DMPC. (a) e (b) pH 5,0; (c) e (d) pH 7,4; (e) e (f) pH 9,0.

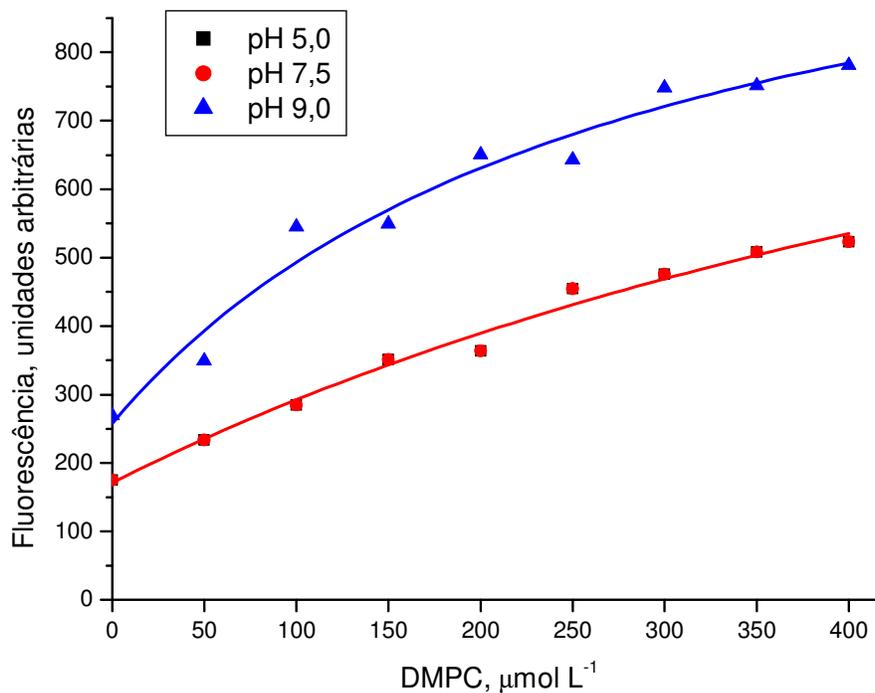


Figura 4.9g: Intensidades máximas da emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 501\text{nm}$) da solução de Photogem[®] ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) ligado ao fosfolípídeo em tampão acetato/fosfato/borato em função da concentração de DMPC em pH 5,0, 7,4 e 9,0, respectivamente.

Na Figura 4.10, onde estão apresentados o máximo de absorção da banda Q IV e máximo de emissão de fluorescência pela variação da concentração de DMPC nos diferentes pHs. Em pH 5 há um maior aumento da intensidade de absorção e emissão com relação ao outros pHs. Porém, existe uma menor diferença de intensidade de absorção e de fluorescência entre os pHs para Photogem[®] (Figura 4.10) em relação ao Photofrin[®] (Figura 4.8), indicando uma menor influencia do pH na interação do Photogem[®] com o DMPC. Similarmente ao observado com o Photofrin, houve um

aumento significativo na constante de interação do Photogem[®] com o DMPC com aumento de pH, de 0,0014 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 5,0 para 0,0046 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pH 9,0.

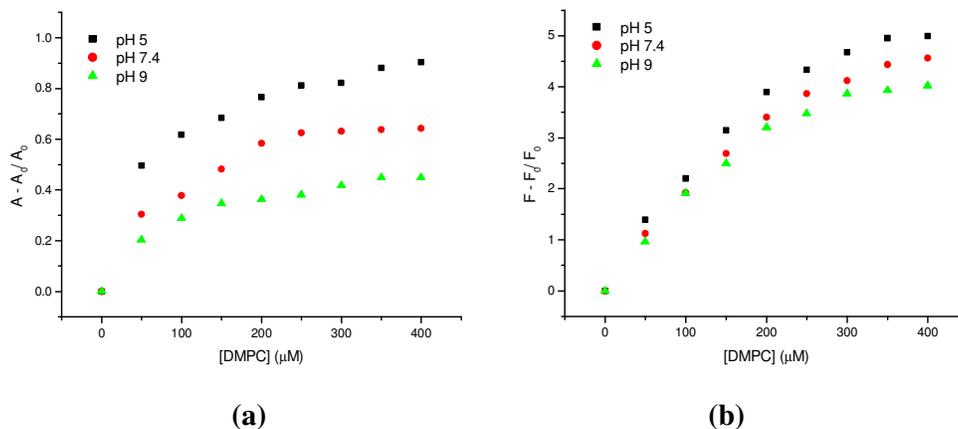


Figura 4.10: Resultados de absorvância (a) e emissão de fluorescência (b) da solução de Photogem[®] ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tampão acetato/fosfato/borato) pela variação da concentração de DMPC (μM) nos pHs de 5,0; 7,4 e 9,0.

Os espectros de absorção e emissão do Photosan[®] (Figura 4.11) mostram um comportamento análogo aos outros fotossensibilizadores, isto é, o aumento da concentração de DMPC leva ao aumento da intensidade de absorção e emissão do fotossensibilizador. Em pH 5,0 (Figura 4.11 a) têm-se deslocamentos para o vermelho de 45 nm da banda de Soret e de 2 e 4 nm para as bandas QII e QI, respectivamente. Para as bandas QIV e QIII existe um deslocamento para o azul de 2 e 4 nm. No pH 7,4 (Figura 4.11 c) a banda de Soret desloca de 69 nm, enquanto que as bandas QII e QI deslocam de 5 nm, todas para o vermelho. Nesse pH as bandas QIV e QIII tem um deslocamento para o azul de 4 nm. Na Figura 4.11e, resultado de absorvância do pH básico (9,0), os deslocamentos hipsocrômicos são de 33 nm para a banda de Soret; de 1

nm para as bandas QII e QI. O deslocamento batocrômico de 5 e 3 nm para as bandas QII e QI foram observadas. Os espectros de emissão de fluorescência para os diferentes pHs são apresentados na Figura 4.11 b, d, f Esses resultados mostram que existe um deslocamento do máximo de emissão de 618 nm, sem adição de DMPC, para 633 nm, com a adição de 50 μM de DMPC. Aumentando-se a concentração de DMPC não há mais deslocamento do máximo de emissão ocorrendo somente o aumento da intensidade de fluorescência. Nota-se que em pH 5,0 (Figura 4.11b) existe uma supressão pronunciada da amostra pura em fotossensibilizador. Em adições acima de 50 μM de DMCP ocorre o aumento evidenciado da intensidade fluorescência.

A Figura 4.12 mostra que existe um comportamento análogo entre o Photosan[®] e o Photofrin[®] (Figura 4.8). Observa-se que apesar das menores diferenças de intensidade de absorção em diferentes pHs os resultados de fluorescência mostram um maior aumento da intensidade de fluorescência para o pH 5,0.

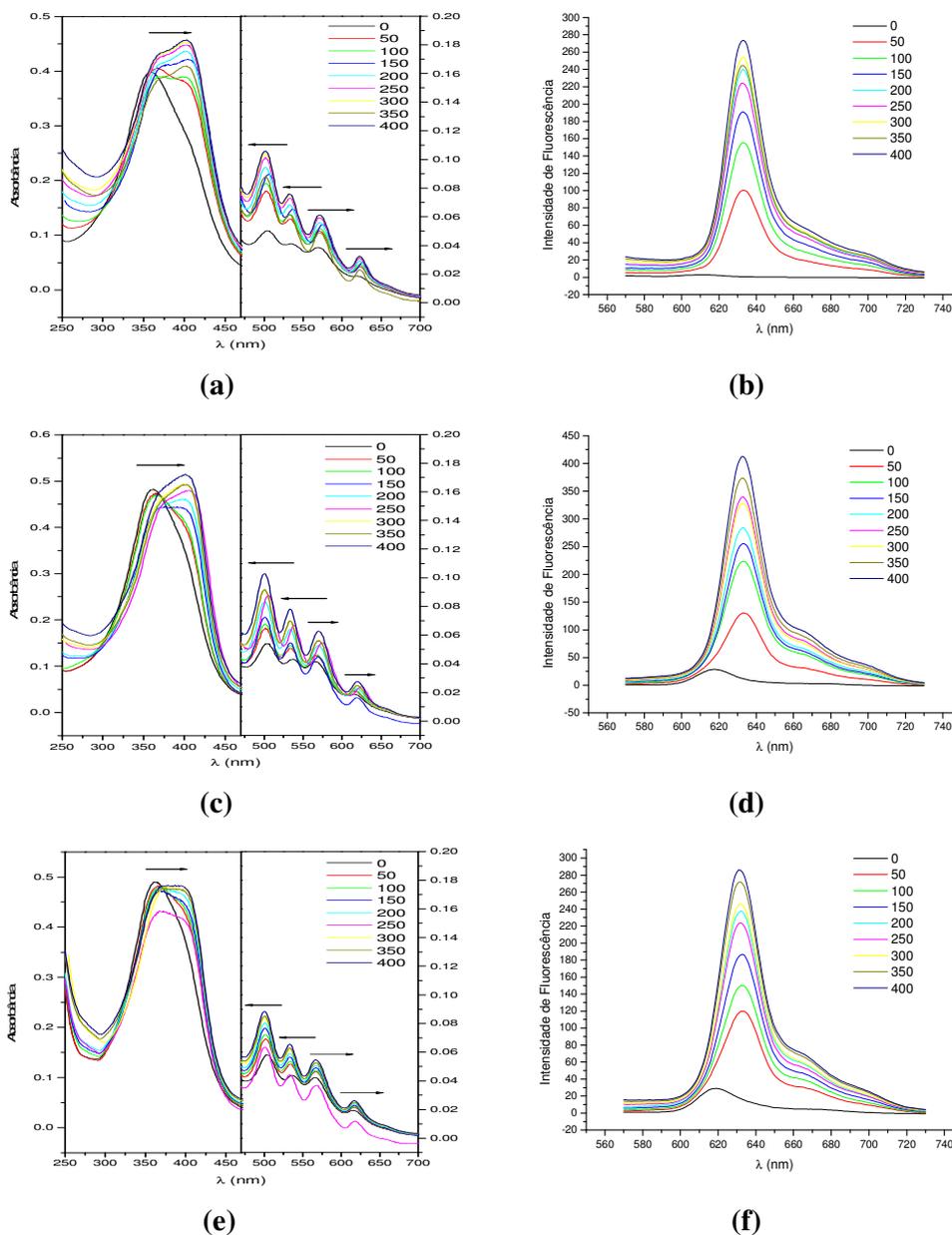


Figura 4.11: Espectros de absorção e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 504\text{nm}$) da solução de Photosan[®] ($10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão acetato/fosfato/borato em relação a concentração de DMPC. (a) e (b) pH 5,0; (c) e (d) pH 7,4; (e) e (f) pH 9,0.

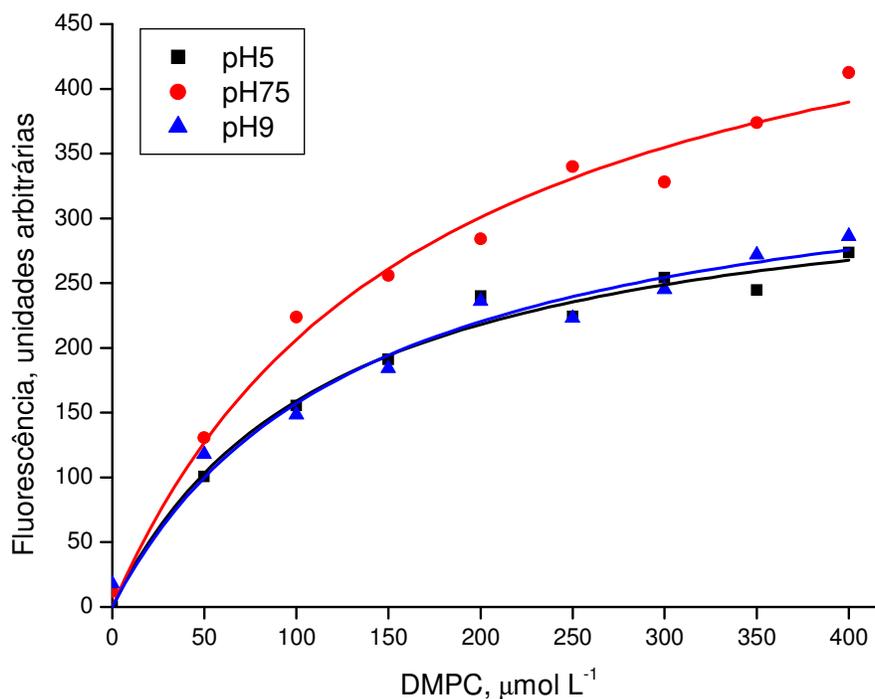


Figura 4.11g: Intensidades máximas da emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 504\text{nm}$) da solução de Photosan[®] ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) ligado ao fosfolípido em tampão acetato/fosfato/borato em função da concentração de DMPC em pH 5,0, 7,4 e 9,0, respectivamente.

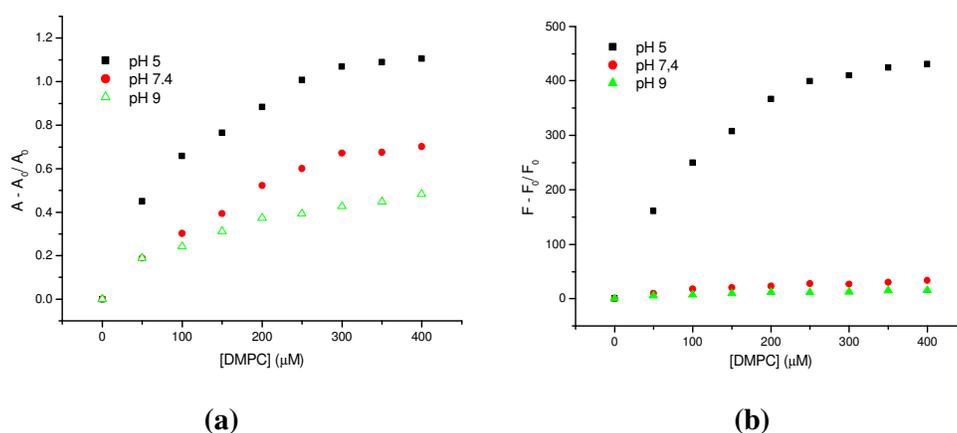


Figura 4.12: Resultados de absorvância (a) e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 504\text{nm}$) (b) da solução de Photosan[®] ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão acetato/fosfato/borato) pela variação da concentração de DMPC (μM) nos pHs de 5,0; 7,4 e 9,0.

Os deslocamentos e aumentos de intensidade de absorvância e emissão de fluorescência (Figuras 4.7 a 4.11) possuem uma causa comum, o efeito de agregação das moléculas dos fotossensibilizadores. Logo, em pH 5,0 o estado agregado é superior aos outros pHs estudados. Esse estado agregado existente na fase aquosa passa para a forma monomérica na fase lipídica do lipossomo. De acordo com Damoiseau *et al* [Damoiseau *et al*, 2001], a fluorescência dos fotossensibilizadores aumenta consideravelmente na presença de concentrações crescentes de lipossoma de DMPC, indicando monomerização dos mesmos. Para o Photosan[®] não ficou evidente a eficiência crescente de sua ligação ao lipossoma (Figura 4.11g) com a alcalinização. Neste caso as constantes em pH 5,0 e 9,0 foram similares, isto é, 0,0085 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,0074 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

4.5. Estudo da interação do Photofrin[®], Photogem[®], Photosan[®] com LDL

A alta expressão de receptores de LDL pelas células tumorais e a incorporação de fotossensibilizadores associados a LDL tem sido sugerido como um contribuinte para a acumulação específica de fotossensibilizador nestas células [Mojzisova, 2007]. Estudos revelam que a interação depende das propriedades físico-químicas do fotossensibilizador, assim como hidrofobicidade, carga e tamanho de partícula [Konan, 2002]. A interação com LDL aumenta com o aumento da hidrofobicidade do fotossensibilizador [Cuderlíková, 2000]. Como já foi discutido anteriormente a protonação de vários fotossensibilizadores aumenta sua hidrofobicidade [Mojzisova, 2007]. Conseqüentemente, a afinidade do fotossensibilizador com LDL em diferentes pHs é um importante parâmetro.

Realiza-se análise espectroscópica por absorção ótica e fluorescência da interação de soluções de Photofrin[®], Photogem[®], e Photosan[®] 10 µg.mL⁻¹ em tampão acetato/fosfato/borato 30 mM com a variação da concentração de LDL nos pHs 5,0 e 7,4. Essa análise não foi realizada em pH 9,0, como no caso do lipossoma, pois altos pHs afetam a integridade da LDL.

A Figura 4.13 apresenta os espectros de absorção e fluorescência do Photofrin[®] com variação da concentração de LDL (0 a 0,04 µM) nos pHs 5,0 e 7,4. Observa-se que para o pH 5,0, os espectros de absorção (Figura 4.13a) apresentam aumento da intensidade de absorção e deslocamento para o vermelho da banda de Soret em 32 nm e das bandas QII e QI em 4 e 2 nm, respectivamente, e deslocamento para o azul das bandas QIV e QIII em 3nm. Esses deslocamentos acontecem a partir da concentração de 0,024 µM de LDL. Nos resultados de fluorescência para o mesmo pH (Figura 4.13b), conseguimos observar o mesmo comportamento que o observado nos espectros de absorção. Aumento drástico da intensidade de fluorescência e, deslocamento do máximo de 615nm para 632nm a partir da concentração de 0,024 µM. Nos espectros de absorção em pH 7,4 (Figura 4.13c) se observa apenas um ligeiro aumento da absorção, que pode ter sido influenciado pelo espectrofotômetro utilizado, pois esse resultado não concorda com o observado nos espectros de fluorescência da mesma amostra. O espectro de fluorescência (Figura 4.13d) mostra aumento mais considerável da intensidade de fluorescência e deslocamento, ainda que não do máximo, de 615nm para 630nm.

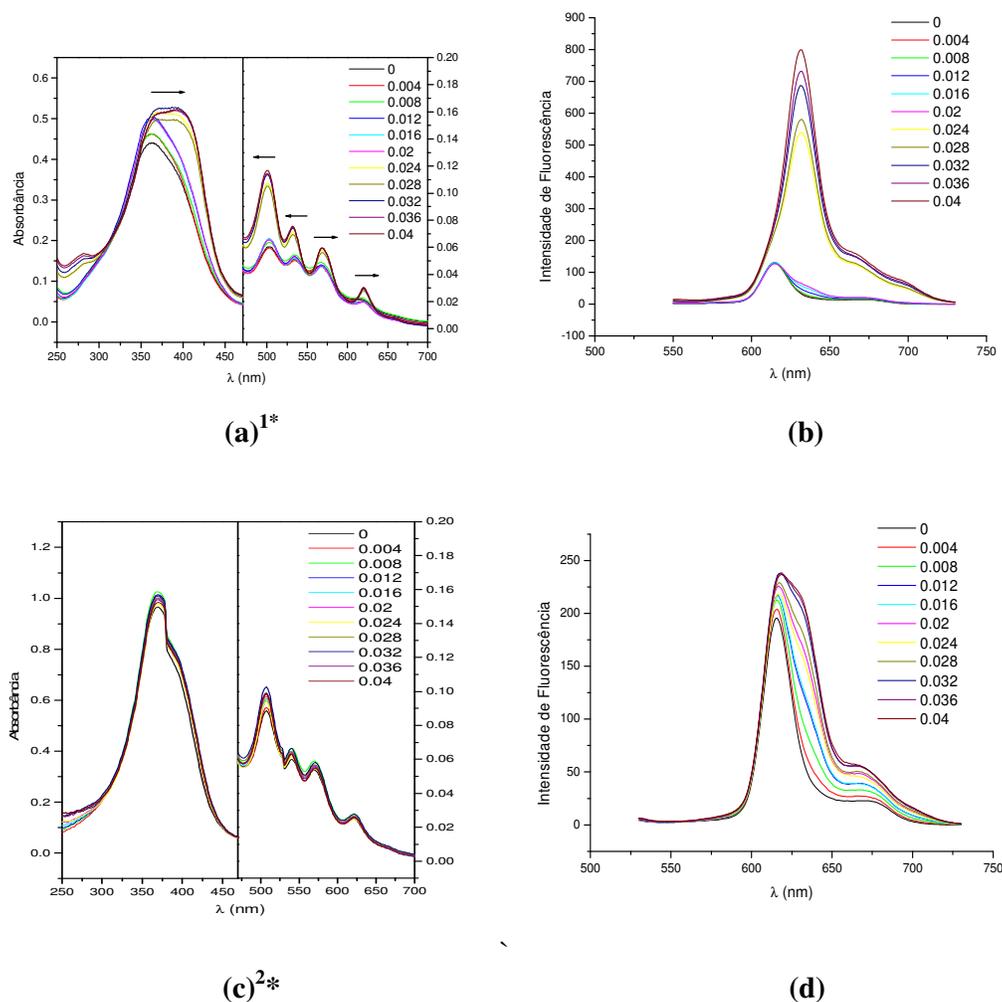


Figura 4.13: Espectros de absorção e de fluorescência de solução $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Photofrin[®] (tampão acetato/fosfato 30 mM) com variação da concentração de LDL (0-0.04 μM) nos pHs 5,0 (a e b) e 7,4 (c e d). 1* Espectrofotômetro UV-Vis U-2800 Hitachi ; 2* Espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary 5G Varian).

Analisando a Figura 4.14 que apresenta a absorbância da banda em 507nm e área abaixo da curva dos espectros de emissão fluorescência do Photofrin[®], pode-se observar em pH 5,0 um salto quando atingimos a concentração de 0,024 μM de LDL, tanto nos resultados de absorção quanto de fluorescência. Nessa concentração de LDL têm-se a diminuição rápida de formas agregadas em solução para formas monoméricas,

provavelmente na parte lipídica, da LDL. Em pH 7,4 a interação acontece mais gradativamente, pois o fotossensibilizador nesse pH está menos agregado no meio aquoso.

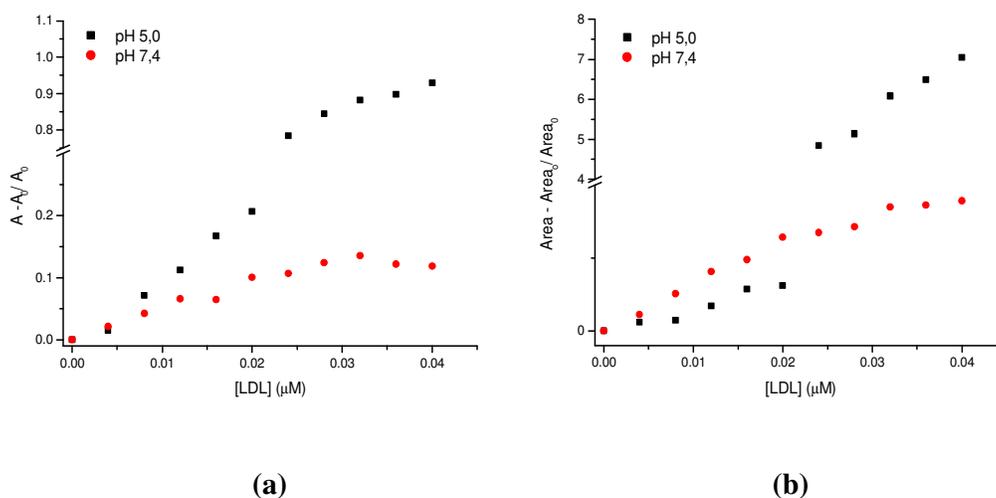


Figura 4.14: Resultados de absorvância (a) e emissão de fluorescência (b) da solução de Photofrin[®] (10 μg.mL⁻¹, tampão acetato/fosfato/borato 30 mM) pela variação da concentração de LDL (μM) nos pHs de 5,0; 7,4.

Para o Photogem[®], os resultados de absorção do pH 5,0 (Figura 4.14a) mostram similaridade aos resultados do Photofrin[®], que é aumento da intensidade de absorção e deslocamento a partir da concentração de 0,024 μM de LDL. As bandas de Soret, QII e QI deslocam para o vermelho em 19, 2 e 9 nm, respectivamente. Enquanto nas bandas QIV e QIII têm-se um deslocamento para o azul de apenas 1nm. Nos espectros de fluorescência temos o deslocamento de 614nm para 619, na mesma concentração de LDL. No pH 7,4 (Figura 4.15b e c), não se observa muita mudança nos espectros,

apenas um aumento mínimo de intensidade de absorção e fluorescência, indicando que nesse pH a adição de LDL não afeta a molécula do fotossensibilizador.

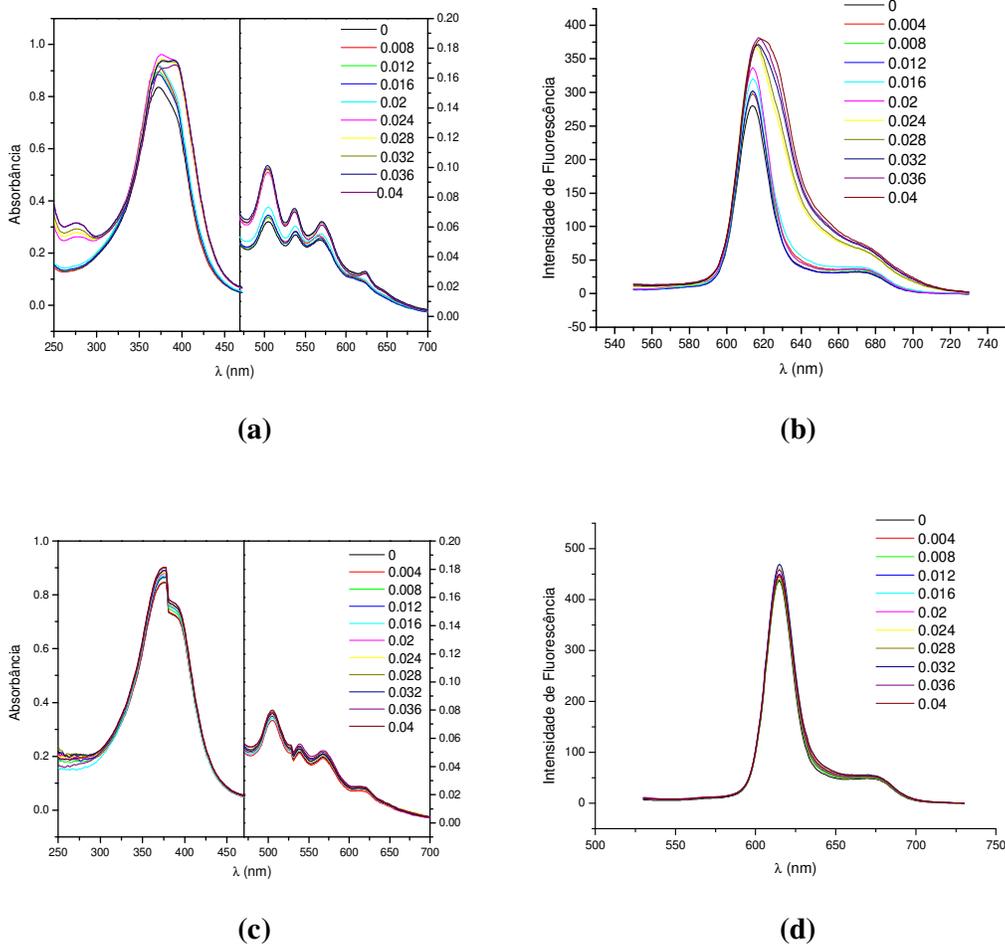


Figura 4.15: Espectros de absorção e de fluorescência de solução $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Photogem[®] (tampão acetato/fosfato 30 mM) com variação da concentração de LDL (0-0.04 μM) nos pHs 5,0 (a e b) e 7,4 (c e d).

Na Figura 4.16 que apresenta a absorvância da banda em 501nm e área abaixo da curva dos espectros de emissão de fluorescência do Photogem[®], observar-se ainda mais a similaridade desses resultados com o do Photofrin. Existe um salto em pH 5,0 quando atingimos a concentração de 0,024 μM de LDL nos resultados de absorção (Figura 4.16b) e de fluorescência (Figura 4.16b). Portanto, é nesta concentração de LDL que grande quantidade do fotossensibilizador passa da solução aquoso para as partes hidrofóbicas da LDL, diminuindo a agregação do mesmo. Em pH 7,4 a interação é muito mais sutil, supondo que este esteja menos agregado no meio aquoso.

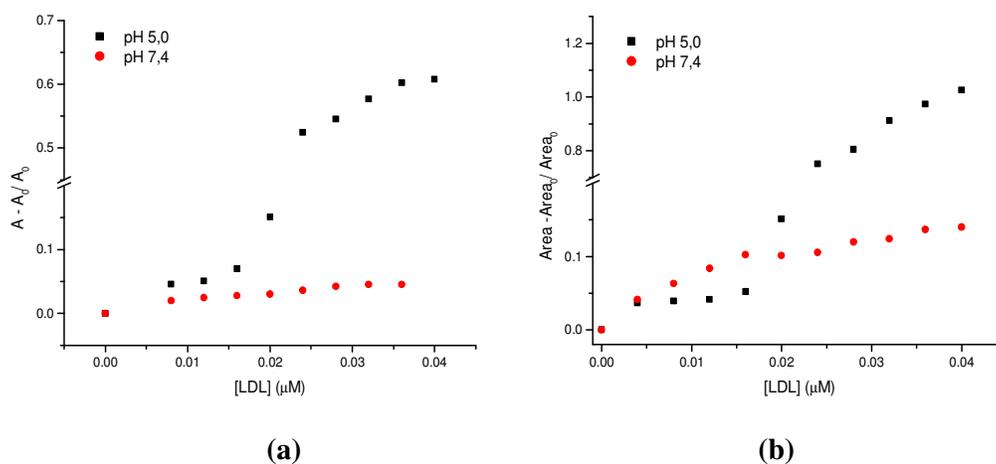
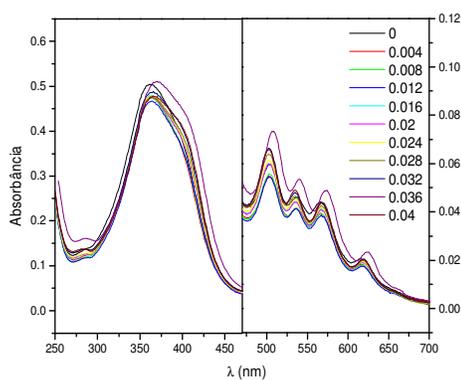


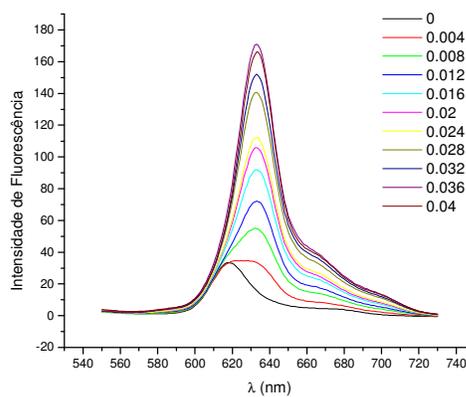
Figura 4.16: Resultados de absorvância (a) e emissão de fluorescência (b) da solução de Photogem[®] (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tampão acetato/fosfato/borato 30 mM) pela variação da concentração de LDL (μM) nos pHs de 5,0; 7,4.

Os resultados de absorvância do Photosan[®] (Figura 4.17 a e c) para os dois pHs não mostram mudança significativas, somente um leve aumento da intensidade de absorção quando se aumenta a concentração de LDL. Entretanto, nos resultados de

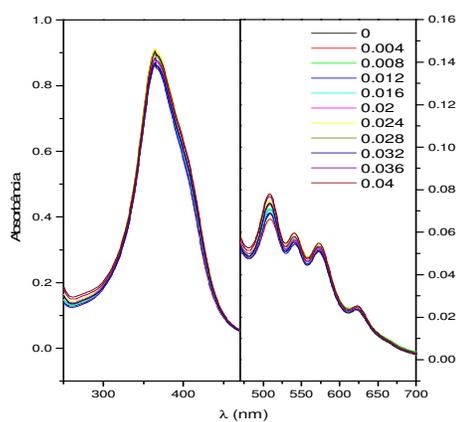
emissão de fluorescência observa-se aumento da intensidade e deslocamento do máximo de emissão de 618nm para 633nm para pH 5,0 (Figura 4.17b) na concentração de 0,004 μM e para pH 7,4 (Figura 4.17d) na concentração de 0,008 μM .



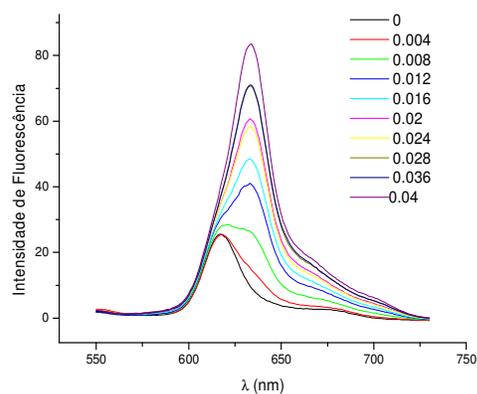
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.17: Espectros de absorção e de fluorescência de solução $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Photosan[®] (tampão acetato/fosfato 30 mM) com variação da concentração de LDL (0-0.04 μM) nos pHs 5,0 (a e b) e 7,4 (c e d).

Na Figura 4.18, que apresenta a absorbância da banda em 504nm e área abaixo da curva dos espectros de emissão de fluorescência do Photosan[®], pode-se observar que em pH 5,0 que as intensidades de absorção (Figura 4.18a) e áreas abaixo da curva emissão (Figura 4.18b) são maiores do que para pH 7,4, indicando mais influência da presença de LDL em pH 5,0. Isso pode ser explicado pela interação de grande quantidade de fotossensibilizador na forma agregada em solução aquosa para fase hidrofóbica da LDL (núcleo lipídico), diminuindo assim sua agregação.

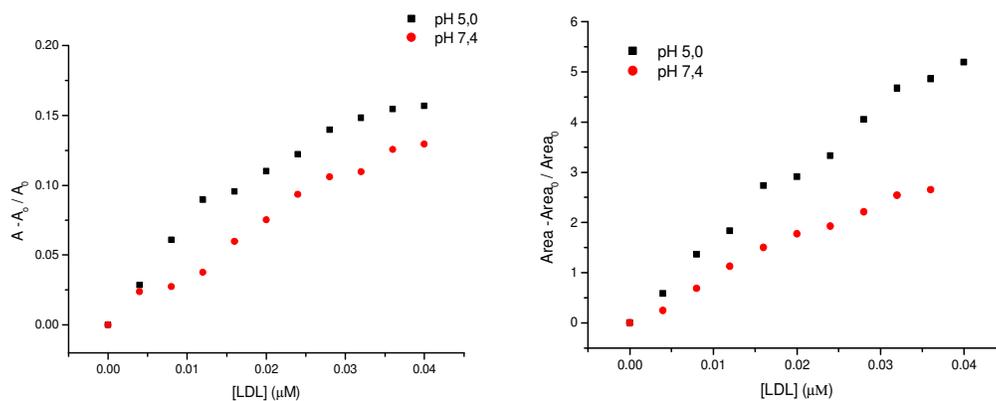


Figura 4.18: Resultados de absorbância (a) e emissão de fluorescência (b) da solução de Photosan[®] ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, tampão acetato/fosfato/borato) pela variação da concentração de LDL (μM) nos pHs de 5,0; 7,4.

Em todos os fotossensibilizadores observa-se o deslocamento do máximo de emissão de fluorescência para o vermelho. Na literatura esse comportamento é atribuído à incorporação dos fotossensibilizadores em meios mais hidrofóbicos, como na fase lipídica da LDL [Cunderlíková, 2000; Mojzisoava, 2007].

Tabela 4.2: Análise das ligações dos derivados de hematoporfirinas com LDL. Tampão acetato/fosfato/borato 30 mM; excitação: 507 nm (Photofrin[®]), 501 nm (Photogem[®]) e 504 nm (Photosan[®]). Entre parêntesis correspondem às análises dos resultados de absorção ótica.

	K, $\mu\text{mol}^{-1}\text{L}$	n	ΔI_{max}	I_0
Photofrin pH 5,0	45,2±0.5 (47±1)	30±3 (15±4)	534±11	44±5
pH 7,4	30.±21 (29±11)	1.3±0.4 (ausente)	268±130	66±8
Photogem pH 5,0	176±17 (47±1)	2.8±0.6 (15±4)	127±9	250±7
pH 7,4	- (33±8)	- (ausente)	-	-
Photosan pH 5,0	18±18 (35±4)	1.1±0.3 (ausente)	378±252	17±6
pH 7,4	40±21 (6±3)	1.4±0.4 (ausente)	113±44	8±4

Na Tabela 4.2 estão apresentados os resultados da análise das ligações dos derivados de hematoporfirinas no LDL. Os dados apresentaram o comportamento hiperbólico das absorbâncias em função da concentração do LDL para o Photofrin pH 7,4, Photogem pH 7,4 e Photosan[®] nos pH 5,0 e 7,4. Nos demais experimentos observaram-se o comportamento sigmoidal. A sigmóide representa um indício de que o fenômeno de ligação ao LDL poderá ser cooperativo. O parâmetro n na tabela corresponde à constante de Hill que indica o grau de cooperatividade. Excetuando-se o Photofrin[®] e o Phogem[®] em pH 5,0, as constantes de cooperatividade foram próximos de um, indicando apenas uma pequena cooperatividade. Na maioria dos experimentos, a ordem de grandeza das constantes de ligação foi de $10^7\text{ mol}^{-1}\text{ L}$. Apenas no Photogem[®] em pH 5,0 foi 10 vezes maior. O valor de 10^7 é similar ao resultado obtido a uma

clorina e6 apresentando grupos carboxílicos em sua estrutura (Mojzisoa et al. 2007). Em pH 7,4, em geral a variação das propriedades espectroscópicas foram pequenas que poderá ser justificada pelo fato de que neste pH as carboxilas se encontravam desprotonadas, atribuindo cargas líquidas negativas para uma fração significativa das moléculas.

V. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados conclui-se que a variação do pH afeta as propriedades das moléculas dos fotossensibilizadores e, portanto, as interações destes com o lipossoma de DMPC e a lipoproteína de baixa densidade (LDL).

Os experimentos espectroscópicos realizados com o Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®] mostram que a diminuição do pH leva a diminuição nas intensidades de absorção e emissão de fluorescência. Isso ocorre porque em soluções ácidas existe o predomínio de espécies agregadas. O aumento da agregação é devido ao equilíbrio ácido-base que formam espécies neutras em pH inferior ao pK (5 a 5,5) de grupos carboxílicos. A evidência experimental que permite atribuir o pK de 5 a 5,5 a grupos carboxílicos é que o radical ligado ao anel é derivado do ácido propiônico, o que dificulta a ressonância dos elétrons da carboxila com o sistema π da porfina. Ademais, não foram observadas mudanças na estrutura de quatro bandas na região Q, indicando que não há alterações nos nitrogênios do anel, portanto permanecendo neutro na faixa de pH empregada. Assim, para o pH abaixo do pK toda a molécula estará neutra. Por outro lado acima prevalecerá as forma aniônicas.

Resultados de interação com lipossomas mostraram que existe influência do pH e da concentração de DMPC no comportamento dos fotossensibilizadores, Photofrin[®], Photosan[®] e Photogem[®]. Isso pode ser observado pelo aumento das intensidades de absorção e emissão e os deslocamentos das bandas que caracterizam a difusão dos fotossensibilizadores agregados no meio aquoso para a fase lipídica, diminuindo assim sua agregação. Como em pH ácido existe a maior agregação de fotossensibilizadores com relação aos outros pH, a interação com o DMPC neste ocasiona maior mudança espectral quando pequena quantidade de fotossensibilizador se difunde para a fase

lipídica do DMPC. Entretanto, pelos valores da constante de interação calculados isso não indica maior interação. Os valores das constantes indicam maior interação em pH mais elevados.

As interações dos fotossensibilizadores com LDL mostram-se maiores que em pH ácido do que em pH 7,4, justificada pelo fato de que no pH 7,4 as carboxilas se encontravam desprotonadas, atribuindo cargas líquidas negativas para uma fração significativa das moléculas. Análise das ligações dos derivados de hematoporfirinas no LDL nos resultados de emissão de fluorescência mostram indício de que o fenômeno de ligação ao LDL pode ser cooperativo. Na maioria dos experimentos, a ordem de grandeza das constantes de ligação foi de $10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. Apenas no Photogem em pH 5,0 foi 10 vezes maior. Estes resultados se mostram diferentes aos apresentados para DMPC, porque a LDL é muito mais complexa e possui diferentes sítios de ligação para os fotossensibilizadores. Estes podem se ligar não somente na parte lipídica da LDL, mais na região hidrofóbica na interface entre a proteína e fase lipídica.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Ackroyd, R.; Kelty, C.; Brown, N.; Reed, M. (2001) *Photochemistry and Photobiology*, 74, 656-669.

Alberts B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. trad: Ana Beatriz Gorini da Veiga *et al.*, 4ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2004, 1313 – 1361.

Bangham, A. D. (1965) *J. Mol. Biol.*, 13, 238.

Bonnet, R. (1995) *Chemical Society Reviews*, 24, 19-33.

Bourré, L.; Thibaut, S.; Fimiani, M.; Ferrand, Y.; Simonneaux, G.; Patrice, T. (2003) *Pharmacological Research*, 47, 253-261.

Brault, D. (1990) *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 6, 19 - 86.

Candide, C.; Morlière, P.; Mazière, J.C.; Goldstein, S.; Santus, R.; Dubertret, L.; Reyftmann, J.P.; Polnovski, J. (1986) *FEBS*, 207(1), 133-138.

Carvalho, V. C. M. 2001. Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

Crouch, A. M.; Langford, C. H. (1990) *Journal Photochemistry and Photobiology A*, 52, 55.

Cunderlíková, B.; Gangeskar, L.; Moan, J. (1999) *Journal Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 53, 81 – 90.

Cunderlíková, B.; Kongshaug, M.; Gangeskar, L.; Moan, J. (2000) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32, 759-768.

Damoiseau, X.; Schuitmaker, H. J.; Lagerberg, J. W. M.; Hoebeke, M. J. (2001) *Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 60, 50.

Darwent, J.R.; Douglas, P.; Harriman, A.; Porter, G.; Richoux, M.C. (1982) *Coordination Chemistry Reviews*, 44, 83-126.

Daziano, J. P.; Steenken, S.; Chabannon, C.; Mannoni, P.; Chanon, M.; Julliard, M. (1996) *Photochemistry and Photobiology*, 68, 110 – 114.

Derycke, A.S.L.; Witte, P.A.M. (2004) *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 17-30.

Dougherty, T. J. (1993) *Photochemistry and Photobiology*, 58, 895 – 900.

Dougherty, T. J.; Grinday, G. B.; Fiel, R.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D. G. (1975) *Journal of the National Cancer Institute*, 55, 115 – 121.

Foley, M.S.C.; Beeby, Parker, A.W.; Bishop, S.M.; Phillips, D. (1997) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 38, 10-17.

Freeman, W. H.; and Company. Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2001, 419 – 440.

Gregoriadis, G. (1971) *FEBS Lett.*, 14, 95.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. trad.: Charles Alfred Esbérard et al., 9^a edição, Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 1996, 37 – 38.

Hevonoja, T.; Pentikäinen, M. O.; Hyvönen, T.; Kovanen, P. T.; Ala-Korpela, M. (2000) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1488, 189 – 210.

Howe, L.; Zang, J.Z. (1998) *Photochemistry and Photobiology*, 67, 90-96.

INCA. O problema do câncer no Brasil. Ministério da Saúde – coordenação de programas de controle de câncer. 2004.

Ivanov, A.V.; Reshetnickov, A.V.; Ponomarev, G.V. (2000) In *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy IX*, SPIE, 3909, 131-137.

Kader, A.; Pater, A. (2002) *Journal of Controlled Release*, 80, 29-44.

Kalyanasundaram, K. New York, Academic Press, 1992.

Kessel, D.; Byrne, C.J.; Ward, A.D. (1992) *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 13, 153-160.

Konan, Y.N.; Gurny, R.; Allèmann, E. (2002) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 66, 89-106.

Lipson, R. L. and Baldes, J. (1960) *Archives of Dermatology*, 82, 508 – 516.

Machado, A.E.H. (2000) *Química Nova*, 23(2), 237-243.

Malesys, J.J.E.; Silva, E.L. *Métodos Laboratoriais para o Estudo de Lípedes*, Edusp, São Paulo, (1995).

Margalit, R.; Shklait, N.; Cohen, S. (1983) *Biochemistry Journal*, 209, 547 – 552.

Massing, U.; Fuxius, S. (2000) *Liposomal formulations of anticancer drugs*, 3, 171 – 177.

Menezes, P. F. C. 2006. Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

Mojzisova, H.; Bonneau, S.; Vever-Bizet, C.; Brault, D. (2007) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768, 366 – 374.

Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Lehninger Princípios de Bioquímica*, 3ª ed, Sarvier, São Paulo, (2002).

Nishiyama, R., Stapert, H. R.; Zhang, G. D.; Takasu, D.; Jiang, D. L.; Nagano, T.; Ainda, T.; Kataoka, K. (2003) *Bioconjugate Chemistry*, 14, 58-66.

Ochsner, M. (1997) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 39, 1-18.

Prime, J.; *Les Accidents Toxiques par l'eosinate de sodium*, Jouve and Boyer, Paris (1901).

Raab, O. (1900) *Zeitschrift fur Biologie*, 39, 524-546.

Ribeiro, J. N. 2005. Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

Santos, N. C.; Castanho, M. *Química Nova*, 25, 6B, 1181.

Schuitmaker, J. J.; Baas, P.; Van Leengoed, H. L. L. M.; Van der Meulen, F. W.; Star, W. M.; Van Zandwijk, N. (1996) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Bioilogy*, 34, 3-12.

Sessa, G.; Weissmann, G. (1968) *J. Lipid Res.*, 9, 310.

Sharman, W.M.; van Lier, J.E.; Allen, C.M. (2004) *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 53-76.

Silva, A. R. 2003. Tese (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

Simplicio, F.I.; Maionchi, F.; Hioka, N. (2002) *Química nova*, 25(5), 801-807.

Snustad, D. P.; Simmons, M. J.; 2^a edição, Editora John Wiley & Sons, Inc. 2000.

Sobolev, S., Jans, D.A.; Rosenkranz, A.A. (2000) *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 73, 51-90.

Stranadko, E.P.; Ponomarev, G.V.; Mechkov, V.M.; Riabov, M.V.; Ivanov, A.V.; Reshetnickov, A.V.; Koraboyev, U.M. (2000) In *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy IX*, SPIE, 3909, 138-144.

Stryer, L. *Biochemistry*, 4rd ed., W.H. Freeman and Company, New York, 1995.

Timmins, G.S.; Davies, M.J. (1993) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 21, 167-173.

Uzdensky, A.B; Dergacheva, O.Y.; Zhavoronkova, A.A.; Reshetnikov, A.V.; Ponomarev, G.V. (2004) *Life Sciences*, 74, 2185-2197.

Valduga, G.; Pifferi, A.; Taroni, P.; Valentini, G.; Reddi, E.; Cubeddu, R.; Jori, G. (1999) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 49, 198-203.

Von Tappeneiner, H.; Jesionek, A. (1901) *Muench. Med. Wochenschr*, 47, 2042 – 2044.

Xu, D. (2007) *Photodiagnosis and Photodynamic*, 4, 13 -25.