UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**Desenvolvimento dos conceitos básicos para dosimetria e aplicação
em Terapia Fotodinâmica.**

Cláudia Adriana de Sousa Melo

**Tese apresentada ao Instituto de Física de São
Carlos, da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências: Física
Aplicada.**

SK

USP/IFSC/SBI

8-2-001534

Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

São Carlos

2003

IFSC-USP **SERVIÇO DE BIBLIOTECA
INFORMAÇÃO**

IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

Instituto de Física de São Carlos

Av. Trabalhador São-carlense, 400
Caixa Postal 369
13560-970 - São Carlos - SP - Brasil

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA TESE DE DOUTORADO DE
CLAUDIA ADRIANA DE SOUSA MELO, APRESENTADA AO INSTITUTO DE
FÍSICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, EM 18-07-2003.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato (Presidente) – IFSC/USP

Profa. Dra. Rosângela Itri – IF/USP

Prof. Dr. Iouri Borissevitch – FFCLRP/USP

Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Júnior – FMRP/USP

Profa. Dra. Cacilda da Silva Souza – FMRP/USP

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos

Pedro Bruno e Ana Clara

Ao meu marido

Carlos Alberto

Aos meus pais

Raimunda e Expedito

Melo, Cláudia Adriana de Sousa Melo

Desenvolvimento dos conceitos básicos para dosimetria e aplicação em Terapia

Fotodinâmica / Cláudia Adriana de Sousa Melo – São Carlos, 2003-07-18

Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2003 – páginas: 126.

Área: Física Aplicada

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Dosimetria. 3. Fotodegradação. 4. Sistema Biológico.

I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, por sua orientação neste trabalho e por seus sábios ensinamentos.

Agradeço aos professores do grupo de Óptica, Prof. Dr. Zílio, Prof. Dr. Máximo, Prof. Dr. Milton, Prof. Dr. Marcassa e Prof. Dr. Cleber, pela utilização dos seus laboratórios.

Agradeço a Dr. Débora Milori pela utilização do seu laboratório e pelas discussões sobre o trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Orlando Castro e Silva, pela utilização do laboratório de bioquímica e o pelo auxílio das técnicas Maria Elisa, Clarice, Cecília e Maria Aparecida.

Agradeço ao Carlos por sua paciência e compreensão.

Agradeço aos meus pais, por seu amor e sua dedicação.

Agradeço ao Pedro Bruno e a Ana Clara pelas alegrias proporcionadas.

Agradeço a amiga Cristina pelo companheirismo e por sua amizade.

Agradeço aos amigos Joatan, Igor, Newton, Salete, Elvira, Daniel, Kilvia, Flávio, Isabel, Luana, Lino, Liana (Lina), Paulo (Nescau), Aparecida, Marcel e Brás, por nunca reclamarem do cardápio e pelos bons momentos juntos.

Agradeço aos colegas de laboratório Carla, Juliana, Clóvis, Lílian, Augusto, Tânia, Vitória, Rosane, Tiago, Lia, Lucas e Paulo, pelo companheirismo e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos colegas do laboratório de eletrônica Daniel, Marcelo e José Roberto Caon, pelo auxílio prestado na resolução de problemas técnicos.

Agradeço as colegas da química Priscila e Valéria (†), pelo auxílio nas medidas de espectroscopia e pelas discussões sobre o trabalho.

Agradeço as secretárias do grupo Gláucia e Isabel, pela atenção dedicada.

Agradeço as bibliotecárias pelo excelente serviço prestado.

Os meus agradecimentos aos colegas contemporâneos de curso. E aos colegas do grupo de Óptica meu agradecimento pelos bons momentos que passamos juntos.

ÍNDICE

<i>Índice de Tabelas</i>	V
<i>Índice de Figuras</i>	VI
<i>Abreviaturas</i>	XII
<i>Resumo</i>	XIII
<i>Abstract</i>	XIV
 <i>I – Considerações gerais</i>	 01
1 . 1 – <i>Terapias convencionais para o tratamento do câncer</i>	05
1 . 2 – <i>A Terapias Fotodinâmica – PDT</i>	09
1 . 2 . 1 – <i>Principais mecanismos de ação da terapia fotodinâmica</i>	11
1 . 2 . 2 – <i>Propriedades de um fotossensibilizador ideal</i>	14
1 . 2 . 3 – <i>Porfirinas</i>	16
a – <i>Photofrin®</i>	18
b – <i>Photogem®</i>	19
1 . 2 . 4 – <i>Transporte e localização intracelular dos fotossensibilizadores</i>	21
1 . 2 . 5 – <i>Considerações sobre dosimetria</i>	22
 <i>II – Objetivo</i>	 24
 <i>III – Análise da estabilidade do PHOTOGEM® através de técnicas espectroscópicas</i>	 25
3 . 1 – <i>Introdução</i>	25
3.2 – <i>Objetivo</i>	29
3 . 3 – <i>Materiais e Métodos</i>	29
3 . 3 . 1 – <i>Espectroscopia de fluorescência e absorção</i>	29
a – <i>Variação de concentração</i>	30

<i>b – Variação de solvente</i>	30
<i>c – Variação de pH.</i>	31
<i>d – Variação da potência de irradiação e comprimento de onda</i>	31
<i>e – Variação da temperatura.</i>	32
<i>3 . 4 – Resultados e Discussão</i>	33
<i>3 . 4 . 1 – Estudo espectroscópico</i>	34
<i>a – Variação de concentração</i>	34
<i>b – Variação de solvente</i>	38
<i>b . 1 – Solução salina tamponada com fosfato – PBS</i>	38
<i>b . 2 – Dimetil sulfoxido (DMSO)</i>	43
<i>c – Variação de pH.</i>	48
<i>d – Variação da potência de irradiação e comprimento de onda</i>	56
<i>e – Variação da temperatura.</i>	69
<i>3 . 5 – Conclusão</i>	73
<i>IV – Farmacocinética dos fotossensibilizadores em modelo animal</i>	75
<i>4 . 1 – Introdução</i>	75
<i>4 . 2 – Objetivo</i>	77
<i>4 . 3 – Materiais e Métodos</i>	77
<i>4 . 3 . 1 – Preparo e fotossensibilização dos animais</i>	77
<i>4 . 3 . 2 – Monitoramento do medicamento em órgãos de ratos</i>	78
<i>4 . 4 – Resultados e Discussão</i>	80
<i>a – Monitoramento da pele</i>	81

<i>b – Monitoramento dos órgãos internos</i>	82
<i>c – Modelo teórico</i>	86
<i>4 . 5 – Conclusões</i>	90
<i>V – Penetração da luz visível em tecido biológico</i>	91
<i>5 . 1 – Introdução</i>	91
<i>5 . 2 – Objetivo</i>	98
<i>5 . 3 – Materiais e Métodos</i>	98
<i>5 . 3 . 1 – Preparação das amostras</i>	98
<i>5 . 3 . 2 – Sistema de irradiação e captação de imagens</i>	99
<i>5 . 4 – Resultados e Discussão</i>	100
<i>5 . 4 . 1 – Tratamento das imagens</i>	100
<i>5 . 5 – Conclusões</i>	103
<i>VI – Efeito do laser na respiração mitocondrial</i>	104
<i>6 . 1 – Introdução</i>	104
<i>6 . 2 – Objetivo</i>	108
<i>6 . 3 – Materiais e Métodos</i>	108
<i>6 . 3 . 1 – Fotossensibilização e irradiação dos animais</i>	109
<i>6 . 3 . 2 – Isolamento das mitocôndrias</i>	110
<i>6 . 3 . 3 – Respiração das mitocôndrias</i>	111
<i>6 . 4 – Resultados e Discussão</i>	113
<i>6 . 4 . 1 – Respiração mitocondrial</i>	113
<i>6 . 5 – Conclusões</i>	116

<i>VII – Conclusão</i>	117
<i>VIII – Referências bibliográficas</i>	120
<i>Apêndice</i>	1
<i>a – Lei de Beer-Lambert</i>	1
<i>b – Conceitos básicos de fluorescência</i>	2

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.I – Taxa de formação de fotoproduto para diferentes tempos de irradiação	40
Tabela 3.II – Taxa de formação de fotoproduto para diferentes tempos de irradiação	44
Tabela 4.I – Tempos de acúmulo típicos ($\tau_{ac.}$), tempos de eliminação ($\tau_{eli.}$) e tempos	89
Tabela 4.II – Pico dos espectros de fluorescência para os diferentes tecidos	89
Tabela 5.I – Comprimento de absorção, α^{-1} , para o laser de argônio	96
Tabela 5.II – Coeficientes de absorção para os diferentes tipos de tecido, em 630 nm	102
Tab. 5.III – Coeficientes de absorção para os diferentes tipos de tecido, em 630 nm	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Esquema da evolução de uma lesão cancerosa	04
Figura 1.2 – Estrutura básica das porfirinas	17
Figura 1.3 – Espectro de absorção das porfirinas e o perfil de transmissão dos tecidos	18
Figura 1.4 – Estrutura química do Photogem [®]	19
Figura 1.5 – Diagrama esquemático dos principais aspectos a serem abordados em dosimetria para PDT	22
Figura 3.1: Sistema laser usado para irradiar as amostras de PTG	30
Figura 3.2: Banho térmico usado nas medidas de temperatura	33
Figura 3.3: Espectros de absorção das amostras de Photogem [®] , não irradiadas, para diferentes concentrações. À direita mostramos uma ampliação região das bandas Q e acima ampliamos a última banda Q	34
Figura 3.4: Comportamento do pico de absorção em 370 nm com o aumento da concentração	35
Figura 3.5: Espectros de absorção das amostras de PTG irradiadas com 514 nm, $P = 0,2 \text{ W}$ e $t = 20 \text{ min.}$, para diferentes concentrações. À direita mostramos a ampliação da região das bandas Q e acima ampliamos a última banda Q	36
Figura 3.6: Espectros de fluorescência, com excitação em 507 nm, das amostras em PBS não irradiadas. No detalhe, ampliação da região entre 620 e 660 nm	37
Figura 3.7: Espectros de fluorescência, com excitação em 507 nm, das amostras em PBS irradiadas com 514 nm. No detalhe, ampliação da região entre 620 e 660 nm	37
Figura 3.8: Espectros de absorção das amostras de photogem, em PBS na concentração de $25 \mu\text{g/ml}$, com 514 nm, e potência de $0,5 \text{ W}$, no tempo indicado na figura	39

Figura 3.9: Subtração do espectro controle da amostra controle das demais amostras	40
Figura 3.10: Espectros de fluorescência das amostras em PBS, irradiadas com 514 nm, com excitação em 507 nm	41
Figura 3.11: Evolução temporal do pico de emissão centrado em 611 nm	42
Figura 3.12: Evolução temporal do pico de emissão centrado em 640 nm	42
Figura 3.13: Espectros de absorção das amostras de photogem, em DMSO na concentração de 25 µg/ml, com 514 nm na potência de 0,5 W, com variação temporal	43
Figura 3.14: Subtração do espectro controle da amostra controle das demais amostras	44
Figura 3.15: Espectros de fluorescência, em DMSO, irradiadas com 514 nm, com excitação em 507 nm	45
Figura 3.16: Evolução temporal do pico de emissão centrado em 623 nm	46
Figura 3.17: Evolução temporal do pico de emissão centrado em 650 nm	47
Figura 3.18: Espectros de absorção das soluções em PBS, para os pH = 5, 6, 7, 8 e 10, na concentração de 25 µg/ml, não irradiadas	49
Figura 3.19: Espectros de absorção das soluções em PBS, para o pH = 5.	50
Figura 3.20: Espectros de absorção das soluções em PBS, para o pH = 7.	50
Figura 3.21: Espectros de absorção das soluções em PBS, para o pH = 10.	50
Figura 3.22: Comportamento da máxima absorção em 369 nm em função do pH	51
Figura 3.23: Comportamento da máxima absorção da nova banda formada em 640 nm em função do pH	52
Figura 3.24: Espectros de fluorescência das soluções em PBS, com variação de pH, na concentração de 25 µg/ml, não irradiadas	53
Figura 3.25: Espectros de fluorescência das soluções em PBS, para o pH = 5.	53
Figura 3.26: Espectros de fluorescência das soluções em PBS, para o pH = 7.	54
Figura 3.27: Espectros de fluorescência das soluções em PBS, para o pH = 10.	54
Figura 3.28: Comportamento do máximo de fluorescência em 611 nm em função do pH, para amostras irradiadas e não irradiada	55

Figura 3.29: Comportamento da nova banda de fluorescência em 640 nm em função do pH, para amostras irradiadas e não irradiada	55
Figura 3.30: Espectros de absorção das amostras, em PBS, irradiadas com 488 nm	57
Figura 3.31: Espectros de absorção das amostras, em PBS, irradiadas com 514 nm	57
Figura 3.32: Espectros de absorção das amostras, em PBS, irradiadas com 630 nm	57
Figura 3.33: Evolução temporal da fluorescência para os três comprimentos de onda investigados, em 611 nm	58
Figura 3.34: Evolução temporal da fluorescência para os três comprimentos de onda investigados, em 640 nm	59
Figura 3.35: Espectros de absorção das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, irradiadas por 20 minutos com laser de argônio na linha de 514 nm	60
Figura 3.36: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, excitação em 507 nm, irradiadas por 20 minutos em 514 nm	61
Figura 3.37: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, excitação em 369 nm, irradiadas por 20 minutos em 514 nm	61
Figura 3.38: Espectros de absorção das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, irradiadas com uma potência 0,3 W em 514 nm	63
Figura 3.39: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, excitação em 507 nm, irradiadas com uma potência 0,3 W em 514 nm	64
Figura 3.40: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, excitação em 369 nm, irradiadas com uma potência 0,3 W em 514 nm	64

Figura 3.41: Espectros de absorção das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, irradiadas com uma potência 1,0 W em 514 nm	65
Figura 3.42: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, excitação em 507 nm, irradiadas com uma potência 1,0 W em 514 nm	66
Figura 3.43: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, excitação em 369 nm, irradiadas com uma potência 1,0 W em 514 nm	66
Figura 3.44: Espectros de absorção das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, irradiadas com uma potência 0,3 W em 351nm	67
Figura 3.45: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, excitação em 507 nm, irradiadas com uma potência 1,0 W em 351 nm	68
Figura 3.46: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25µg/ml, excitação em 351 nm, irradiadas com uma potência 0,3 W em 351 nm	68
Figura 3.47: Evolução temporal do pico de fluorescência em 460 nm, com excitação em 369 nm, para os comprimentos de onda em 351 e 514 nm e potências de 0,3 e 1,0 W	69
Figura 3.48: Variação de temperatura das amostras de PTG, com uma concentração de 25 µg/ml.	70
Figura 3.49: Comportamento da absorção em 369 nm nas temperaturas investigadas	71
Figura 3.50: Espectros de fluorescência das amostras submetidas à temperatura de 37 °C, com excitação em 507 nm	71
Figura 3.51: Espectros de fluorescência para as três temperaturas estudadas, para o tempo de 30 minutos	72

Figura 4.1: Sistema de diagnóstico de fluorescência utilizados nos experimentos	79
Figura 4.2: Laser de He-Cd (442 nm) e laser de Nd ³⁺ :YAG (532 nm)	79
Figura 4.3: Regiões dos animais onde foram realizadas as medidas de fluorescência	80
Figura 4.4: Espectros de fluorescência da pele, região do abdômen, após administração do fotossensibilizador	81
Figura 4.5: Evolução temporal do pico de fluorescência em 636 nm, no abdômen	82
Figura 4.6: Espectros de fluorescência do fígado do rato, mostrando duas bandas de emissão	83
Figura 4.7: Evolução temporal dos picos de fluorescência para o fígado	84
Figura 4.8: Espectros de fluorescência do rim, com uma banda centrada em 625 nm	84
Figura 4.9: Evolução temporal do acúmulo de PTG no rim dos ratos	85
Figura 4.10: Ajuste dos dados experimentais usando o modelo teórico	88
Figura 5.1: Modelo de membrana plasmática (bicamada de fosfolipídios)	92
Figura 5.2: Arranjo experimental de iluminação e captação de imagem	99
Figura 5.3: Amostras irradiadas com 630 e 488 nm, mostrando a diferença na penetração	99
Figura 5.4: Imagens da luz penetrando no tecido, obtidas através de uma câmara CCD	101
Figura 5.5: (a) Gráfico obtido da imagem através do programa que relaciona cor com intensidade de irradiação, (b) cálculo do coeficiente de absorção	101
Figura 6.1: Esquema simplificado do processo de obtenção de energia	106
Figura 6.2: Irradiação do fígado do animal anestesiado, após uma espera de 30 minutos, irradiado com laser em 630 nm	110
Figura 6.3: Eletrodo usado nas medidas de respiração mitocondrial, possuindo um catodo de platina e dois ânodos de prata	111
Figura 6.4: Montagem experimental desenvolvida no laboratório para medidas do consumo de oxigênio nas mitocôndrias, usando o eletrodo descrito anteriormente	112

Figura 6.5: Gráfico apresenta o consumo de O_2 em função do tempo em s, avaliando os estágios da respiração mitocondrial	113
Figura 6.6: Mostramos o comportamentos do estado 3, para as amostras nos três tempos de irradiação	114
Figura 6.7: Mostramos o comportamentos do estado 4, para as amostras nos três tempos de irradiação	114
Figura 6.8: Observamos a relação da razão de controle respiratório (RCR), com o tempo de irradiação das amostras	115

ABREVIATURAS

- PDT – Photodynamic Therapy
- HpD – Hematoporphyrin Derivative
- INCA – Instituto Nacional de Câncer
- LASER – Light Amplification by Stimulated Emission
- LED – Light-Emission Diode
- ISC – Inter-System Crossing
- PDD – Photodynamic Diagnosis
- PTG – PHOTOGEN[®]
- ALA – Ácido aminolevulínico
- LDL – Low Density Lipoprotein
- DMSO – Dimetil Sulfoxido
- PBS – Phosphate-Buffered Saline

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é a uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento do câncer e outras doenças, que visa a destruição do tecido alterado. A PDT se caracteriza por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem após a administração de uma droga, retida preferencialmente nos tecidos tumorais, seguida pela irradiação com luz visível. Quando as células tumorais tratadas são irradiadas, o fotossensibilizador absorve luz e inicia uma reação em cadeia produzindo espécies reativas de oxigênio que destroem as células tumorais. Neste trabalho procuramos avaliar os principais aspectos da PDT para o desenvolvimento de uma dosimetria baseada em conceitos fundamentais tais como: a estabilidade do Photogem[®], a farmacocinética, a penetração da luz no tecido e os mecanismos de morte celular. Com esse propósito realizamos quatro experimentos distintos nos quais esses aspectos foram investigados. Realizamos experimentos *in vitro* para averiguar a estabilidade do Photogem[®]. As soluções foram submetidas a condições extremas de irradiação, onde variamos comprimento de onda e potência de irradiação. Analisamos também a variação de pH, concentração e solvente. A farmacocinética, a profundidade de penetração da luz em tecido biológico e os processos de morte celular foram realizados *in vivo*. Os resultados obtidos foram os seguintes: o fotossensibilizador é degradado ao variarmos o comprimento de onda e a potência de irradiação; ele não sofre degradação ao ser aquecido até 60 °C. No estudo da farmacocinética verificamos que os tecidos estudados apresentaram tempos de acúmulo e eliminação diferente, com o fígado apresentando menores tempos. Na avaliação da penetração da luz verificamos que para tecidos menos pigmentados obtivemos maior penetração. Os nossos resultados estão em concordância com os encontrados na literatura. Finalmente para a respiração mitocondrial observamos que para maiores tempos de irradiação a razão de controle respiratório foi elevada, indicando modificações no ciclo respiratório. Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem subsídios importantes para auxiliar a determinação de um protocolo controlado de dosimetria para PDT, aumentando a eficiência e conseqüentemente a taxa de sucesso da terapia.

ABSTRACT

The Photodynamic Therapy (PDT) is a promising therapeutical modality for the treatment of cancer and other diseases, seeking the altered tissue destruction. The PDT is characterized by a set of physical, chemical and biological processes, which occur after a drug injection and selective retention in tumoral tissues, followed by visible light irradiation. When the tumoral cells are irradiated, the photosensitiser absorbs light and begins a chain reaction with the formation of reactive species of oxygen leading to the destruction of the tumoral cells. In this study we evaluate important PDT aspects for the development of a dosimetry based in some fundamental concepts such as Photogem[®] stability, pharmacokinetics, light penetration in tissue and all death mechanisms. Four experiments experiments were done to investigate these aspects. *In vitro* studies were performed to evaluate the Photogem[®] stability under different wavelength and light power parameters. It were also investigated the dependence under pH, concentration and solvent type variation. The pharmacokinetics, light penetration in biological tissue and cell death mechanisms were studied *in vivo* experiments. The results showed that the photosensitiser is degradeted depending on the was no degradation until 60 °C. In the pharmacokinetics study we verified that the investigated tissues present different accumulation and elimination times, the hepatic tissue showing the smallest times. In the light penetration evaluation we verified that the less pigmented ones showed the greater penetration in accordance with the literature results. Finally in mitichondrial study we observed that for longer irradiation times the respiratory cycle. Our results give important data to aid the establishment of a controlled PDT dosimetry protocol, improving the efficiency and consequently the success rate of this therapy.

I – Considerações gerais

As propriedades benéficas e terapêuticas da luz são de longa data reconhecida e utilizada pela humanidade. Os solários, por exemplo, eram estruturas da arquitetura doméstica dos antigos gregos e romanos. O famoso médico grego Heródoto, que foi considerado o pai da helioterapia, enfatizava a importância da exposição ao sol para a restauração da saúde [1]. Na Índia, extratos de plantas eram administrados oralmente seguidos por exposição à luz solar para o tratamento de vitiligo. Na França, nos séculos dezoito e dezenove, a luz solar foi aplicada em vários tratamentos, incluindo tuberculose, raquitismo, escorbuto, reumatismo, paralisia, edema e fraqueza muscular. A fototerapia foi introduzida na Europa no século XIX pelo médico dinamarquês Niels Ryberg Finsen. Finsen demonstrou que a luz ultravioleta emitida pelo sol era altamente eficaz no tratamento de Lupus vulgaris, uma doença endêmica de pele, encontrada com frequência no inverno entre pacientes tuberculosos escandinavos. Este trabalho lhe rendeu o prêmio Nobel de Medicina em 1903. Desde então, a fototerapia tem sido usada com sucesso em tratamentos de psoríase, carência de vitamina D e hiper-bilirrubine neonatal [2].

A Fototerapia e a fotoquimioterapia são formas de tratamento conhecidas desde a antiguidade. Tanto uma como a outra se fundamentam na ação da luz sobre componentes químicos do tecido biológico. A terapia fotodinâmica (do inglês, Photodynamic Therapy, ou PDT), é um tratamento para várias enfermidades, em particular para cânceres localizados e degeneração macular. A PDT requer a combinação de oxigênio, luz e uma droga (fotossensibilizador), para causar danos no tecido alvo. As

bases científicas para esse tratamento foram descobertas no início do século passado, por Raab [3]. Em 1913, Meyer Betz, [4] demonstrou o efeito fotodinâmico no corpo humano, em uma consagrada experiência em que ele injetou no próprio corpo uma solução contendo 200 mg de hematoporfirina 8 e subsequente exposição a luz solar causando inúmeras lesões na face e nas mãos. Quatro décadas depois, Auler e Banzer, observaram a fluorescência de tumor e necrose sob irradiação UV após a administração de porfirina em experimentos com animais. No início da década de 50, visando otimizar uma preparação para ser utilizada na localização de tumores, Schwartz tratou a hematoporfirina com ácido acético e sulfúrico e obteve uma mistura de porfirinas que ele chamou de “derivado de hematoporfirina (HpD, do inglês, Hematoporphyrin Derivative). Richard Lipson [5], foi o primeiro a realmente tratar uma paciente com câncer de mama com metástases em 1966, assinalando o início da PDT como uma terapia para o tratamento do câncer. Posteriormente, um extenso e detalhado estudo clínico foi descrito por Dougherty e seus colaboradores, [6], que conseqüentemente levaram à primeira aprovação reguladora de um sensibilizador em PDT, o Photofrin®. A PDT tem sido utilizada com sucesso em casos de tumores onde a aplicação de luz é facilitada, ou seja, tumores de pele, cavidade oral, pulmão, bexiga, ovário e cólon [6]. No caso de tumores localizados em cavidades, a aplicação de luz pode ser feita levando a luz até o local do tumor por meio de fibras ópticas acopladas a sondas. Como exemplos, podemos citar tumores de laringe, esôfago, estômago, pulmão e aparelho geniturinário. A PDT pode ser útil em qualquer patologia que envolva tecidos de crescimento rápido, como por exemplo, em doenças cardiovasculares, em doenças de

pele como psoríase e queratose solar e no campo da oftalmologia, em casos de degeneração macular [7].

Atualmente, a principal aplicação da PDT é o tratamento de lesões tumorais malignas: o câncer. Mas o que é o câncer? É um conjunto de mais de uma centena de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo através da corrente sanguínea originando tumores secundários denominados metástases [8]. Essas células possuem uma divisão celular acelerada, tornando-as agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (neoplasias). Existem processos de acúmulo de célula denominados tumores benignos, que não apresentam risco de vida. Esses tumores possuem um crescimento lento e as células se assemelham às do tecido original.

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo, pois existem diversos tipos de células. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes [9]. Na figura 1.1 mostramos um esquema da evolução de um câncer,

Figura 1.1: Esquema da evolução de uma lesão cancerosa.

As causas do câncer são muitas, podendo ser externas ou internas ao organismo e ambas estão interligadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente (agentes químicos ambientais e radiação) e aos hábitos próprios de um ambiente social e cultural (hábitos alimentares, hábito de fumar e ingestão de álcool, por exemplo). As causas internas (disfunções do sistema imune e predisposição hereditária) são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Dentre estes fatores, o tabagismo é o principal agente causador da doença e está diretamente relacionado, com os cânceres de pulmão, boca, laringe e bexiga [10].

No Brasil, o câncer está entre as principais causas de morte, ao lado das doenças do aparelho circulatório, causas externas, doenças do aparelho respiratório, afecções do período peri-natal e doenças infecciosas e parasitárias. Atualmente, o câncer se constitui na segunda causa de morte por doença, no Brasil, e, em 1994, os neoplasmas foram responsáveis por 10,86% dos 887.594 óbitos registrados, [11]. Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer, INCA, neste ano teremos 402.190 casos novos de câncer, sendo que os óbitos estão estimados em 126.960 casos. Desses casos novos 82.165 são cânceres de pele não melanoma. Os dados epidemiológicos disponíveis atualmente

permitem classificar o câncer como um problema de saúde pública no Brasil, pois à medida que são constatados novos casos da doença o número de leitos disponíveis permanece constante. Se por um lado a mudança dos hábitos de vida da população contribui para o aumento da incidência de câncer, por outro o aumento da expectativa de vida, a industrialização e a urbanização permitem uma maior exposição aos agentes carcinogênicos. Além disso, os avanços tecnológicos na área da saúde têm possibilitado um diagnóstico cada vez mais precoce do câncer.

1.1 – Terapias convencionais para o tratamento do câncer

Os tratamentos convencionais para o câncer são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Em todos esses tratamentos o enfoque fundamental é levar a morte celular. Descreveremos a seguir as principais características dessas terapias.

Cirurgia consiste na remoção do tumor. Ele pode ser curativo ou paliativo. O tratamento cirúrgico é considerado curativo quando indicado nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos. É um tratamento radical, que compreende a remoção do tumor primário com margem de segurança e, se indicada, a retirada dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão-sede do tumor primário. A margem de segurança, na cirurgia oncológica, varia de acordo com a localização e o tipo histológico do tumor, pelo seu caráter de invasão microscópica, exige ressecção mais ampla. Por exemplo, no caso do pulmão – um lobo ou todo o pulmão. O tratamento cirúrgico paliativo, por sua vez, tem a finalidade de reduzir a população de células tumorais ou controlar sintomas que põem em risco a vida do paciente ou que comprometem a qualidade da sua sobrevivência [12]. Apesar de ser a técnica mais utilizada no

tratamento do câncer, podendo causar mutilações nos pacientes, como por exemplo, no caso de tumor de mama. A retirada de uma ou ambas as mamas podem ser bastante traumática para a mulher, acarretando graves problemas psicológicos e perda da auto-estima. Além desse aspecto, delimitações imprecisas das margens de segurança pode ocasionar a reincidência da doença, muitas vezes bem mais agressiva.

Quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer é denominada, quimioterapia antineoplásica. A quimioterapia pode ser usada em combinação com a cirurgia e radioterapia. De acordo com as suas finalidades, a quimioterapia pode ser classificada em: curativa, adjuvante, prévia e paliativa. O primeiro quimioterápico antineoplásico usado foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado nas duas guerras mundiais como arma química. Quando expostos a esse agente químico os soldados apresentavam uma hipoplasia medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento de linfomas malignos. A partir das publicações de casos clínicos em 1946, com a utilização do gás mostarda e da observação dos efeitos do ácido fólico em crianças com leucemia, verificou-se um avanço crescente da quimioterapia antineoplásica, uma vez que acarretam maior dano às células malignas do que às normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos desses dois tipos de células. A maioria das drogas utilizadas em quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo nos processos genéticos das células, e com uma maior compreensão do ciclo celular normal. A partir desse conhecimento pode-se classificar os quimioterápicos conforme sua atuação sobre o ciclo celular [13]:

- Ciclo-inespecíficos – Aquelas que atuam nas células que estão ou não no ciclo proliferativo, por exemplo, a mostarda nitrogenada.
- Ciclo-específicos – Os quimioterápicos que atuam somente nas células que se encontram em proliferativo, por exemplo, a ciclofosfamida.
- Fase-específicos – Aqueles que atuam em determinadas fases do ciclo celular, por exemplo, o metotrexato.

Atualmente, quimioterápicos mais ativos e menos tóxicos encontram-se disponíveis para uso na prática clínica. Os agentes utilizados no tratamento de câncer afetam tanto as células normais como as neoplásicas. Os agentes antineoplásicos mais empregados no tratamento do câncer incluem os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os antibióticos antitumorais, os inibidores mitóticos e outros. As drogas quimioterápicas apresentam uma série de efeitos colaterais indesejáveis. Em geral, estas drogas afetam o crescimento celular, especialmente das células que se multiplicam rapidamente, como as células tumorais. Entretanto existem células normais que também têm multiplicação rápida, como as células de defesa do sangue, que combatem infecções, as células que recobrem o aparelho digestivo e as células dos folículos pilosos. Em consequência disso os pacientes apresentam sérias reações adversas, tais como menor resistência a infecções, perda de apetite, náuseas, vômitos, diminuição da salivação e queda de cabelo. A resistência às drogas é um outro aspecto que deve ser considerado na quimioterapia. O fenótipo de resistência a múltiplas drogas pode ser intrínseco ou adquirido e representa um dos principais problemas que comprometem o sucesso deste tipo de terapia do câncer. Os tumores, que inicialmente respondem ao tratamento, podem adquirir resistência ao tratamento subsequente e deixar de responder à quimioterapia.

Radioterapia consiste de um método de erradicação do câncer através da aplicação de radiações ionizantes. Uma dose previamente calculada de radiação é aplicada, em um intervalo de tempo controlado, na região envolvendo o tumor, com uma margem de segurança, buscando destruir todas as células tumorais, com o menor dano possível aos tecidos vizinhos normais. A radioterapia pode ser usada em combinação com a cirurgia. Ela pode ser curativa, remissiva, profilática, paliativa e ablativa. São várias as fontes de energia utilizadas na radioterapia. Existem aparelhos que geram radiação a partir da energia elétrica, liberando raios X e elétrons, ou a partir de fontes de isótopos radioativos, por exemplo, pastilhas de cobalto, que geram raios gama, [14]. Esses aparelhos são usados como fontes externas, sendo aplicados mantendo-se uma certa distância da pele. Estas técnicas constituem a radioterapia clínica e são usadas em tratamentos superficiais a profundos, dependendo da qualidade da radiação gerada pelo equipamento. Pode-se ainda realizar aplicações internas em que os isótopos são introduzidos no interior do tumor, conhecida como braquiterapia. Dependendo da profundidade da lesão, os instrumentos para o tratamento devem ser adequados a propiciar a dose necessária para a destruição do tecido lesionado, por exemplo, em terapias superficiais utilizam-se doses entre 10 – 60 eV (Raios X) e em terapias profundas utilizam-se doses 1,25 – 40 MeV (Raios gama de alta energia e aceleradores de elétrons) [15].

Na radioterapia, o tecido neoplásico é cuidadosamente exposto à radiação ao mesmo tempo em que a exposição das células normais é minimizada. O objetivo da radioterapia é a destruição das células neoplásicas antes que a radiação promova um dano muito extenso ao tecido normal. A radioterapia apresenta alguns efeitos colaterais,

esses efeitos podem ser imediatos e tardios. Os efeitos imediatos se manifestam como náuseas e vômitos, pois as células da mucosa gástrica são particularmente sensíveis à radiação. Manifestam-se por atrofias e fibroses [15].

Essas três modalidades de tratamento apresentam uma boa resposta para muitos tipos de câncer, mas apresentam efeitos colaterais indesejáveis e em alguns casos não apresentam respostas. Este fato tem levado à busca de novas modalidades terapêuticas para o tratamento do câncer.

1.2 – A Terapias Fotodinâmica – PDT

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade de tratamento que, apesar de ser conhecida e estudada desde o início do século passado, teve seu impulso retomado como uma terapia para o câncer somente no início da década de 70 com os experimentos de Dougherty [5]. A PDT se caracteriza por um conjunto de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem após a administração de uma droga, retida preferencialmente nos tecidos tumorais, seguida pela irradiação com luz visível [16]. O agente fotossensibilizador é administrado por injeção intravenosa na corrente sanguínea e se distribui pelos tecidos onde é absorvido pelas células. Um fotossensibilizador é uma substância capaz de absorver fótons quando integrado a um sistema que ao ser irradiado produz efeitos específicos que não ocorrem na ausência de luz. Estas substâncias apresentam uma capacidade de acumulação seletiva em tecidos tumorais e permanecem por mais tempo nas células tumorais do que nas células normais, devido às modificações metabólicas decorrentes da neoplasia [16]. Quando as células tumorais tratadas são irradiadas, o fotossensibilizador absorve luz e inicia uma reação em cadeia produzindo

espécies reativas de oxigênio que destroem as células tumorais. A exposição à luz deve ser acompanhada cuidadosamente e iniciada somente quando a maior parte do agente fotossensibilizador já tiver sido eliminada das células sadias, mas ainda existindo uma concentração significativa nas células tumorais. A fotossensibilização pode ser definida como um conjunto de processos que induzem o sistema a tornar-se sensível à luz.

A PDT vem sendo utilizada nos Estados Unidos, Canadá, Europa, Rússia e Japão, [17], há vários anos para alguns tipos de tumores, com resultados bastante promissores. Atualmente, a PDT vem sendo desenvolvida e aperfeiçoada por muitos grupos em todo o mundo e a cada ano surge um grande número de drogas com potencial para serem utilizados como fotossensibilizadores em PDT. No Brasil, somente em 1999 foram realizadas as primeiras aplicações, em caráter experimental, da Terapia Fotodinâmica, pelo Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos, em parceria com o Hospital Amaral Carvalho, de Jaú, [18], utilizando-se como fotossensibilizador o Photogem[®], de origem russa.

A PDT é uma modalidade de tratamento que permite a completa restauração do tecido e pode ser repetida quantas vezes forem necessárias, sendo indicada em casos de lesões recentes [16]. Além disso, a PDT é uma terapia, na qual o efeito é obtido combinando dois componentes que isoladamente não apresentam toxicidade: a luz e o fotossensibilizador. Trata-se de um procedimento não invasivo, que pode inclusive ser realizado em ambulatório, o processo de cicatrização e o aspecto estético são superiores após a PDT do que com as outras terapias convencionais. A PDT causa alterações mínimas nos tecido adjacente e seu custo é menor do que o dos outros tratamentos para o câncer [19].

Qualquer fonte de luz que tenha características espectrais apropriadas pode ser utilizada em PDT, tais como lâmpadas de tungstênio ou halogênio, laser (Light Amplification by Stimulated Emission) e LED (Light-Emission Diode), [20]. Entretanto, os avanços na tecnologia laser têm contribuído muito para o desenvolvimento da terapia fotodinâmica. Sendo uma fonte de luz monocromática, coerente e de alta intensidade, a luz laser permite estimular de modo eficiente os níveis de energia das moléculas do fotossensibilizador. Sua utilização como fonte de luz em PDT, em substituição às lâmpadas convencionais tem facilitado os procedimentos e reduzido o tempo de aplicação da luz nos pacientes. A principal vantagem do laser é a possibilidade de acoplamento a fibras ópticas, o que torna possível irradiar tumores internos localizados em cavidades [21], que são regiões de difícil acesso. O tipo de laser mais utilizado em terapia fotodinâmica é o laser de corante bombeado com laser de argônio. Entretanto, este sistema é caro, grande, e requer a presença de um técnico para aplicação e manutenção, mas possuem a vantagem de ser adaptado aos novos medicamentos. Um dos mais recentes avanços é a utilização dos lasers de diodo, pois se trata de um sistema mais compacto, facilitando sua utilização em consultórios médicos. Além disso, seu custo representa aproximadamente um quarto do custo de um laser de corante, embora esteja restrito a um único comprimento de onda.

1 . 2 . 1 – Principais mecanismos de ação da terapia fotodinâmica

Pelos princípios de ação da PDT, podemos dizer que ela é uma espécie de foto-quimioterapia. Os fotossensibilizadores, de primeira geração, são moléculas heterocíclicas grandes que absorvem luz. Quando estas moléculas são irradiadas com luz

visível, um elétron é excitado do estado fundamental para o estado singlete. Este elétron pode retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou passar para o estado tripleto, de menor energia, através de cruzamento intersistema (do inglês inter-system crossing – ISC) [22]. De acordo com as regras de seleção, este processo não é permitido, pois ele requer uma inversão de spins e a probabilidade para que ele ocorra é menor do que para os processos permitidos. Entretanto, uma das propriedades desejáveis para um bom fotossensibilizador é a alta eficiência para sofrer cruzamento intersistema. Como o tempo de vida do estado tripleto é relativamente longo (10^{-3} a 10 segundos) [16], o fotossensibilizador excitado pode interagir com moléculas vizinhas. Esta interação pode ocorrer através de dois mecanismos principais [3]:

a) mecanismo tipo I ou via formação de radical: o sensibilizador no estado excitado pode agir abstraindo um átomo de hidrogênio de uma molécula de substrato ou transferindo elétrons. Os radicais assim formados podem reagir com oxigênio dando origem a uma variedade de produtos oxidados de alta energia ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ou $\cdot OH$) que provocam lesões celulares e a subsequente morte da célula. Representando o substrato biológico como SB, o sensibilizador no estado fundamental com carga positiva como S^+ e com carga negativa como S^- , pode-se escrever a reação da seguinte forma:

Há uma competição entre os dois mecanismos e os produtos das reações são diferentes. Os dois processos também podem ocorrer simultaneamente, sendo que a proporção entre eles é altamente influenciada pelo sensibilizador, pelo substrato, pela concentração de oxigênio e pela ligação do sensibilizador ao substrato [16].

b) mecanismo tipo II ou via formação de oxigênio singleto: o fotossensibilizador no estado tripleto transfere energia ao oxigênio molecular no estado fundamental (tripleto) produzindo oxigênio singleto. O oxigênio singleto é uma forma reativa de oxigênio e é considerado o principal mediador do dano fotoquímico causado à célula por muitos fotossensibilizadores. O oxigênio singleto pode se difundir a uma pequena distância antes de ser desativado e voltar ao estado fundamental ou então sofrer várias reações com substratos biológicos, tais como oxidação e cicloadição, que são bastante destrutivas aos processos biológicos [23]. Representando o fotossensibilizador no estado tripleto como $^3S^*$, o oxigênio molecular como 3O_2 e o oxigênio singleto como 1O_2 , pode-se escrever a reação da seguinte forma:

A eficiência com a qual um fotossensibilizador transfere a energia absorvida da luz para o oxigênio no estado tripleto é definida como o rendimento quântico de formação de oxigênio singleto e constitui uma outra propriedade fotofísica importante.

As propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores em solventes puros e em meios biológicos diferem significativamente e o estudo da interação do fotossensibilizador com a célula a nível molecular durante a PDT é difícil. Existem somente evidências da produção de oxigênio singleto em sistemas biológicos, pois seu tempo de vida é muito curto (4×10^{-6} segundos em água, $(50 - 100) \times 10^{-6}$ segundos em lipídeos e 0.6×10^{-6} segundos no ambiente celular [16]), o que impede sua observação direta. Moan et al, [24], demonstraram que o raio de ação do oxigênio singleto é menor que $0,1 \mu m$.

Para a maioria dos fotossensibilizadores, com exceção de algumas cianinas, a PDT é fortemente dependente de oxigênio. Desta forma, a disponibilidade de oxigênio local pode se tornar um fator limitante para a produção de oxigênio singlete. Em tecidos nos quais o oxigênio está ausente ou presente em níveis insuficientes, o tratamento por PDT pode ser inadequado podendo resultar em recorrências do tumor ou no desenvolvimento de metástases. Estudos com derivado de hematoporfirina mostraram que quando o oxigênio está presente em quantidade insuficiente, às células são resistentes ao tratamento. O efeito da oxigenação em câmara hiperbárica em associação com a PDT no tratamento de tumores em ratos, utilizando derivado de hematoporfirina (do inglês, Hematoporphyrin Derivative, ou HpD), verificou a existência de uma proporcionalidade entre o dano celular e o fornecimento de oxigênio [25].

1 . 2 . 2 – Propriedades de um fotossensibilizador ideal

Para que uma substância possa ser utilizada como fotossensibilizador em PDT, é desejável que ela seja hidrossolúvel, apresente composição química definida e seja fluorescente para que possa ser visualizada. Um bom fotossensibilizador também deve apresentar mínima toxicidade no escuro, ser retido preferencialmente pelos tecidos tumorais e ser eliminado rapidamente do organismo. A razão entre a quantidade de sensibilizador acumulado no tumor em relação ao tecido normal ao redor ou distante deve ser alta [26]. Para a maioria dos sensibilizadores utilizados a razão tumor/tecido varia de 2/1 a 5/1. Além disso, o fotossensibilizador deve apresentar uma absorção significativa acima de 650 nm, onde os tecidos são transparentes à luz e apresentar um elevado rendimento quântico de formação de radicais de oxigênio.

O mecanismo envolvido na distribuição preferencial dos sensibilizadores no tecido tumoral ainda não está completamente elucidado e acredita-se que diferenças existentes entre os tecidos tumoral e normal contribuam para esta distribuição seletiva. Dentre as propriedades que diferenciam o tecido tumoral do tecido normal pode se destacar [5]:

- a) grande número de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (do inglês Low Density Lipoprotein, ou LDL): a captação do sensibilizador é controlada pela hidrofobicidade ou estado de agregação da droga. Sensibilizadores hidrofóbicos (tais como porfirinas ou ftalocianinas monossulfonadas) ou agregados de porfirina (tais como oligômeros de HpD) são transportados por lipoproteínas. Muitos tipos de células tumorais expressam um grande número de receptores de membrana para LDL devido à grande exigência de colesterol para a biossíntese de membrana [27].
- b) presença de macrófagos [5]: foi demonstrada que os macrófagos associados a tumores captam grande quantidade de hematoporfirina e Photofrin e degradam a parte protéica. Os macrófagos seriam de origem do próprio hospedeiro, em sua maioria derivados dos monócitos da circulação sanguínea.
- c) baixos valores de pH do fluido intersticial [5]: o fluido intersticial é o fluido que circula entre a membrana das células e as paredes dos vasos que irrigam os tecidos. O pH de tecidos tumorais é freqüentemente menor do que o de tecidos normais. No tecido tumoral a microvasculatura está bastante alterada e o fluxo sanguíneo reduzido; conseqüentemente, as células tumorais passam a utilizar a via anaeróbica e produzem grandes quantidades de ácido lático, diminuindo o pH de tecidos normais humanos que

se situa entre 7,2 e 7,4, enquanto que o pH de tecidos tumorais fica em torno de 6,77 [28].

d) estrutura do estroma tumoral: caracterizado por um grande espaço intersticial, vasculatura interrompida, comprometimento da drenagem linfática, uma grande quantidade de colágeno novo e uma grande quantidade de lipídeos. Além disso, a membrana celular das células tumorais é mais hidrofóbica [29].

A distribuição de luz no tecido é uma função complexa de propriedades ópticas do tecido [16]. A absorção e o espalhamento da luz são dependentes do comprimento de onda. Os tecidos normais contêm muitas substâncias que absorvem ou refletem radiação eletromagnética. As proteínas e o DNA absorvem na faixa do ultravioleta (200-350nm), a melanina absorve em comprimentos de onda em torno de 400nm e a hemoglobina absorve no intervalo de (542-576nm) do espectro visível. A água absorve na região do infravermelho próximo [30]. Desta forma, resta apenas uma faixa do espectro eletromagnético (600-762nm) na qual os tecidos são relativamente transparentes. Esta faixa é conhecida como “janela terapêutica” e pode ser utilizada na terapia fotodinâmica. No visível, a luz com comprimentos de onda maiores penetram mais no tecido biológico. Na região entre 600 e 700 nm não há competição dos cromóforos endógenos e a profundidade de penetração no tecido é de 1 a 5 cm.

1 . 2. 3 – Porfirinas

Uma classe de compostos químicos muito utilizada como fotossensibilizador é a das porfirinas [31]. As porfirinas são derivadas da porfina e contêm quatro anéis pirrólicos ligados entre si por átomos de carbono em um sistema altamente conjugado.

Elas diferem entre si quanto à posição dos substituintes. Devido a este tipo de sistema altamente conjugado, suas transições eletrônicas encontram-se na faixa do visível e ultravioleta próximo. A figura 1.2 mostra a estrutura básica da porfirina. Os quatro anéis pirrólicos são numerados pelos algarismos romanos (I a IV) e os quatro carbonos das metinas (ou também posições meso) são identificados pelas letras gregas α , β , γ e δ .

Figura 1.2: Estrutura básica das porfirinas

As porfirinas e seus derivados constituem uma classe de moléculas que desempenham papéis vitais no funcionamento de muitos sistemas bioquímicos como a fotossíntese, a transferência de elétrons na cadeia respiratória bem como o transporte e armazenamento de oxigênio. O sistema ferro-hemoglobina funciona como grupo prostético da hemoglobina, está presente nos citocromos e em enzimas como a catalase e a peroxidase [7]. As porfirinas também são encontradas complexadas com outros metais e a mais conhecida delas é a clorofila, na qual o anel porfirínico se encontra coordenado com o magnésio [32]. O sistema de porfirina apresenta-se altamente conjugado, possuindo uma banda de absorção intensa em torno de 400 nm e quatro bandas menos

intensas na região do visível (figura 1.3). A figura 1.3 indica que comprimentos de onda próximos a 762 nm devem ser os mais apropriados na PDT.

Figura 1.3: Espectro de absorção das porfirinas e o perfil de transmissão dos tecidos.

a – Photofrin®

Os sensibilizadores mais utilizados em estudos clínicos têm sido o derivado de hematoporfirina, sob o nome comercial de Photofrin I, e o éter/éster de dihematoporfirina (do inglês, dihematoporphyrin ether/esther, ou DHE), ou Photofrin II. O Photofrin I não é mais utilizado, uma vez que o Photofrin II apresenta maior pureza, sendo denominado somente como Photofrin® [33]. O Photofrin® consiste em uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirina unidas por ligações éter ou éster. O espectro de absorção eletrônica do Photofrin® contém cinco bandas de absorção, sendo uma banda intensa na região de 400 nm, conhecida como banda de Soret e quatro de menor intensidade em comprimentos de onda maiores, conhecidas como bandas-Q.

b – Photogem®

O Photogem® é um derivado de hematoporfirina DHE, semelhante ao Photofrin®, apresentando algumas características diferentes. Facilmente solúvel em água e solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%. Praticamente insolúvel em álcool a 95%, clorofórmio. Sendo uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros, a estrutura química fundamental do Photogem®, [34], é mostrada na figura 1.4.

Figura 1.4: Estrutura química do Photogem®.

Onde: R_1, R_2 – $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$, $\text{CH}=\text{CH}_2$ ou porfirina, R_3, R_4 – H ou porfirina, $n = 1-5$.

Com peso molecular aproximado de 598 – 2920.

O Photofrin® e o Photogem® são conhecidos como fotossensibilizadores de primeira geração [35], e são eficazes para a maioria dos tumores que podem ser tratados por PDT. Entretanto, eles não são os fotossensibilizadores ideais. Uma de suas principais desvantagens é o fato de apresentarem elevada retenção cutânea, causando efeitos colaterais indesejáveis. A pele dos pacientes se torna fotossensível e eles devem se

proteger da exposição à luz solar ou luz brilhante por um período de 4 a 8 semanas, que é o tempo de retenção desta droga na pele. Mesmo assim a irradiação é feita em 630 nm devido a dois principais fatores: em 400 nm vários constituintes celulares absorvem luz causando interferências, e em comprimentos de onda menores a penetração de luz nos tecidos é menor do que em 620nm.

Outra desvantagem desses fotossensibilizadores é que eles são uma mistura complexa da qual não é possível isolar um único constituinte. Além disso, ocorre a formação de agregados em diferentes extensões e diferentes ambientes, o que resulta em alterações na eficácia terapêutica da droga [16].

Ao serem excitadas com luz, as porfirinas emitem uma fluorescência no vermelho. Portanto, a exposição de tecidos tumorais e tecidos normais circundantes à luz ultravioleta gera uma fluorescência intensa do tumor, que contrasta com a fluorescência menos intensa do tecido normal. Esta propriedade das porfirinas possibilita a utilização do fotodiagnóstico (do inglês Photodynamic Diagnosis – PDD) para diagnóstico e delimitação de tumores em estágio inicial, que dificilmente poderiam ser detectados por outras técnicas, como por exemplo, através de raios-X [36].

Devido a estas características indesejáveis, estão sendo estudadas novas drogas com potencial para utilização como fotossensibilizadores. É desejável que estas substâncias, conhecidas como fotossensibilizadores de segunda geração sejam tão eficientes quanto as atuais, mas que não apresentem os efeitos colaterais acima mencionados e que absorvam luz em comprimentos de onda maiores.

1 . 2 . 4 – Transporte e localização intracelular dos fotossensibilizadores

A propriedade mais interessante das porfirinas como agentes anticâncer na terapia fotodinâmica é sua seletividade, ou seja, a injeção intravenosa desta droga resulta em grandes concentrações nos tecidos tumorais. Apesar deste fato ser conhecido há muito tempo, o mecanismo de ação através do qual as porfirinas se acumulam nos tumores ainda não está completamente elucidado. As lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (LDL), são eficientes transportadores de porfirinas hidrofóbicas no sangue e podem liberar estes fotossensibilizadores nos tecidos tumorais através de receptores específicos [27]. Como a migração do oxigênio singlete do local onde foi formado é limitada, os sítios de danos a células e tecidos estão intimamente relacionados à localização do sensibilizador.

Entre os vários alvos celulares, a terapia fotodinâmica induz dano à membranas. Substâncias aniônicas lipofílicas parecem causar peroxidação lipídica de membranas em geral, incluindo a membrana plasmática, mitocondrial, lisossomal, do retículo endoplasmático e nuclear [37]. A peroxidação do colesterol de membranas e outros fosfolípidos insaturados leva a alterações na permeabilidade de membranas, perda de fluidez, formação de ligações cruzadas entre lípidos e polipeptídeos bem como a inativação de sistemas enzimáticos e receptores associados a membranas. De acordo com os dados da literatura, os agregados de porfirina e os sensibilizadores hidrofílicos são captados por pinocitose ou endocitose localizando-se nos lisossomos ou endossomos [38]. Sensibilizadores que se localizam nas mitocôndrias, como o Photofrin[®] ou que são produzidos nelas, como a protoporfirina IX a partir do ácido aminolevulínico (ALA), parecem induzir apoptose, [39].

1 . 2. 5 – Considerações sobre dosimetria.

Um aspecto fundamental em toda terapia para o tratamento de câncer consiste no desenvolvimento de uma dosimetria eficiente e segura. Em cirurgia a eficácia do tratamento está relacionada com a capacidade e experiência do cirurgião, ao analisar os exames patológicos, para a delimitação das margens de segurança. Na quimioterapia a dose de medicamento utilizado está relacionada com a resposta individual de cada paciente e do alvo celular em que o composto químico irá atuar, [13]. Em radioterapia existe uma dosimetria bem estabelecida para a aplicação da radiação em diferentes tipos de lesão, sendo avaliados a quantidade de energia usada, o volume do tumor e a assimilação da radiação pelas células, [14]. Como a PDT é uma terapia relativamente nova, ainda existem muitos pontos a serem analisados quanto à dosimetria utilizada em casos clínicos. No diagrama abaixo, figura 1.5, estão relacionados os principais aspectos a serem considerados no desenvolvimento de uma dosimetria em PDT.

Figura 1.5: Diagrama esquemático dos principais aspectos a serem abordados em dosimetria para PDT.

Este diagrama mostra os principais aspectos a serem investigados, quando desenvolvemos um sistema de dosimetria adequado para aplicações em PDT. Cada item descrito no diagrama tem sua importância. A fotodegradação dos fotossensibilizadores é bastante importante, pois se sabe que os fotossensibilizadores são degradados ao serem irradiados [28], tendo como principal fator a intensidade luminosa. Quanto maior a degradação do medicamento, menor será a eficiência da reação fotodinâmica, uma vez que a molécula degradada não poderá ser novamente excitada. A farmacocinética descreve a distribuição do medicamento no tecido alvo. A utilização da fluorescência auxilia este monitoramento, possibilitando uma aplicação controlada [40]. Verificar a quantidade de luz que foi absorvida pelo tecido facilita o estudo da eficiência da PDT, uma vez que a interação entre a luz e o tecido biológico depende, em grande parte, das características ópticas do tecido alvo. Sendo assim, os tipos teciduais apresentarão profundidade de penetração e coeficiente de absorção diferentes, levando a respostas diferentes quando iluminados com os mesmos parâmetros, como por exemplo, a pele e a mucosa. Os mecanismos de morte celular são cruciais, pois possibilitam a compreensão do que está ocorrendo no interior das células. A geometria da lesão, embora seja um parâmetro importante, não será abordado neste trabalho. Procurando elucidar alguns pontos ainda intrigantes da PDT, neste trabalho analisamos quatro aspectos do diagrama: a fotodegradação, a farmacocinética, a penetração da luz e a morte celular, procurando inter-relacionar os resultados obtidos em cada parâmetro analisado.

II – Objetivo

Neste trabalho temos por objetivo estudar os aspectos relevantes da Terapia Fotodinâmica (PDT), para o desenvolvimento de uma metodologia de dosimetria, observando alguns aspectos descritos abaixo:

- I. Investigar a fotodegradação do fotossensibilizador é um aspecto importante em um modelo de dosimetria, pois os fotossensibilizadores sofrem modificações durante o processo de iluminação alterando a eficiência da terapia.
- II. Estudar a dinâmica de distribuição do fotossensibilizador em tecidos nos proporciona uma ferramenta para determinarmos o tempo de exposição da fonte de luz, para os diferentes tecidos.
- III. Entender os mecanismos de morte celular que determinam a ação do sensibilizador no tecido, sendo assim de vital importância o entendimento desses mecanismos.
- IV. Verificar a penetrabilidade da luz em tecidos biológicos nos permite determinar o quanto de luz chegou ao tecido alvo.

Dividimos o trabalho em capítulos, onde são investigadas as situações descritas acima.

III – Análise da estabilidade do PHOTOGEN[®] através de técnicas espectroscópicas

3.1 – Introdução

A resistência dos corantes à fotodegradação é um tema que vem preocupando os cientistas há décadas. O desaparecimento gradual dos corantes têxteis expostos à luz do dia foi descrito inclusive em crônicas Romanas. Nos primeiros estudos sobre corantes, a luz do sol foi apontada como o responsável pelo desaparecimento gradual de certos corantes têxteis. Os primeiros estudos sistemáticos em corantes sobre sua resistência ao ar e a luz solar, foram realizados no início do século dezoito. Mas no final do século dezoito, Seneibier e depois Bancroft [4] iniciou a discussão sobre os mecanismos químicos envolvidos no “*photofading*” e Bancroft sugeriu que os processos de fotoclareamento poderiam ser ou oxidativos ou redutivos. Outros estudos mostraram que a luz solar, a umidade e a quantidade de oxigênio tem um grande efeito na degradação de corantes têxteis. Desde então, houve progresso no entendimento do mecanismo da fotodegradação dos corantes. Os mecanismos não são simples e a natureza dos produtos da fotodegradação não tem sido freqüentemente determinada. Em geral, o efeito acelerativo do oxigênio foi reconhecido e foi sugerido que o oxigênio singlete e espécies associadas são responsáveis pelo “*photofading*” de certos corantes. O interesse na fotodegradação dos corantes e pigmentos em muitos campos evoluiu através dos anos, com os avanços tecnológicos e científicos. Atualmente, essas propriedades são relevantes em uma variedade de campos, incluindo as aplicações terapêuticas

III – Análise da estabilidade do PHOTOGEN[®] através de técnicas espectroscópicas

envolvendo corantes ou outras substâncias fotossensíveis. Com a utilização do laser em fotomedicina, ficou evidente a importância da fotodegradação de medicamentos terapêuticos, cujo meio de ação ocorre através da incidência de luz.

Na literatura vários termos são empregados na degradação dos corantes e pigmentos sob irradiação. Os mais frequentemente usados são “*photofading*”, e “*photobleaching*”. Em fotoquímica e fotobiologia, o termo fotocclareamento (ou clareamento) é amplamente usado e é definido como a diminuição da absorção, [31]. Em sistemas biológicos existem substâncias que absorvem determinados comprimentos de onda, ou como proteção ou para desempenhar suas funções no organismo. Essas substâncias são os cromóforos, e.g., em vegetais encontramos a clorofila e nos mamíferos a hemoglobina.

Existem dois tipos irreversíveis de fotodegradação que levam a mudanças fotoquímicas em cromóforos, [4]:

I – Fotomodificação, quando a perda na absorção ou fluorescência ocorre para alguns comprimentos de onda, mas o cromóforo é mantido em uma forma modificada. Com a diminuição da intensidade dos picos de absorção do espectro original e o surgimento de uma nova banda de absorção.

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

Onde ocorre fotomodificação, frequentemente ocorre o fotocclareamento. O caminho para a fotomodificação ou fotocclareamento pode ser muito variado. Fotoadição e fotoisomerização podem ser acompanhadas pela perda de cromóforos e processos com

transferência de elétrons podem levar a formação de bandas amplas deslocadas para o vermelho, embora essas mudanças podem frequentemente ser invertida. A fotoredução irreversível pode ocorrer na irradiação na presença de um agente redutor. Fotoredução de porfirinas ocorrem pela adição de hidrogênio em sítios selecionados para nitrogênios *meso*- e β -, sob condições dependentes.

Em PDT, a maioria dos estudos do fotodegradação mostra a necessidade do oxigênio, sendo o processo oxidativo e envolvendo oxigênio singlete ou radical de espécies reativas de oxigênio. Em solução fica evidente a obtenção de oxigênio singlete e fotoquimicamente o oxigênio singlete é um reagente valioso em síntese química. Em sistemas vivos existe uma grande dificuldade em estabelecer a natureza do mediador. Alguns estudos indicam que a fotodegradação do PHOTOFRIN[®] e da protoporfirina são mediados via oxigênio singlete, [41].

Neste capítulo realizamos um estudo sobre a estabilidade do fotossensibilizador PHOTOGEM[®] (PTG), um derivado de hematoporfirina (DHP). Esse medicamento é solúvel em água e em dimetil sulfoxido (DMSO), e insolúvel em álcool e clorofórmio, [42]. Recentemente foi aprovada pelo Ministério da Saúde a utilização desse medicamento no Brasil, em procedimentos médicos na terapia fotodinâmica (PDT). Considerava-se a porfirina fotoquimicamente estável durante o tratamento, podendo ser ativada indefinidamente produzindo o efeito terapêutico desejado. Um sistema de ligações duplas conjugadas nos núcleos tetrapirrólicos é responsável por sua absorção no ultravioleta próximo e visível. Uma propriedade importante dessa porfirina é a emissão de fluorescência no vermelho, quando excitada com 400 nm. Por causa desse efeito, medidas de fluorescência são usadas para quantificar anéis tetrapirrólicos, [43].

Entretanto, foi observado a fotodegradação de DHp em cultura de células, [44]. A diminuição da fluorescência de porfirinas (fotoclareamento) foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* durante sua iluminação. Quando tumores e células contendo DHp são expostas à luz de comprimento de onda adequado, são observadas mudanças no espectro de fluorescência da porfirina, que se manifesta como um decaimento na intensidade de emissão. Existem três possíveis explicações para estas modificações: (a) a fotodestruição do macrociclo da porfirina resultando na diminuição da absorção e fluorescência, (b) modificações químicas fotoinduzidas nas porfirinas mantendo o macrociclo da porfirina intacto, (c) deslocamento fotoinduzido da porfirina para localizações diferentes nas células.

Alguns estudos mostram que variações de temperatura induzem modificações no espectro de fluorescência de sensibilizadores incorporados a lipossomos [37], indicando a necessidade de um estudo considerando variações de temperatura como parâmetro importante. Outro fator que influencia o espectro de fluorescência das porfirinas, são variações de pH em solução [32].

Neste trabalho, procurando investigar a estabilidade do Photogem realizamos os estudos em solução devido à reprodutibilidade dos ensaios. O medicamento foi submetido a diferentes condições: variação da dose de irradiação e comprimento de onda, alteração do pH da solução, variação de temperatura e do tipo de solvente usado.

3.2 – Objetivo

Investigar, através de espectroscopia de absorção e fluorescência, a estabilidade do fotossensibilizador PHOTOGEM[®], submetido a diferentes condições de pH, temperatura, iluminação e solventes.

3.3 – Materiais e Métodos

O fotossensibilizador PHOTOGEM[®] foi caracterizado através de medidas de absorção e fluorescência, onde variamos alguns parâmetros tais como: concentração, solvente, pH e irradiação.

3.3.1 – Espectroscopia de fluorescência e absorção

Utilizamos as técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência, uma vez que a molécula de PTG é alterada através de modificações eletrônicas. No apêndice fazemos uma descrição dos princípios básicos das duas técnicas utilizadas.

Antes e após as irradiações foram realizadas medidas de absorção em espectrofotômetro (UV-1601PC Shimadzu). As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro (HITACHI-4500), em uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 5,0 mm.

O sistema de irradiação das amostras, figura 3.1, consistiu de um laser de íons de argônio (*Coherent*, modelo innova-100), acoplado a uma fibra óptica de 600 µm de diâmetro, as amostras foram irradiadas com uma incidência normal da luz laser.

Figura 3.1: Sistema laser usado para irradiar as amostras de PTG.

a – Variação de concentração

A resposta terapêutica depende da concentração do fármaco na lesão, então decidimos investigar a fotodegradação em diferentes concentrações. Para preparar uma solução estoque utilizamos 5,0 mg de medicamento em 1,0 ml de água destilada. Dessa solução estoque diluímos em solução salina tamponada com fosfato (PBS), com pH 7, 4 e retiramos as alíquotas correspondentes para preparação das cinco concentrações usadas no experimento: 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/ml}$. Irradiamos 10 ml de cada amostra em um béquer, revestido externamente com papel alumínio, com o comprimento de onda de 514 nm e uma potência de 0,2 W. A potência do laser foi aferida através de um medidor de potência (*Coherent*). Antes e após as irradiações foram realizadas medidas de absorção e fluorescência das amostras.

b – Variação de solvente

Investigamos a relação existente entre a fotodegradação e dois solventes diferentes. Para tanto, realizamos medidas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), e dimetil sulfoxido (DMSO). Os solventes usados são polares. Usamos uma

III – Análise da estabilidade do PHOTOGEM® através de técnicas espectroscópicas

concentração de 25 µg/ml, preparada a partir de uma solução estoque de PTG de 5,0 mg em 1,0 ml de água destilada e dissolvemos 5,0 mg/ml em 200ml de PBS, com pH 7, 4, em balão volumétrico. Irradiamos 10 ml de cada amostra em um béquer, revestido externamente com papel alumínio, com o comprimento de onda de 514 nm e uma potência de 0,5 W. O sistema de irradiação das amostras foi semelhante ao descrito no item anterior. Cada amostra foi irradiada individualmente nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Foram realizadas medidas de absorção e fluorescência antes e após as irradiações.

c – Variação de pH

Na variação de pH utilizamos as concentrações de 25 µg/ml de PHOTOGEM® (PTG), variamos o pH da solução adicionando ácido clorídrico (HCl-0,1N) e hidróxido de sódio (NaOH-0,1N), em “*pHmeter*” (Tecnal) em pH 2-12. Os volumes das amostras foram corrigidos para manter a concentração. As amostras foram irradiadas com laser de íons de argônio na linha de 514 nm, uma potência de 0,2 W, por 20 minutos. Os espectros de absorção e fluorescência foram medidos antes e após as irradiações.

d – Variação da potência de irradiação e comprimento de onda

Nesta seção investigamos a estabilidade do fotossensibilizador PTG, quando exposto a diferentes condições de irradiação. As irradiações foram realizadas segundo a variação de potência e comprimento de onda. Organizamos as medidas nesta ordem:

1 – Na investigação do melhor comprimento de onda para a fotodegradação, realizamos medidas com três comprimentos de onda diferentes: 488 nm, 514 nm e 630 nm. Quando

III – Análise da estabilidade do PHOTOGEN[®] através de técnicas espectroscópicas

variámos o comprimento de onda de irradiação utilizamos a mesma concentração do experimento anterior, 25 mg/ml e PBS (pH 7,4). As amostras foram tratadas com 0,5 W, com uma variação temporal de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos de exposição à irradiação.

2 – O melhor comprimento de onda para a fotodegradação foi 514 nm, como mostrado no item 1, então realizamos medidas nesse comprimento de onda em diferentes potências de irradiação. O sensibilizador foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e pH 7,4, com uma concentração final de 25 µg/ml. As amostras foram tratadas com cinco potências diferentes, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 e 1W, sendo irradiadas com comprimento de onda de 514 nm por 20 minutos, usando o mesmo sistema de irradiação do item a.

3 – Nas medidas de variação de potência encontramos um comportamento não esperado com o aumento da potência. Então decidimos investigar esse comportamento. Por conseguinte, realizamos medidas nos comprimentos de onda de 351 nm e 514 nm, com uma potência de 0,3 W. Variámos a potência para o comprimento de onda de 514 nm. Nesse caso usamos potências de 0,3 e 1 W. As amostras em PBS na concentração de 25 µg/ml sofreram variações temporais de 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Foram realizadas medidas de absorção e fluorescência antes e após as irradiações.

e – Variação da temperatura

As medidas com variação de temperatura foram realizadas com soluções de PTG na concentração de 25 mg/ml em PBS, nos tempos de 10, 20, 30 e 60 minutos. O banho térmico usado no experimento, mostrado na figura 3.2, possui dois termômetros: um

para selecionar a temperatura e outro para averiguar a temperatura do banho. Estudamos o efeito da temperatura como agente de degradação; as amostras foram submersas no banho em tubos de ensaio fixados em um suporte. Então elevamos a temperatura das amostras a 37, 40 e 60 °C. Foram realizadas medidas de absorção e fluorescência após o tratamento térmico.

Figura 3.2: Banho térmico usado nas medidas com variação de temperatura.

3 . 4 – Resultados e Discussão

Apresentamos os resultados obtidos nos experimentos descritos para análise da estabilidade do fotossensibilizador, Photogem[®]. Concomitantemente, discutimos os resultados observando a influência de todos parâmetros usados no experimento e verificando as semelhanças com os relatos da literatura para outros fotossensibilizadores derivados de hematoporfirina.

3.4.1 – Estudo espectroscópico.

Para facilitar a apresentação do trabalho discutimos nossos resultados de acordo com o parâmetro analisado em cada medida.

a – Variação de concentração

Nesta seção analisamos o comportamento espectroscópico do fotossensibilizador através dos espectros de absorção e fluorescência, quando variamos sua concentração em PBS para encontrarmos a melhor condição para realização dos demais experimentos de degradação.

Na figura 3.3, mostramos os espectros de absorção das amostras não irradiadas, nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/ml}$. Não observamos alterações na posição das bandas, apenas um crescimento na intensidade da absorção com o aumento da concentração, seguindo a lei de Beer, apêndice A, como demonstrado na figura 3.4.

Figura 3.3: Espectros de absorção das amostras de Photogen[®], não irradiadas, para diferentes concentrações em PBS. À direita mostramos uma ampliação da região das bandas Q e acima ampliamos a última banda Q.

Figura 3.4: Comportamento do pico de absorção em 370 nm com o aumento da concentração.

Na figura 3.5, mostramos os espectros de absorção das amostras após irradiação com o laser de argônio no comprimento de onda em 514 nm, potência de 0,2 W e um tempo de 20 minutos. Salientamos o detalhe das amostras irradiadas apresentarem alterações na banda de absorção em 620 nm, ao serem irradiadas nas concentrações investigadas, através da ampliação da região das bandas Q, onde podemos ver que o aumento de concentração não altera o comportamento do espectro de absorção.

Figura 3.5: Espectros de absorção das amostras de PTG irradiadas com 514 nm, P = 0,2 W e t = 20 min., para diferentes concentrações. À direita mostramos a ampliação da região das bandas Q e acima ampliamos a última banda Q.

Observamos a formação de fotoprodutos em 640 nm. Mas o alargamento dessa banda indica a existência de duas bandas. Com a diminuição da concentração observamos um decréscimo da emissão em 640 nm, possivelmente devido à formação de agregados, [45].

Os espectros de fluorescência das amostras não irradiadas, com excitação em 507 nm, figura 3.6, mostraram um crescimento da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração e ampliamos a região entre 620 e 660 nm, mostrando que nessa região o espectro apresenta apenas alteração na intensidade de fluorescência.

Figura 3.6: Espectros de fluorescência, com excitação em 507 nm, das amostras em PBS não irradiadas. No detalhe, ampliação da região entre 620 e 660 nm.

Figura 3.7: Espectros de fluorescência, com excitação em 507 nm, das amostras em PBS irradiadas com 514 nm. No detalhe, ampliação da região entre 620 e 660 nm.

Podemos ver na figura 3.7, o surgimento de uma nova banda em 640 nm para todas as concentrações. Observamos que quanto maior for a concentração usada menor será o aumento relativo da nova banda formada. Este comportamento deve-se essencialmente à

formação de agregados quando aumentamos a concentração. Nas concentrações de 25 µg/ml e 50 µg/ml observamos nos resultados um comportamento semelhante. Nestas condições os experimentos apresentaram menor influência do efeito da formação de agregados, sendo então as concentrações apropriadas para os nossos experimentos.

b – Variação de solvente

Este experimento surgiu da necessidade de comparar os nossos resultados com os fornecidos pelo fabricante do medicamento. Neste medicamento usou-se como padrão amostras solubilizadas em DMSO, enquanto em todos os nossos experimentos utilizamos solução aquosa. Logo, necessitávamos caracterizar o medicamento em solução aquosa utilizada em todos os experimentos desenvolvidos em nosso laboratório.

Utilizando a solução tamponada fosfatada PBS 25 µg/ml do PTG, irradiamos as amostras com um laser de argônio na linha de 514 nm, numa potência de 0,5 W, em diferentes tempos de irradiação. Os resultados estão apresentados para cada solvente estudado.

b . 1 – Solução salina tamponada com fosfato – PBS

Inicialmente caracterizamos as amostras em solução tamponada fosfatada (PBS). Para a amostra controle observamos o pico da banda de absorção centrado em 369 nm, e as bandas-Q em 507 nm, 540 nm, 572 nm e 622 nm, figura 3.8. Irradiamos as amostras de PTG, na concentração de 25 µg/ml em PBS, com laser de argônio na linha de 514 nm, na potência de 0,5 W. Observamos uma diminuição na intensidade dos espectros de absorção e o deslocamento da banda de 622 nm para 640 nm. Este comportamento sugere que a irradiação causou modificações estruturais no medicamento, [46]. Segundo

Rotomskis, as porfirinas monoméricas durante a iluminação são excitadas podendo gerar oxigênio singlete, que induzem reações fotoquímicas levando a porfina à auto-oxidação seguida pela destruição do anel tetrapirrólico. Já a formação dos fotoprodutos está intimamente relacionada com o estado agregado das porfirinas.

Figura 3.8: Espectros de absorção das amostras de photogem, em PBS na concentração de 25 µg/ml, com 514 nm, e potência de 0,5 W, no tempo indicado na figura.

Observamos que o surgimento da banda em 640 nm, [47], no intervalo de tempo analisado, fica evidenciado na figura 3.9, onde mostramos a subtração do espectro de absorção da amostra controle. Verificamos que essa nova banda sofre um aumento de intensidade indicando o crescimento da concentração do fotoproducto e verificamos o clareamento das bandas de Soret e Q. Esta é uma característica das porfirinas semelhantes a Hp.

Figura 3.9: Subtração do espectro controle das demais amostras.

A taxa de formação de fotoprodutos pode ser calculada através da equação (3-1), [28]:

$$k = \frac{1}{It} \frac{\Delta A_{640}}{A_{514}} \quad (3-1)$$

com t sendo o tempo de iluminação, I a taxa de fluência de iluminação, ΔA_{640} o incremento na absorção em 640 nm e A_{514} a absorção no comprimento de onda de irradiação. A formação de fotoprodutos é maior com 10 minutos de irradiação, ficando estável nos outros tempos de irradiação, como mostra a tabela 3.I.

Tabela 3.I: Taxa de formação de fotoproduto para diferentes tempos de irradiação.

t (s)	$k_{640} (W^{-1}cm^2s^{-1})$
600	$3,0 \times 10^{-4}$
1200	$2,1 \times 10^{-4}$
1800	$2,3 \times 10^{-4}$
2400	$2,1 \times 10^{-4}$
3000	$2,0 \times 10^{-4}$
3600	$2,0 \times 10^{-4}$

Mostramos na figura 3.10, os espectros de fluorescência das amostras onde verificamos uma banda de emissão centrada em 611 nm e com o decorrer do tempo o surgimento de uma nova banda de emissão em 636 nm com um decréscimo na intensidade da banda em 611 nm.

Figura 3.10: Espectros de fluorescência das amostras em PBS, irradiadas com 514 nm, com excitação em 507 nm.

Na figura 3.11, analisamos a evolução temporal do pico de emissão de fluorescência em 611 nm das amostras irradiadas com 514 nm. Onde observamos um decréscimo na emissão o tempo de exposição das amostras à luz. Notamos que a intensidade de fluorescência do PTG caiu cerca de 51% nas amostras com 60 minutos de irradiação.

Figura 3.11: Evolução temporal do pico de emissão centrado em 611 nm.

A evolução temporal da nova banda de emissão em 640 nm devido à formação de fotoprodutos resultantes da irradiação, figura 3.12.

Figura 3.12: Evolução temporal do pico de emissão centrado em 640 nm.

Analisando as mudanças espectrais detectadas durante a iluminação do PTG, mostrou-se que dois processos estão ocorrendo, o fotoclareamento e a formação de fotoprodutos em 640 nm, [48], que são decorrentes das condições de iluminação das amostras.

b . 2 – Dimetil sulfóxido (DMSO)

As amostras foram diluídas em um solvente polar, DMSO, numa concentração de 25 µg/ml, e irradiadas por um intervalo de tempo de uma hora, com amostras expostas individualmente.

Figura 3.13: Espectros de absorção das amostras de photogem, em DMSO na concentração de 25 µg/ml, com 514 nm na potência de 0,5 W, com variação temporal.

Na figura 3.13, observamos os espectros de absorção das amostras controle e irradiadas, em DMSO, onde observamos uma banda de Soret, centrada em 402 nm, e quatro bandas-Q, 502 nm, 534 nm, 570 nm e 622 nm, como encontrado na literatura, [42].

Verificamos que nas amostras irradiadas com 514 nm, houve uma diminuição na intensidade dos espectros de absorção e o surgimento de uma nova banda em 645 nm. Sendo evidente um deslocamento para o vermelho da banda de Soret e o deslocamento para o azul das bandas Q [49]. Na tabela 3.II mostramos a taxa de formação de fotoprodutos com o tempo, onde observamos uma estabilização na formação dos fotoprodutos para tempos superiores a 40 minutos.

Tabela 3.II: Taxa de formação de fotoproduto para diferentes tempos de irradiação.

t (s)	$k_{645} (W^{-1}cm^2s^{-1})$
600	$7,16 \times 10^{-4}$
1200	$4,0 \times 10^{-4}$
1800	$2,7 \times 10^{-4}$
2400	$2,29 \times 10^{-4}$
3000	$2,0 \times 10^{-4}$
3600	$2,28 \times 10^{-4}$

Figura 3.14: Subtração do espectro controle da amostra controle das demais amostras.

Na figura 3.14, mostramos os espectros obtidos usando a mesma metodologia do item anterior, onde evidenciamos a nova banda através da subtração do espectro da amostra controle, em DMSO. Observamos o crescimento da banda em 645 nm com o tempo, mas observamos uma estabilidade na formação dos fotoprodutos após 40 minutos de irradiação, indicando a existência de um limite na formação de fotoprodutos com o tempo de irradiação.

A diminuição na intensidade dos espectros de absorção é uma característica do fotoclareamento, mas além desse fenômeno observamos o surgimento de uma banda de absorção que caracteriza uma fotomodificação. Logo a exposição desse medicamento à luz acarreta modificações estruturais com formação de fotoprodutos, com descrito na literatura, [50].

Figura 3.15: Espectros de fluorescência, em DMSO, irradiadas com 514 nm e excitação em 507 nm.

Podemos confirmar as alterações nos espectros através dos espectros de fluorescência da amostras excitadas em 507 nm, mostradas na figura 3.15, onde observamos um decréscimo da banda de fluorescência, centrado em 623 nm, e uma nova emissão em 646 nm devido a formação de fotoprodutos. Este comportamento foi evidenciado através da evolução temporal dos picos de fluorescência, mostrados nas figuras 3.16 e 3.17. O decaimento do pico da banda de fluorescência em 623 nm tem uma variação de cerca de 41%.

Figura 3.16: Evolução temporal do pico de emissão centrado em 623 nm, irradiadas com 514 nm e excitação em 507 nm.

Figura 3.17: Evolução temporal do pico de emissão centrado em 650 nm, irradiadas com 514 nm e excitação em 507 nm.

Na figura 3.17, mostramos a evolução temporal da intensidade do pico da nova banda de fluorescência, que apresenta crescimento até 20 minutos de irradiação, sugerindo a formação de fotoprodutos, e decréscimo após 30 minutos, sugerindo a fotodestruição do produto formado. Este comportamento difere do encontrado para as amostras em solução aquosa.

Verificamos um deslocamento no pico da banda de Soret de 30 nm para o vermelho nas amostras em DMSO quando comparadas às amostras em PBS. As amostras em DMSO sofreram um deslocamento de 10 nm, para o vermelho, na banda emissão de fluorescência se comparadas com as soluções em PBS.

As principais diferenças observadas foram com relação às amostras em DMSO, que apresentaram os espectros de absorção e de fluorescência deslocados, em relação às amostras em PBS.

III – Análise da estabilidade do PHOTOGEN[®] através de técnicas espectroscópicas

A banda de absorção de Soret, das soluções em DMSO, sofreu um deslocamento de 30 nm, ou seja, foi para 402 nm, em relação aos espectros obtidos para as amostras em solução aquosa em 369 nm. O DMSO é um solvente fortemente coordenado com um número alto de doadores, [51]. Ele apresenta uma extremidade fortemente “inflexível” (átomos de oxigênio) e uma extremidade “tolerante” (átomos de enxofre), sendo capaz de coordenar os macrociclos de porfirina. Quando dissolvidas em DMSO, numa completa ausência de processos de dimerização, cada molécula de porfirina está localizada entre duas moléculas de DMSO através de ligações de hidrogênio dos grupos de NH no interior do macrociclo e os átomos de oxigênio do DMSO. Essas ligações de hidrogênio são responsáveis pelo deslocamento para o vermelho da banda de Soret e o deslocamento para o azul das bandas Q do PTG em DMSO, com respeito à mesma porfirina em solução aquosa.

Os espectros de fluorescência das amostras em PBS apresentaram uma banda de emissão centrada em 611 nm, sendo que as amostras em DMSO apresentaram um deslocamento de 12 nm, ou seja, suas bandas de emissão estavam centradas em 623 nm. Uma vez que a solução de PBS é polar, podemos relacionar essas diferenças entre as amostras em PBS e DMSO com a adição de prótons ao sistema, embora o fosfato mantenha o pH estável em 7,4.

c – Variação de pH

A literatura relata influência do pH na sensibilidade dos fotossensibilizadores, [52]. A acidez das soluções é um importante fator que afeta o equilíbrio entre as diferentes espécies iônicas de porfirinas, bem como a proporção de monômeros, dímeros

e agregados de cada espécie iônica. Conseqüentemente a fotoestabilidade dos fotossensibilizadores pode ser influenciada por uma mudança na acidez do meio, sendo interessante uma vez que os tumores são freqüentemente encontrados com valores de pH bem menores que os tecidos normais. O intervalo de pH de 5 a 8, pode ser de especial interesse, pois muitos tumores são encontrados com esses valores de pH. Com o propósito de estudarmos essa influência no medicamento em estudo, PHOTOGEM® (PTG), realizamos experimentos em que alteramos o pH das soluções. Mostramos, a seguir, os resultados obtidos para diferentes condições de pH.

Figura 3.18: Espectros de absorção das soluções em PBS, para os pH = 5, 6, 7, 8 e 10, na concentração de 25 µg/ml, não irradiadas.

Na figura 3.18, mostramos os espectros de absorção das amostras não irradiadas, para os pH 5, 6, 7, 8 e 10, na concentração de 25 µg/ml. Para pH 12 a banda de Soret foi deslocada para o vermelho, aproximadamente 4 nm, nas demais bandas não podemos relatar um deslocamento.

Figura 3.19: Espectros de absorção das soluções em PBS, para o pH = 5.

Figura 3.20: Espectros de absorção das soluções em PBS, para o pH = 7.

Figura 3.21: Espectros de absorção das soluções em PBS, para o pH = 10.

Nas figuras 3.19, 3.20 e 3.21, mostramos os espectros de absorção das amostras, em PBS, para os pHs 5, 7 e 10, comparando as amostras irradiadas por 20 minutos, com 514 nm e 0,2 W de potência, com as amostras não irradiadas. A amostra ácida, pH 5, sofreu alterações moderadas com a irradiação, como um decréscimo na intensidade da banda de absorção e seu alargamento indicando a formação de uma nova banda. Todavia, nas amostras com pHs 7 e 10, observamos uma sensibilidade ao efeito da iluminação. Para o pH 10 ficou mais evidente a formação de fotoprodutos, esses foi um comportamento encontrado em todas as amostras básicas estudadas, [53]. Nas figuras 3.22 e 3.23, este comportamento ficou evidenciado, pois mostramos os resultados dos pHs estudados.

Figura 3.22: Comportamento da máxima absorção em 369 nm em função do pH.

Figura 3.23: Comportamento da máxima absorção da nova banda formada em 640 nm em função do pH.

Na figura 3.22, mostramos o comportamento do máximo de absorção em função do pH, para o pico da banda de Soret em 369 nm, e verificamos que as amostras irradiadas sofreram um decréscimo na intensidade de absorção. Este comportamento pode ser explicado através da figura 3.23, onde mostramos o crescimento da banda em 640 nm com a irradiação e o pH.

Figura 3.24: Espectros de fluorescência das soluções em PBS, com variação de pH, na concentração de 25 µg/ml, não irradiadas.

Como podemos ver na figura 3.24, os espectros de emissão sofrem grandes alterações com o pH. Para as soluções alcalinas observamos uma considerável intensidade de fluorescência, embora tenhamos observado uma maior predisposição para a formação de novos produtos ao serem irradiados, evidenciados pela nova banda em 640 nm, como mostrado nas figuras 3.25, 3.26 e 3.27.

Figura 3.25: Espectros de fluorescência das soluções em PBS, para o pH = 5.

Figura 3.26: Espectros de fluorescência das soluções em PBS, para o pH = 7.

Figura 3.27: Espectros de fluorescência das soluções em PBS, para o pH 10.

Nas soluções ácidas observamos os espectros de emissão com uma diminuição na intensidade, devido à formação de agregados que são compostos menos fluorescentes, [54]. Nas figuras 3.28 e 3.29, mostramos o comportamento dos picos de emissão em 611 e 640 nm, respectivamente, onde são avaliados os resultados obtidos para as amostras irradiadas e não irradiadas. Observamos que na figura 3.28, as amostras ao serem irradiadas sofrem uma diminuição na intensidade de fluorescência, ocorrendo o inverso para o pico em 640 nm, onde observamos um crescimento no sinal de fluorescência.

Figura 3.28: Comportamento do máximo de fluorescência em 611 nm em função do pH, para amostras irradiadas e não irradiadas.

Figura 3.29: Comportamento da nova banda de fluorescência em 640 nm em função do pH, para amostras irradiadas e não irradiada.

d – Variação de comprimento de onda e potência de irradiação.

1 – Analisamos o efeito do comprimento de onda na fotodegradação do PHOTOGEN[®], assim sendo realizamos experimentos com três comprimentos de onda diferentes, 488, 514 e 630 nm. Estes comprimentos de onda foram escolhidos devido a suas utilizações em terapias médicas e odontológicas, [30]. Utilizamos uma potência de 0,5 W, na concentração de 25 µg/ml e uma variação temporal de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Observamos um decréscimo na intensidade das bandas de absorção, com relação ao tempo de exposição à luz. Os espectros de absorção das amostras expostas ao comprimento de onda de 488 nm são mostrados na figura 3.26, onde observamos um decréscimo da banda de Soret e surgimento de uma nova banda de absorção em 640 nm, devido a fotomodificação, [55].

Na figura 3.31 observamos os espectros de absorção das amostras expostas ao comprimento de onda de 514 nm. Obtivemos o mesmo comportamento de diminuição da intensidade das bandas de absorção com o tempo. A formação da nova banda ficou mais evidente neste comprimento de onda, pois houve um aumento na intensidade da absorção da banda, em 640 nm, com o decorrer do tempo. Este comportamento não foi verificado nas amostras irradiadas com 488 nm.

Nos espectros de absorção para o comprimento de onda de 630 nm mostrado na figura 3.32 observamos apenas o fotocclareamento, não ficando evidente a formação de fotoprodutos, na concentração utilizada.

Figura 3.30: Espectros de absorção das amostras, em PBS, irradiadas com 488 nm.

Figura 3.31: Espectros de absorção das amostras, em PBS, irradiadas com 514 nm.

Figura 3.32: Espectros de absorção das amostras, em PBS, irradiadas com 630 nm.

Realizamos medidas de fluorescência nas amostras irradiadas e observamos que nos três comprimentos de estudados, 488, 514 e 630 nm, encontramos um decréscimo da intensidade de fluorescência inicial em 611 nm. Por conseguinte, observamos a formação de substâncias que emitiam em 640 nm, embora este comportamento não foi observado em todos os comprimentos de onda irradiado, pois as amostras irradiadas com 630 nm não apresentaram esse comportamento.

Figura 3.33: Evolução temporal da fluorescência para os três comprimentos de onda investigados, em 611 nm.

A evolução temporal da fluorescência para os três comprimentos de onda, mostrada na figura 3.33, indica que as amostras irradiadas com 514 nm tiveram o maior decréscimo na fluorescência, sugerindo que esse comprimento de onda apresenta maior eficiência na degradação do PTG.

Figura 3.34: Evolução temporal da fluorescência para os três comprimentos de onda investigados, em 640 nm.

O comprimento de onda de irradiação é um parâmetro fundamental na estabilidade do sensibilizador, embora tenhamos visto alterações ao irradiarmos as amostras com 630 nm. Verificamos que em relação aos outros comprimentos de onda usados, as modificações foram pequenas, sem evidenciar a formação de fotoprodutos como mostra a figura 3.34.

2 – Nesta seção analisamos o efeito da variação de potência de irradiação, em 514 nm, na fotodegradação do PHOTOGEM[®]. Assim sendo, realizamos experimentos utilizando concentração de 25 µg/ml, tempo de 20 minutos e um intervalo de potências de 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, e 1,0 W.

Figura 3.35: Espectros de absorção das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, irradiadas por 20 minutos com laser de argônio na linha de 514 nm.

Observamos na figura 3.35, que para todas as potências utilizadas verificamos a fotodegradação, mas quando usamos 1,0 W de potência observamos um aumento na fluorescência do fotoproduto e um alargamento da banda de Soret para o ultravioleta. A formação de uma banda de absorção no UV devido aos fotoprodutos pode ser explicada pela fotoindução da auto-oxidação destruindo a porfirina e produzindo dipirrólicos ou monopirrólicos [56].

Nos espectros de fluorescência excitados com 507 nm, figura 3.36, fica evidente a fotodegradação do PTG, e verificamos que em 1,0 W ocorre a maior degradação.

III – Análise da estabilidade do PHOTOGEM[®] através de técnicas espectroscópicas

Figura 3.36: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM[®] na concentração de $25 \mu\text{g/ml}$, excitação em 507 nm, irradiadas por 20 minutos em 514 nm

Figura 3.37: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM[®] na concentração de $25 \mu\text{g/ml}$, excitação em 369 nm, irradiadas por 20 minutos em 514 nm

Como esperado, os espectros de fluorescência das amostras de PTG, excitados com 369 nm, são diferentes dos encontrados para a excitação em 507 nm, pois este

III – Análise da estabilidade do PHOTOGEM[®] através de técnicas espectroscópicas

comprimento de onda está bem próximo da banda de Soret. Os espectros de fluorescência, para excitação em 369 nm, das amostras de PTG irradiadas no intervalo de potência investigado mostraram um comportamento intrigante, para a amostra irradiada com 1,0 W de potência onde observamos a formação de uma nova banda de emissão centrada em 460 nm. Embora com essa excitação tenhamos uma interferência devido a grande absorção das moléculas do fotossensibilizador, esta banda ficou evidente apenas quando aumentamos a potência de irradiação. O que sugere uma relação entre a potência de irradiação e a degradação do sensibilizador.

3 – Nesta seção analisamos o efeito da variação temporal de irradiação, nos tempos de 20, 45, 90 e 180 minutos, das amostras na concentração de 25 µg/ml, inicialmente com irradiação em 514 nm para duas potências 0,3 e 1,0 W. Então faremos uma comparação entre os resultados obtidos com 514 nm, com as amostra irradiadas com 351 nm, na potência de 0,3 W.

Na figura 3.38 mostramos os espectros de absorção das amostras irradiadas com 514 nm na potência de 0,3 W. Observamos um decréscimo das bandas de absorção com o tempo de irradiação, indicando que o fotossensibilizador está sendo degradado com o tempo de irradiação. Podemos verificar que os fotoprodutos também estão sendo degradados, pois a banda formada em 640 nm, está diminuindo para as amostras com maior tempo de exposição.

Figura 3.38: Espectros de absorção das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, irradiadas com uma potência 0,3 W em 514 nm.

Nos espectros de fluorescência, com excitação em 507 nm, figura 3.39, observamos que a intensidade de fluorescência sofre um decréscimo de aproximadamente 46 % em 20 minutos de irradiação e 90 % em 180 minutos de irradiação. A formação de fotoprodutos não apresenta o mesmo comportamento, pois notamos que eles também são degradados com o tempo de exposição à luz. Quando excitamos com 369 nm, figura 3.36, os espectros de fluorescência não apresentam a banda encontrada anteriormente, para potência de 1,0 W, mesmo para tempos de irradiação longos. Então na potência de 0,3 W não observamos a formação de uma banda de emissão em 460 nm, mesmo para tempos de exposição longos.

Figura 3.39: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM[®] na concentração de 25 μ g/ml, excitação em 507 nm, irradiadas com uma potência 0,3 W em 514 nm.

Figura 3.40: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM[®] na concentração de 25 μ g/ml, excitação em 369 nm, irradiadas com uma potência 0,3 W em 514 nm.

Como mencionado anteriormente realizamos medidas para potência de 1,0 W, irradiando em 514 nm, nos tempos de 20, 45, 90 e 180 minutos. Nos espectros de

absorção da figura 3.41, observamos um decréscimo na absorção bem mais rápido, pois em 20 minutos de irradiação a absorção cai cerca de 50% e em 180 minutos cerca de 70% da absorção inicial para banda de Soret.

Figura 3.41: Espectros de absorção das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, irradiadas com uma potência 1,0 W em 514 nm.

Nas figuras 3.42 e 3.43, mostramos os espectros de fluorescência das amostras irradiadas com a potência de 1,0 W. Neste caso encontramos a banda em 460 nm quando excitamos com 369 nm, demonstrando uma relação entre a potência de irradiação e o surgimento desta banda que provavelmente está relacionada com a formação de fotoprodutos.

Figura 3.42: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM[®] na concentração de 25µg/ml, excitação em 507 nm, irradiadas com uma potência 1,0 W em 514 nm.

Figura 3.43: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM[®] na concentração de 25µg/ml, excitação em 369 nm, irradiadas com uma potência 1,0 W em 514 nm.

Realizamos medidas com comprimento de onda de 351 nm para comparar com os resultados obtidos para irradiação com 514 nm, na potência de 0,3 W. Os espectros de absorção das amostras irradiadas com 351 nm são mostrados na figura 3.44. Observamos uma formação gradual de fotoprodutos, se comparados com os espectros em 514 nm.

Figura 3.44: Espectros de absorção das amostras de PHOTOGEM® na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$, irradiadas com uma potência 0,3 W em 351 nm.

Nas figuras 3.45 e 3.46, mostramos os espectros de fluorescência excitando com 507 e 369 nm, respectivamente. Observamos na figura 3.41 a formação de uma nova banda de emissão em 640 nm, embora mesmo intensa se compararmos com as amostras irradiadas com 514 nm. Na figura 3.42, verificamos a formação de uma banda de emissão em 460 nm, comportamento não encontrado nas amostras irradiadas com 514 nm, na mesma potência.

Figura 3.45: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM[®] na concentração de 25 µg/ml, excitação em 507 nm, irradiadas com uma potência 1,0 W em 351 nm.

Figura 3.46: Espectros de fluorescência das amostras de PHOTOGEM[®] na concentração de 25 µg/ml, excitação em 351 nm, irradiadas com uma potência 0,3 W em 351 nm.

Figura 3.47: Evolução temporal do pico de fluorescência em 460 nm, com excitação em 369 nm, para os comprimentos de onda em 351 e 514 nm e potências de 0,3 e 1,0 W.

A evolução temporal do pico de fluorescência das amostras de PTG irradiadas com 351 nm e 514 nm, figura 3.47, onde observamos um crescimento para fluorescência em 460 nm nos dois casos avaliados. Devemos enfatizar que em 514 nm utilizando a potência de 0,3 W não observamos a formação dessa nova banda de emissão, para os mesmos tempos de exposição, como podemos ver na figura 3.40.

e – Variação da temperatura

A estabilidade do Photogem[®], PTG, quando submetido à variação de temperatura foi realizado com a utilização de um banho térmico em que variamos a temperatura em 37, 40 e 60 °C. Na figura 3.48, mostramos os espectros de absorção das amostras submersas no banho a 37 °C, onde constatamos que não ocorreram grandes alterações.

Figura 3.48: Variação de temperatura das amostras de PTG, concentração de 25 µg/ml.

Este comportamento é importante, pois verificamos que o medicamento é estável nessas condições de temperatura, salientando que essas seriam as condições corpóreas dos pacientes. Mas em pacientes com quadros agravados, geralmente apresentando febre, logo elevamos a temperatura das amostras às condições encontradas nos corpos humanos e extrapolamos essa temperatura em 50% com o propósito de causar alterações no medicamento.

Figura 3.49: Comportamento da absorção em 369 nm nas temperaturas investigadas.

Podemos observar que o comportamento do pico de absorção, mostrado na figura 3.49, para a variação de temperatura estudada nos tempos de 20, 30 e 60 minutos, indica que neste intervalo de tempo não tivemos grandes modificações, pois as variações encontradas estão dentro do desvio esperado.

Figura 3.50: Espectros de fluorescência das amostras submetidas à temperatura de 37 °C, com excitação em 507 nm.

Alguns estudos mostram que variações de temperatura em soluções de hematoporfirina incorporadas a lisossomos ou mitocôndrias, [57], causam alterações nos espectros de fluorescência. Assim sendo, realizamos medidas de fluorescência nas soluções aquosas estudadas, para verificar se nessas condições observaríamos modificações nos espectros de fluorescência. Na figura 3.50 mostramos os espectros de fluorescência para as amostras submetidas à temperatura de 37 °C, nos tempos de 20, 30 e 60 minutos, onde não encontramos modificações relevantes.

Figura 3.51: Espectros de fluorescência para as três temperaturas estudadas, para o tempo de 30 minutos.

Quando aumentamos a temperatura do banho para 60 °C, observamos um aumento da fluorescência, como mostra a figura 3.51, indicando que modificações estão ocorrendo no medicamento, sendo provável que as moléculas do PTG estejam sendo desagregadas levando ao aumento da emissão.

Esse aspecto é importante, pois mostra a estabilidade do PTG em condições térmicas diferentes. Embora tenhamos encontrado alterações na fluorescência em 60 °C,

essa é uma condição extrema não encontrada em aplicações clínicas e em condições de armazenamento.

3.5 – Conclusão

Neste experimento investigamos a estabilidade do fotossensibilizador PHOTOGEM[®], submetido a diferentes condições de concentração, solvente, pH, iluminação e temperatura. Realizamos medidas de absorção e fluorescência, nas diferentes condições e chegamos as seguintes conclusões:

1. Quanto à concentração as amostras com maior apresentaram um decréscimo na absorção e emissão da banda em 640 nm, indicando a formação de agregados.
2. Os solventes utilizados apresentaram algumas alterações, pois se compararmos os resultados obtidos em DMSO com os encontrados em solução aquosa, observaremos um deslocamento para o vermelho nas bandas de absorção de 30 nm para banda de Soret, este comportamento deve-se a altamente polar do DMSO.
3. Notamos uma drástica mudança na formação de fotoprodutos do sensibilizador, ocorre em regiões onde existe uma diferença de pH entre as células normais e tumorais, normais (7,0-8,06) e tumorais (5,85-7,68), portanto a dependência do pH na formação de fotoprodutos pode ser um fator que afeta a eficiência da PDT.
4. O fotossensibilizador estudado, Photogem[®], é degradado ao ser irradiado com luz, sendo mais eficiente quando irradiado com 514 nm.
5. No comprimento de onda usado na terapia fotodinâmica PDT, 630 nm, não observamos formação de fotoprodutos, embora ocorra o fotoclareamento do

III – Análise da estabilidade do PHOTOGEM[®] através de técnicas espectroscópicas

medicamento indicando que mesmo neste comprimento de onda existem modificações estruturais no PTG.

6. Quanto à irradiação, concluímos que a potência de irradiação é um parâmetro importante. Uma vez que ao aumentarmos a grandeza da potência de irradiação elevamos a intensidade de absorção e emissão da banda em 640 nm, indicando a formação de fotoproduto.
7. Outro aspecto fundamental é o tempo de exposição das amostras à luz, pois quando este tempo é longo pode-se verificar a degradação dos fotoprodutos.
8. Quanto à variação de temperatura concluímos, que o PTG não sofre degradação ao sofrer variações de temperatura até 60 °C.

IV – Farmacocinética dos fotossensibilizadores em modelo animal.

4.1 – Introdução

A localização e avaliação da concentração de medicamentos administrados a animais são extremamente importantes, pois possibilitam a otimização dos procedimentos terapêuticos adotados nos tratamentos [58]. Com este propósito procuramos identificar uma técnica de espectroscopia capaz de solucionar este problema. Desde que a utilização da espectroscopia de absorção é limitada pela não homogeneidade do sistema investigado, a espectroscopia de fluorescência vem sendo aplicada em estudos fotobiológicos de suspensão de células e em sistemas vivos [59]. Se ambos comprimentos de onda de excitação e emissão dos componentes do sistema em estudo ocorre em regiões superiores da parte visível do espectro de radiação eletromagnética, então é possível usar a espectroscopia de fluorescência como uma técnica de investigação não somente na superfície da amostra, mas em regiões internas do sistema vivo [36]. A variável que é freqüentemente monitorada em medidas de fluorescência é a intensidade, em um comprimento de onda ou por todo espectro de emissão, e o tempo de vida das espécies emitidas. Espectroscopia de fluorescência é muito freqüentemente usada para detecção, quantificação e localização da posição das espécies emitindo, visto que medidas do tempo de vida do estado excitado estão normalmente relacionadas à reatividade do agente fotossensibilizador. Alguns fluorímetros foram desenvolvidos para registrar espectros de fluorescência de tecidos vivos sensibilizados, contudo, deve-se registrar inicialmente a fluorescência natural dos tecidos vivos em estudo. Exceto uma pequena quantidade de fluorescência observada

por toda região do visível, um pico proeminente de fluorescência é freqüentemente observado em 674 nm, que é devido a dieta alimentar dos animais [60]. Vários trabalhos têm mostrado que a fluorescência da porfirina observada *in vivo* é semelhante a observada *in vitro* em condições preparadas com surfactantes ou proteínas [61]. A subtração do *background* (autofluorescência) tem sido realizada em medidas de fluorescência de tecidos vivos, a intensidade de fluorescência observada não pode ser diretamente proporcional à concentração do sensibilizador no tecido [62]. Na verdade, a fonte da fluorescência observada *in vivo* é decorrente da fluorescência individual de vários tecidos e órgãos, com comportamento heterogêneo. Embora a concentração da droga em um tecido possa facilmente ser correlacionada com a intensidade de fluorescência observada em um tecido extraído, no modelo *in vivo* é bem mais difícil a correlação da fluorescência com a concentração de droga [63]. A concentração absoluta de um sensibilizador é difícil de ser calculada por medidas de fluorescências *in vivo*, essa técnica é bem adaptada para monitorar a dinâmica de distribuição do sensibilizador assim que ele foi introduzido no animal vivo [64]. Esse método tem duas vantagens, ter respostas mais rápidas que o método de extração da droga dos tecidos, e o conjunto completo de dados farmacológicos pode ser obtido de um simples animal.

Os órgãos estudados neste trabalho foram fígado, rins, parede muscular abdominal e pele. O estudo do fígado nos auxilia na compreensão dos efeitos da irradiação laser na divisão celular após hepatectomia parcial. Sabemos da importância em investigar as alterações na interação da luz com o tecido biológico devido a estrutura celular. Neste sentido investigamos o rim que apresenta uma cor semelhante ao fígado mas sua estrutura celular é bem diferente. O estudo da pele é extremamente importante,

pois é o órgão em que existe atualmente no Brasil o maior número de casos de câncer tratados pela terapia fotodinâmica.

4.2 – Objetivo

Investigar a distribuição do medicamento, PHOTOGEM[®], administrado aos animais, através da utilização da técnica de espectroscopia de fluorescência.

4.3 – Materiais e Métodos

Utilizamos duas metodologias diferentes para investigar os órgãos internos e a pele, devido a dificuldade em manter os animais vivos após um período sob efeito de anestésico.

4.3.1 – Preparo e fotossensibilização dos animais

Foram utilizados cinco ratos *Wistar* pesando aproximadamente 250 g, para cada experimento. Os animais foram anestesiados com solução anestésica à base de *Quetamina base 1g* (Francotar - Virbac[®]) na dose de 0,08 ml/100g de peso corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *cloridrato de xylazina 2%* (Virbaxyl - Virbac[®]) na dose de 0,04 ml/100g. Foi realizada uma incisão longitudinal mediana em forma de U para possibilitar o acesso da ponta de aplicação aos órgãos internos, fígado e rins, e à parte abdominal. A área em que foram realizadas medidas em pele, foi tricotomizada manualmente, com o intuito de minimizar o trauma de corrente deste procedimento. Eles foram fotossensibilizados com o sensibilizador PHOTOGEM[®] (Photogem, Moscou – Rússia), com uma concentração de 5 mg/ml diluído em solução

de cloreto de sódio a 0,9%. A dose do medicamento diluído para cada animal foi de 2,5 mg/kg, valor que pode ser encontrado em aplicações clínicas de humanos. A via de administração foi a veia caudal lateral esquerda, sendo padronizada para todos os animais.

4.3.2 – Monitoramento do medicamento em órgãos de ratos

No monitoramento da distribuição do medicamento na pele, na parede abdominal, nos rins e no fígado dos ratos, usamos um sistema de fluorescência que permite avaliar a autofluorescência do tecido assim como qualquer alteração espectral caso alguma substância fluorescente for administrada. As medidas de fluorescência foram realizadas usando um sistema fluorescência (figura 4.1), sendo composto de um laser de Nd⁺³:YAG(532 nm), um laser de He-Cd(442 nm), (figura 4.2) monocromador, um sistema de fibras e um computador. O monocromador possui filtros para os comprimentos de onda 442 nm, 532 nm e 630 nm. O cateter de aplicação em Y está disposto com uma fibra central, de excitação, e seis fibras concêntricas, de captação.

Figura 4.1: Sistema de diagnóstico de fluorescência utilizados nos experimentos.

Figura 4.2: Laser de He-Cd (442 nm) e laser de Nd⁺³:YAG (532 nm).

Com este sistema pudemos acompanhar a distribuição da droga nos órgãos do rato, e inferir os tempos de sensibilização e acúmulo. Inicialmente foram obtidas medidas de autofluorescência, sendo cinco leituras para cada tecido investigado em cada animal. Na figura 4.3 ilustramos regiões em foram realizadas as medidas de fluorescência.

Figura 4.3: Regiões dos animais onde foram realizadas as medidas de fluorescência.

Após a administração do fotossensibilizador, as leituras de fluorescência foram realizadas nos seguintes tempos: 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 e 72 horas para pele, e 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 e 120 minutos para os órgãos internos.

4.4 – Resultados e Discussão

Na dinâmica de distribuição do medicamento, observamos que os resultados variaram bastante entre as regiões observadas. A princípio estávamos interessados em acompanhar a distribuição da droga apenas nos órgãos internos, mas devido ao envolvimento do grupo em aplicações de lesões de câncer de pele, realizamos algumas medidas na pele dos ratos. Monitoramos a distribuição do medicamento na pele, nos rins e no fígado dos ratos, verificamos que devido às características dos órgãos obtivemos respostas diferentes. Para os órgãos internos fizemos um acompanhamento com intervalos de tempos diferentes aos realizados na pele, pois o animal permanecia aberto durante todo o experimento, como foi mostrado na figura 4.3, e devido às limitações do procedimento anestésico o tempo total do experimento foi limitado. Mostraremos os resultados da pele e os resultados obtidos para os órgãos internos.

a – Monitoramento da pele

Realizamos medidas de fluorescência da pele, no abdômen dos animais. As medidas realizadas no abdômen mostraram um sinal de fluorescência para o medicamento, emitindo em 636 nm, atingido um máximo 24 horas após a aplicação, como mostra a figura 4.4. Como podemos observar pela fig. 4.5, existe um crescimento na fluorescência em 566 nm a partir de 2 horas, curiosamente o abdômen apresentou um sinal de fluorescência muito rápido, provavelmente isso se deve à influência da fluorescência proveniente dos órgãos internos fotossensibilizados.

Figura 4.4: Espectros de fluorescência da pele, região do abdômen, após administração do fotossensibilizador.

Figura 4.5: Evolução temporal do pico de fluorescência em 636 nm, no abdômen.

Embora o uso de ratos talvez não seja um modelo animal adequado para experimentos na pele, devido a presença dos pêlos, realizamos medidas no abdômen. O abdômen apresentou um comportamento singular, pois existia um sinal de fluorescência imediatamente após a aplicação do medicamento, consideramos que este sinal inicial decorria da autofluorescência dos órgãos internos, pois a parede abdominal é fina sendo possível uma excitação dos constituintes dos órgãos internos e conseqüentemente a influência desses componentes associado à influência do fotossensibilizador localizado nesses órgãos.

b – Monitoramento dos órgãos internos

Os órgãos internos estudados foram o fígado e os rins, onde obtivemos um sinal de fluorescência mais rápido no fígado. Os espectros de fluorescência para o fígado estão mostrados na figura 4.6, onde vemos uma estrutura totalmente diferente aos

observados para as medidas realizadas na pele. Observamos dois picos de fluorescência em 622 nm e 687 nm.

Figura 4.6: Espectros de fluorescência do fígado do rato, mostrando duas bandas de emissão.

Na figura 4.7, mostramos a evolução temporal dos picos no intervalo de tempo observado, ambos apresentam o mesmo comportamento, têm um máximo de fluorescência em 30 minutos que permanecendo estável até o final do período de investigação.

Figura 4.7: Evolução temporal dos picos de fluorescência para o fígado

Os espectros de fluorescência para os rins estão mostrados na figura 4.8, que apresentando um pico em 625 nm, diferiram dos obtidos para o fígado.

Figura 4.8: Espectros de fluorescência do rim, com uma banda centrada em 625 nm

Na figura 4.9, mostramos a evolução temporal do pico em 627 nm, mostrando um comportamento instável, no intervalo de tempo observado.

Figura 4.9: Evolução temporal do acúmulo de PTG no rim dos ratos.

Ao investigarmos os órgãos internos dos animais encontramos diferenças significativas entre os espectros de fluorescência obtidos para o fígado e os obtidos para os rins. A constituição dos órgãos difere bastante, embora ambos sejam altamente pigmentados, cada órgão apresenta uma composição estrutural adequada à função desempenhada pelo órgão. Outra possível justificativa para essa diferença está na via de aplicação do medicamento, como estávamos interessados em estudar o efeito da droga no fígado escolhemos a via que ligada diretamente ao fígado. Fizemos a escolha através dos resultados preliminares obtidos onde observamos que os tempos de sensibilização do órgão variavam dependendo da veia em que aplicávamos o medicamento, com esses resultados escolhemos a veia caudal esquerda, pois verificamos que a droga rapidamente era entregue ao fígado. Nos espectros mostrados nas figuras 4.6 e 4.8 observamos que o

figado apresenta dois picos de fluorescência, em 622 nm e 687 nm, e os rins apresentam um pico mais intenso em 627 nm. Nas figuras 4.7 e 4.9 mostramos a evolução temporal das bandas de emissão para o fígado e para os rins, notamos que o comportamento para esses órgãos foi bastante diferente. O fígado ficou caracterizado pela presença de dois picos em seus espectros, com suas intensidades evoluindo progressivamente até 30 minutos, então caindo e estabilizando durante o intervalo de tempo estudado. Os rins apresentaram como característica principal uma modificação na forma do espectro, pois as variações de intensidade foram irregulares, não sendo possível avaliarmos a evolução temporal da intensidade do pico observado, durante as duas horas de observação.

c – Modelo teórico

Nos itens a e b mostramos os resultados obtidos para as medidas de fluorescência do PTG quando incorporado ao tecido animal, desses resultados pudemos observar a existência de um acúmulo do medicamento nos órgãos estudados. Entretanto, notamos que no intervalo de tempo investigado existe um aumento da intensidade de fluorescência até um certo tempo, que varia em função do tecido, e depois observamos um decaimento da intensidade. Esse comportamento é evidenciado nas figuras 4.5, 4.7 e 4.9, onde mostramos a evolução temporal do acúmulo do medicamento em cada órgão estudado.

Neste caso, a farmacocinética indica a existência de duas escalas de tempo distintas. A primeira relacionada com o aumento da concentração do PTG no órgão pode ser caracterizada por um tempo: τ_{ac} (tempo de acúmulo). Neste caso, consideramos que o tecido biológico possui uma capacidade máxima de acúmulo do medicamento e que a

presença do fotossensibilizador no tecido dificulta o aumento dessa razão de acúmulo, podemos escrever como uma possível equação para a concentração da droga a equação básica dada por:

$$\frac{d[HpD]}{dt} = C - K[HpD] \quad (4-1).$$

Com C representando a taxa de acúmulo máximo e possui uma grande dependência com o tipo de tecido considerado. A constante K é uma constante de taxa acúmulo de HpD, sendo inversamente proporcional ao tempo de acúmulo ($\tau_{acc} = \frac{1}{K}$).

Quando um medicamento é acumulado, simultaneamente é iniciado um processo de eliminação que é justificado pela observação de um máximo de concentração, caracterizado por um tempo máximo $\tau_{m\acute{a}x.}$. Para $t < \tau_{m\acute{a}x.}$, o mecanismo de acúmulo é regido pela equação (4-1). Para $t > \tau_{m\acute{a}x.}$, o excedente de droga no tecido começa a ser eliminado. Como ambos mecanismos, acumulação e eliminação, são distintos eles apresentam tempos característicos diferentes. Para o segundo processo está associado um tempo de eliminação, $\tau_{eli.}$, e considerando que a taxa de eliminação é proporcional a quantidade momentânea de droga no tecido, a equação básica para esse mecanismo pode ser descrita por:

$$\frac{d[HpD]}{dt} = -\frac{1}{\tau_{eli.}}[HpD] \quad (4-2).$$

Para $t = \tau_{m\acute{a}x.}$, as equações (4-1) e (4-2) não são válidas, pois os dois mecanismos estão presentes, mas elas são uma boa aproximação para os outros intervalos de tempo.

A solução da eq. (4-1) é dada pela expressão; $[HpD]_1 = C_0 [1 - e^{-t/\tau_{acc}}]$, e para eq.

$$(4-2); [HpD]_2 = C_0'' + C_0' \left[e^{\frac{-(t-\tau_{máx})}{\tau_{eli}}} \right], \text{ com } C_0, C_0' \text{ e } C_0'' \text{ sendo as constantes relacionadas}$$

com o máximo de concentração no tecido.

Usando essas soluções podemos ajustar os resultados experimentais mostrados nas figuras 4.5, 4.7 e 4.9. Na figura 4.10 mostramos a concordância entre o ajuste e os pontos experimentais, para o fígado. Através desse ajuste podemos encontrar os valores típicos de $\tau_{ac.}$, $\tau_{máx.}$ e $\tau_{eli.}$ que são os tempos característicos da farmacocinética dos tecidos considerados. A boa concordância entre o modelo e os dados experimentais é melhor que o esperado para um modelo simplificado.

Figura 4.10: Ajuste dos dados experimentais usando o modelo teórico.

Através dos ajustes podemos obter para os tecidos investigados os valores apresentados na tabela 4.I.

Tabela 4.I – Tempos de acúmulo típicos ($\tau_{ac.}$), tempos de eliminação ($\tau_{eli.}$) e tempos máximos ($\tau_{máx.}$), para os tecidos estudados.

Tecido	$\tau_{ac.}$	$\tau_{máx.}$	$\tau_{eli.}$
Fígado	8.9	30	46.3
Rim	600	40	86
Pele Abdominal	400	240	63

Podemos observar que ocorre um rápido acúmulo de medicamento no fígado, se comparado com a pele. Esta rapidez deve-se em parte a via de aplicação do medicamento. Visto que a veia utilizada tem uma ligação direta com o fígado, pois realizamos medidas preliminares de fluorescência e constatamos este comportamento. Já para pele existem vários passos a serem percorridos, uma vez que a droga tem que ser difundida pelo sistema circulatório até chegar as células epiteliais.

Os resultados apresentados indicam que o tempo de espera entre a aplicação do PTG e a execução da PDT estão intimamente correlacionados com a localização do tumor. Não podemos considerar um único tempo de espera para todos os tipos de tumor.

Verificamos ainda uma diferença entre os espectros dos órgãos analisados, principalmente com relação à estrutura do espectro e aos picos de intensidade de fluorescência, como podemos ver na tabela 4.II.

Tabela 4.II – Pico dos espectros de fluorescência para os diferentes tecidos.

Tecido	$\lambda(\text{nm})$
Fígado	622 - 687
Rim	627
Pele Abdominal	566 - 636

Esse resultado indica que o PTG pode ser incorporado pelas células por diferentes vias, que poderão levar a eliminação da fluorescência, como ocorre no rim. Então, este comportamento deve ser considerado em trabalhos futuros, além da possibilidade da formação de agregados que seria outro fator na diminuição da fluorescência. Como nosso modelo está baseado nos espectros de fluorescência do PTG, então estes fatores estariam contribuindo para a imprecisão dos nossos resultados.

Não temos conhecimento de estudos similares para o fígado e rim. Entretanto, encontramos estudos similares para pele, utilizando outros tipos de fotossensibilizadores e detecção por fluorescência.

4.5 – Conclusões

Nesse capítulo estudamos a distribuição do PHOTOGEN[®] *in vivo* através de espectroscopia de fluorescência, e concluímos que as medidas de fluorescência são ideais para identificar as alterações devido à presença de uma substância exógena, não sendo possível quantificar a concentração dessa substância, sendo adequada para monitorar sua evolução temporal no tecido estudado. Tendo como vantagem o fato que o animal não necessita ser sacrificado, permitindo o monitoramento do medicamento usando o mesmo animal para toda evolução temporal. Tecidos com localização diferente possuem farmacocinética diferente e este fato deve ser incluído nos estudos experimentais de PDT. Os nossos resultados estão auxiliando os experimentos desenvolvidos no laboratório, principalmente nos experimentos envolvendo modelos com fígado de ratos. Tornando-se um protocolo do grupo na utilização de PDT em experimento animal.

V – Penetração da luz visível em tecido biológico

5.1 – Introdução

Descrever a interação da luz *laser* com tecidos biológicos, é um aspecto importante para o entendimento de algumas terapias empregadas na medicina, tais como, terapia fotodinâmica (PDT), terapia fototérmica, cirurgia e diagnóstico por fluorescência. Quando tratamos deste assunto devemos observar a complexidade do sistema, os mecanismos de interação, o tempo de reação do tecido e o grau de organização biológica. Os mecanismos de interação da luz com o tecido biológico são caracterizados como fotoquímicos, fototérmico e fotomecânico [65]. O tempo de resposta dos tecidos pode ser descrito como um efeito imediato, uma resposta tardia e uma cicatrização em longo prazo. Os níveis de organização alterados pela interação do laser com sistemas biológicos podem ser tecidual, celular ou de organelas.

Além disso, devemos observar as propriedades ópticas dos constituintes fundamentais dos tecidos e sua dependência com o comprimento de onda da luz incidente. O comportamento do efeito do comprimento de onda pode ser investigado segundo dois aspectos; os processos de absorção e espalhamento. Considerando os processos de absorção, verificamos um espectro de absorção alargado na região do ultravioleta, devido à absorção de muitas biomoléculas tais como proteínas e ácidos nucléicos. Quando observamos intervalos com comprimentos de onda maiores verificamos que a absorção devido às biomoléculas cai, sendo dominante a absorção devido aos cromóforos tais como; hemoglobina, mioglobina, bilirrubina e melanina, variando para os diferentes tipos de tecido, [66]. Para comprimentos de onda acima de

1000 Å, infravermelho próximo, os mecanismos de absorção são dominados pela água e o coeficiente de absorção de muitos tecidos neste intervalo está relacionado com a quantidade de água em sua estrutura, sendo indispensável observarmos este aspecto ao estudarmos os diferentes tecidos, pois um tecido ósseo deverá ter um índice de absorção pequeno na região do vermelho se comparado ao tecido epitelial.

Para facilitar a compreensão da interação da luz com tecidos biológicos faremos uma descrição dos tecidos e organelas, e de alguns modelos que descrevem a interação da luz com o meio biológico. As células animais possuem núcleos e organelas celulares definidas. A célula é limitada por uma membrana, celular ou plasmática, esta estrutura separa a célula do meio circundante e atua como um filtro seletor para as substâncias que tentam entrar ou sair da célula, mantendo o equilíbrio osmótico. Um modelo para a estrutura da membrana considera duas camadas de fosfolipídios, figura 5.1 [67], sendo que este modelo denominado mosaico. Os fosfolipídios possuem uma carga elétrica em uma das extremidades, que é hidrofílica, enquanto a outra extremidade que não é eletricamente carregada é hidrófoba. A membrana controla a entrada e saída de substâncias na célula, através de diversos mecanismos, além da presença de poros específicos para algumas moléculas.

Figura 5.1: Modelo de membrana plasmática (bicamada de fosfolipídios).

Outros componentes importantes das células são o citoplasma e o núcleo, que desempenham papel fundamental no organismo vivo. O núcleo possui uma dupla membrana e funciona como um centro controlador da célula, iniciando e controlando todas as funções, além de conter em seu interior o material genético responsável pela continuidade de sucessivas gerações de células. No citoplasma se localizam estruturas envoltas por membrana denominadas organelas, são exemplo de organelas as mitocôndrias, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e os lisossomos, cada organela desempenhando uma função específica. As mitocôndrias ocupam um lugar extremamente importante na célula porque são responsáveis pela conversão de energia, além do transporte de elétrons, sendo estes sistemas encontrados unicamente nas mitocôndrias. Os retículos endoplasmáticos são redes de membranas que são responsáveis pela síntese e a secreção de proteínas, de determinados hormônios esteróides, de enzimas do metabolismo de carboidratos e de enzimas da síntese de lipídios. O complexo de Golgi é outro sistema de membranas consistindo de uma série de 3 a 20 sacos achatados paralelos. A função do aparelho de Golgi é reunir materiais produzidos na célula e de eliminá-los para o exterior, ou seja, sendo responsável pela secreção celular. Os lisossomos são pequenas partículas circundadas por uma única membrana e contêm as enzimas que decompõem substâncias na célula, eles atuam digerindo e removendo substâncias estranhas que entram na célula ou removendo organelas celulares não necessárias. Cada organela apresenta uma função específica, que advém das modificações estruturais ocorridas na célula para sua manutenção. A luz ao interagir com uma célula sentirá essas variações de estrutura, interagindo diferentemente com cada organela [68].

Além da estrutura celular, devemos analisar como a luz interage com um conjunto de células possuindo as mesmas características morfológicas e funcionais, ou seja, os tecidos. Descrever os diversos tipos de tecidos é indispensável para o entendimento do problema em estudo, pois as variações de penetração encontradas estão diretamente relacionadas com sua estrutura, pigmentação e constituição [69]. A organização dos tecidos é extremamente importante, pois as características morfológicas e fisiológicas dos tecidos são fundamentais nos processos de interação da luz. Em cada tecido, as células assemelham-se entre si pelo tamanho, forma e disposição característicos, além de se especializarem, ou diferenciarem, tanto estrutural como fisiologicamente, para desempenhar a mesma função. As células de um animal multicelular podem ser divididas em (1) células somáticas, que constituem o indivíduo durante sua vida e (2) células germinativas, que têm apenas função na reprodução e perpetuação da espécie. Há cinco grandes grupos de tecidos somáticos: epitelial ou de revestimento; conjuntivo ou de sustentação; vascular ou circulatório; muscular ou contrátil e nervoso. Cada tecido apresenta uma estrutura bem determinada e uma função definida, embora possamos encontrar alterações estruturais devido à função desempenhada pelo tecido. Todas essas diferenças entre os tecidos devem ser consideradas ao elaborarmos um modelo de interação da luz com o tecido, muito embora a complexidade do sistema nos leve a recorrer a aproximações.

Na literatura encontramos alguns trabalhos teóricos, [70], que descrevem a interação da luz com tecido biológico através da teoria de transporte ou teoria de difusão, requerendo modelos matemáticos e programas computacionais. Partiremos de

um modelo simplificado, muito usado em eletromagnetismo, para descrevermos alguns aspectos dessa interação.

Os processos físicos envolvidos na interação da luz com a matéria podem ser divididos em três partes: (1) absorção da energia da luz incidente; (2) transformação dessa energia em calor ou energia química, e difusão do calor; (3) reação química ou transformação de fase. Enfatizaremos apenas os aspectos relevantes para este trabalho, [71].

Absorção e reflexão – quando a luz incide sobre um material uma parte, R , dessa energia é refletida, o restante penetra no material sendo absorvida ou transmitida. Essa energia absorvida que determina o comportamento do material irradiado. O valor de R é dado pela natureza do material irradiado, ele depende do comprimento de onda da luz incidente. Para um meio transparente com índice de refração (n_0) e o meio irradiado com índice de refração (n_1), a refletividade da interface com incidência normal é obtida através da equação 5-1:

$$R = \frac{(n_1 - n_0)^2}{(n_1 + n_0)^2} \quad (5-1).$$

A refletância espectral da pele varia com a pigmentação e é significativa somente na região espectral do visível e infravermelho. A refletância da pele para comprimentos de onda menores que 310 nm e acima de 2,5 μm é menor que 5%.

Em algumas aplicações médicas somente a luz absorvida é responsável pelo efeito terapêutico, a luz é absorvida ou pela água ou pelos cromóforos. Os principais cromóforos são a hemoglobina e a melanina. Quando a intensidade de luz I_0 atinge um meio de espessura r , a intensidade I que sai do meio é dada pela equação 5-2;

$$I = I_0(1 - R)e^{(-\alpha r)} \quad (5-2).$$

Com α sendo o coeficiente de absorção, α^{-1} sendo o comprimento de absorção e R a refletância. Para o laser de argônio, o comprimento de absorção da água e outros cromóforos são mostrados na tabela 5-I.

Tabela 5.I – Comprimento de absorção, α^{-1} , para o laser de argônio.

$\lambda(\text{nm})$	Água	Melanina	Hemoglobina
450-514	50 m	10 μm	200 μm

Na difusão térmica e efeito térmico – em geral a absorção ocorre via excitação eletrônica, as excitações são instáveis, logo os elétrons decaem cedendo energia para o sistema. Isto resulta no aquecimento do material irradiado, a transformação da luz em energia térmica é muito rápida da ordem de 10^{-13} a 10^{-12} s. A taxa de difusão de calor no material é determinada pela natureza do material irradiado, ou seja, suas propriedades físicas tais como condutividade térmica, calor específico, entre outras [30].

Como vimos anteriormente os principais mecanismos encontrados na penetração da luz em tecidos são: reflexão, absorção e espalhamento. Reflexão tem uma contribuição muito pequena, pois este mecanismo depende do estado de polarização da luz incidente, do ângulo de incidência, [72]. Em nosso estudo consideramos apenas a absorção e o espalhamento como mecanismos importantes na penetração da luz no tecido. A absorção depende da constituição do tecido e aumenta com a frequência da luz, convertendo energia radiativa em calor e excitando as camadas eletrônicas moleculares resultando em diferentes tipos de reações fotoquímicas. O espalhamento está relacionado com o aspecto geométrico, a não-homogeneidade e a granularidade,

logo a luz espalhada pode ser vista como uma difusão ao penetrar no tecido. Ambos, o espalhamento e a absorção têm uma dependência matemática similar, mas o espalhamento tem a propriedade de destruir o feixe de luz criando zonas esféricas de iluminação distribuídas por todo tecido. Os mecanismos que envolvem absorção e espalhamento não estão separados. Trabalhos teóricos descrevem o mecanismo de penetração da luz no tecido considerando todas as possibilidades de espalhamento, tornando o problema complexo. Em nosso trabalho fizemos uma aproximação baseada na teoria de difusão, com a luz sendo difundida isotropicamente através do tecido obtendo-se uma dependência do tipo $\frac{Ae^{-\alpha r}}{r^2}$, com o termo $\frac{1}{r^2}$ representando a difusão esférica através do tecido e a representação exponencial da ocorrência de absorção. Como nosso interesse principal é entender como a luz penetra em tecidos biológicos, sem tentar criar um modelo teórico, tratamos o problema de uma maneira simplificada, onde a constante α^{-1} representa a distância média de penetração da luz, com uma intensidade que diminui aproximadamente com 1/e do valor inicial.

Dificuldades experimentais para descrever o transporte da luz em tecidos biológicos, são bastantes conhecidas: tipo de detectores, maneira correta de preparar a amostra de tecido, dentre outros. Em nossa pesquisa, estamos interessados nos efeitos estimuladores do *laser* em tecido biológico, sem agentes químicos, e na penetração da luz *laser* nos tecidos, em ambos usamos um modelo com amostras teciduais de rato *Wistar*.

5.2 – Objetivo

Estudar o comportamento da luz visível em tecidos de ratos *Wistar*, que apresentam aspectos morfológico e funcional diferentes, principalmente no que se refere ao espalhamento e absorção.

5.3 – Materiais e Métodos

Considerando a aproximação em que os processos de penetração da luz no tecido biológico podem ser representados apenas pelos conceitos de absorção e espalhamento, idealizamos um experimento para averiguar este comportamento. Nesse experimento analisamos imagens de tecido de ratos, irradiados por um laser, sendo capturada por uma câmara CCD.

5.3.1 – Preparação das amostras

Foram utilizados três ratos *Wistar* pesando aproximadamente 250 g, para cada experimento. Os animais foram anestesiados com solução anestésica à base de *Quetamina base 1g* (Francotar - Virbac®) na dose de 0,08 ml/100g de peso corporal associado ao relaxante muscular, analgésico e sedativo de *cloridrato de xylazina 2%* (Virbaxyl - Virbac®) na dose de 0,04 ml/100g. Foi realizada uma incisão longitudinal mediana para possibilitar a remoção dos órgãos internos, fígado e rins, e da região abdominal. Os órgãos foram fatiados numa espessura de 3 mm e 25,8 x 25 mm, as fatias foram colocadas entre duas lâminas de vidro. O lado a ser irradiado sofreu uma incisão para ficar perpendicular a luz incidente.

5.3.2 – Sistema de irradiação e captação de imagens

Foram utilizados quatro comprimentos de onda sendo 488 e 514 nm emitidos por um laser de argônio (*Coherent – Innova 100*), 630 nm de um laser de corante (*Coherent – 599 Dye laser*), bombeado por um laser de íons de argônio, e 670 nm de um laser de semiconductor. O feixe laser é direcionado por espelhos até incidir sobre a amostra presa entre duas lâminas de vidro, figura 5.2.

Figura 5.2: Arranjo experimental de iluminação e captação de imagem.

Uma câmara CCD, localizada perpendicularmente a superfície da lâmina de vidro, capta a imagem formada pela luz espalhada ao atravessar o tecido. Foram captadas três imagens por órgãos, durante a irradiação. A imagem é armazenada em um arquivo do microcomputador, um exemplo é mostrado na figura 5.3.

Figura 5.3: Amostras irradiadas com 630 e 488 nm, mostrando a diferença na penetração.

Desta imagem obtemos o perfil de intensidade da luz para qualquer direção, onde são identificamos zonas esféricas de igual intensidade de iluminação, que poderiam ser representadas por um coeficiente efetivo relacionando o decréscimo na intensidade da luz com a penetração no tecido.

5.4 – Resultados e Discussão

Os tecidos avaliados foram: fígado, músculo abdominal, tecido adiposo abdominal e rim, para diferentes comprimentos de onda: 488 nm, 514 nm, 630 nm e 670 nm. Estes comprimentos de onda são usados em algumas terapias médicas e em alguns procedimentos odontológicos. Na polimerização de resinas dentais pode-se usar a linha 488 nm do laser de argônio, apresentando alta eficiência no processo de polimerização. Em terapias de bioestimulação pode-se usar a linha de 514 nm do laser de argônio. Os comprimentos de onda de 630 nm e 670 nm podem ser usados na terapia fotodinâmica PDT e na terapia laser de baixa intensidade. Então esse estudo pode ser de grande interesse prático, além de mostrar a importância de alguns parâmetros usados nos procedimentos que utilizam o laser em tecidos biológicos.

5.4.1 – Tratamento das imagens

Quando medimos a luz espalhada estamos fazendo uma medida da posição que depende da intensidade, desde que a luz espalhada sendo proporcional à incidência de luz local, a luz observada corresponde ao parâmetro de intensidade de luz. Então para analisarmos as imagens obtidas, consideramos este comportamento isotrópico da intensidade e utilizamos um programa computacional, em Lab View desenvolvido no

laboratório, este programa associa a intensidade da luz com o perfil de coloração da imagem. Se pegarmos um diâmetro da figura 5.4, por exemplo, teremos uma intensidade maior próximo a superfície e menos intensa ao penetrarmos no tecido.

Figura 5.4: Imagens da luz penetrando no tecido, obtidas através de uma câmara CCD.

Figura 5.5: (a) Gráfico obtido da imagem, através do programa que relaciona cor com intensidade de irradiação, (b) cálculo do coeficiente de absorção.

Obtivemos o perfil de intensidade e observamos que a luz espalhada apresentava uma isotropia espacial. Em todos os tecidos verificamos a formação de arcos que representam a distribuição de intensidade da luz espalhada, mostrando que a luz é isotropicamente espalhada em todas as direções, como mostra a figura 5.4. Podemos aproximar o comportamento da luz espalhada em uma direção, por uma difusão isotrópica ao longo de uma determinada direção, logo podemos extrair a variação da intensidade com a

distância, tal variação pode ser observada na figura 5.5-(a), onde temos os pontos captados pela câmera CCD. Na figura 5.5-(b), temos um gráfico da função logaritmo de I/I_0 pela distância, com I_0 sendo a intensidade máxima inicial. Podemos observar que o gráfico do logaritmo apresenta um perfil linear, sugerindo um decaimento exponencial para a intensidade, que pode ser representada por uma lei descrita pela equação 5-3:

$$I(r) = I_0 e^{(-\alpha r)} \quad (5-3).$$

Com α^{-1} sendo o coeficiente de penetração efetivo da luz no tecido, nas condições estudadas, o principal parâmetro no estudo da propagação da luz em tecidos biológicos, o estudo foi bastante simplificado.

Um outro aspecto analisado, a penetração da luz em diferentes comprimentos de onda: 514 nm, 630 nm e 670 nm, como mostra a tabela 5-II. Neste caso, estudamos a penetração em fígado devido ao enfoque do trabalho, verificamos que para 514 nm quase toda luz é absorvida na superfície do tecido, não sendo este comprimento de onda indicado para utilização em medicina. Os comprimentos de onda em 630 nm e 670 nm mostraram o melhor coeficiente de penetração.

Tab. 5.II – Coeficientes de absorção para o fígado, para comprimentos de onda diferentes.

$\lambda(\text{nm})$	$\alpha^{-1}(\text{mm})$
514	$0,94 \pm 0,04$
630	$6,36 \pm 0,4$
670	$6,21 \pm 0,7$

Inicialmente consideramos diferentes tipos saudáveis de tecido, a tabela 5-III mostra os resultados obtidos. Observamos que dos tecidos analisados, o tecido adiposo apresenta um maior índice de penetração devido a sua ausência de pigmentação, este

resultado é um argumento importante para justificar a utilização de terapias que fazem uso da luz laser.

Tab. 5.III – Coeficientes de absorção para os diferentes tipos de tecido, em 630 nm.

Tecido de Rato	Fígado	Músculo abdominal	Adiposo abdominal	Rim
α^{-1} (mm)	$6,36 \pm 0,4$	$4,33 \pm 0,6$	$17,24 \pm 0,02$	$4,13 \pm 0,01$

5.5 – Conclusões

Neste trabalho uma maneira simplificada de calcular o decaimento exponencial da intensidade da luz laser durante a propagação em diferentes tipos de tecidos. A luz é distribuída isotropicamente e cria zonas esféricas de igual intensidade. O decréscimo da intensidade ao longo de uma direção é exponencial, e a profundidade de penetração (α^{-1}) é um parâmetro importante no desempenho do laser em aplicações médicas. O comprimento de onda em 630 nm apresentou uma alta penetração em tecido abdominal adiposo, 17 mm. Mostrando que para várias aplicações a iluminação laser de tecido interno, podemos considerar o uso da aplicação externa, especialmente se for no abdômen. Em várias outras aplicações podemos usar os parâmetros desta pesquisa.

VI – Efeito do laser na respiração mitocôndrial

6.1 – Introdução

Trabalhos recentes na literatura têm mostrado que a irradiação com laser de baixa intensidade em tecidos biológicos pode afetar o sistema energético, altera o potencial de membrana ou a permeabilidade do substrato celular [73]. Outro efeito do laser observado em células hepáticas é o aumento da divisão celular, auxiliando no processo de regeneração, após hepatectomia parcial [74]. Alguns estudos têm indicado que as mitocôndrias são os principais alvos do efeito do laser sobre tecidos, alguns tipos de enzimas existentes nas mitocôndrias, como por exemplo NADH (forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo) e os citocromos, têm vários picos de absorção que varia do ultravioleta ao visível [73]. Por causa dessas absorções a irradiação laser, em comprimentos de onda específicos, pode atuar nessas enzimas e modificar o metabolismo energético das mitocôndrias. A irradiação laser pode ser aplicada após a sensibilização das células com substâncias fotossensibilizadoras exógenas, em nosso caso o PHOTOGEN[®], e também modificar os processos energéticos das células. Essas alterações na cadeia respiratória são de grande interesse, devido a sua importância no ciclo vital das células.

Este processo de conversão de energia ocorre na mitocôndria, que é uma organela importante nos processos metabólicos das células eucariontes. O número de mitocôndrias por célula depende da função desenvolvida pela célula, sendo assim, as células com maior atividade metabólica possuem maior número de mitocôndrias, uma vez que necessitam de maior quantidade de energia para realizar suas atividades. O

número também varia com o tipo de tecido ou órgão e o estado de maturidade do tecido, por exemplo, as células do fígado possuem de 1000 a 2500 mitocôndrias por células [75]. As mitocôndrias possuem aproximadamente 1 μm de diâmetro e comprimento variável. Elas possuem duas membranas, sendo uma interna e outra externa. A membrana interna apresenta dois setores, um paralelo a membrana externa e as cristas que são invaginações da membrana interna. O espaço entre os dois sistemas de membranas é denominado espaço intercristas, já o espaço no interior da mitocôndria é chamado matriz. A espessura das membranas são de 5 a 7 nm. A membrana externa é permeável a moléculas carregadas e sem cargas com peso molecular de aproximadamente 5000. A membrana interna tem propriedades de permeabilidade limitada, ela é permeável a água, CO_2 , O_2 , NH_3 e acetato, mas é seletivamente permeável a prótons e muitos outros íons pequenos. Íons não permeáveis movem-se através da membrana sob rigoroso controle. O grande número de cristas em uma mitocôndria está associado com a atividade metabólica. Algumas enzimas estão associadas com a camada externa e o espaço intercristas. Na membrana interna encontramos enzimas e co-fatores que participam no transporte de elétrons e na geração de energia. Na matriz estão localizadas as enzimas do ciclo de Krebs e enzimas relacionadas aos ácidos graxos [76].

Toda célula viva necessita de energia para realização de suas complexas funções, essa energia é obtida através da absorção de nutrientes pelo organismo. A energia química dos compostos nutritivos não é diretamente usada pela célula, assim tem que ser convertida bioquimicamente em uma forma de energia que possa ser utilizada pela célula. Os nutrientes, ao serem oxidados, perdem prótons e elétrons ($\text{H}^+ + \text{e}^-$) e têm seus

átomos de carbono convertidos a CO_2 . Os prótons e elétrons são recebidos por coenzimas na forma oxidada, que passam assim à forma reduzida. A reoxidação das coenzimas é obtida pela transferência dos $(\text{H}^+ + \text{e}^-)$ para o oxigênio molecular, que é então convertido em água. O processo de conversão que apresenta o melhor rendimento é a síntese do ATP (adenosina trifosfato), a partir do ADP (adenosina difosfato) e fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4). É a energia química do ATP que será diretamente usada para promover os processos biológicos que consomem energia.

Figura 6.1: Esquema simplificado do processo de obtenção de energia

A estratégia adotada pelas células consiste em transformar a energia contida nas coenzimas reduzidas em um gradiente de prótons e utilizar este gradiente para promover a síntese de ATP [77]. A primeira parte deste processo, ou seja, a produção do gradiente de prótons, é conseguida pela transferência dos elétrons das coenzimas para o oxigênio, não diretamente, mas através de passagens intermediárias por vários compostos, que constituem a cadeia de transporte de elétrons. Para cumprir esta função, os compostos que compõem a cadeia de transporte de elétrons são organizados segundo seus potenciais de óxido-redução. Assim, os elétrons partem da coenzima reduzida, que tem

potencial de óxido-redução menor que os componentes da cadeia e percorrem uma sequência de transportadores com potenciais de óxido-redução crescentes, até atingirem o oxigênio, que tem o maior potencial de óxido-redução. As transferências de elétrons entre estes compostos são sempre acompanhadas com a diminuição de energia livre. O transporte de elétrons é facilitado pelo fato de tais compostos estarem organizados em membranas, com posições definidas, de modo a situar cada componente exatamente entre aquele que lhe fornecerá elétrons e aquele ao qual seus elétrons serão doados. Ao mesmo tempo em que as passagens de elétrons se processam, forma-se um gradiente de prótons, ou seja, estabelece-se uma concentração de prótons diferente de cada lado da membrana onde ocorre o transporte de elétrons. A síntese de ATP é possível porque aproveita a energia potencial contida no gradiente de prótons. Esta síntese consiste na fosforilação do ADP ($\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$) e, por utilizar a energia derivada da oxidação das coenzimas, é denominada fosforilação oxidativa. O acoplamento da síntese de ATP ao transporte de elétrons é explicado pela teoria quimiosmótica, proposta por Mitchell. Segundo esta teoria, a energia do transporte de elétrons é primariamente utilizada para bombear prótons para o exterior da matriz mitocondrial. O transporte unidirecional de prótons é possível graças à disposição assimétrica dos componentes da cadeia de transporte de elétrons em relação às duas faces da membrana interna. A consequência do bombeamento é a produção de um gradiente de prótons, isto é, uma concentração diferente de prótons dentro e fora da mitocôndria. Em mitocôndrias consumindo O_2 ativamente, a diferença de pH entre a matriz e o exterior pode chegar a 1,4 unidades. Conseqüentemente, a face da membrana interna voltada para a matriz fica ainda mais negativa do que a face voltada para o espaço intermembranas, e a diferença de carga

elétrica geram um potencial de membrana, da ordem de 0,1 a 0,2 V. A energia conservada nesse gradiente eletroquímico é chamada de força próton-motriz e é constituída, portanto, de dois componentes: o gradiente de pH (concentração de prótons maior no espaço intermembranas) e o gradiente elétrico (a matriz é negativa em relação ao espaço intermembranas). O retorno dos prótons ao interior da mitocôndria é um processo espontâneo, a favor do gradiente eletroquímico, que libera energia, a força próton-motriz, capaz de levar à síntese de ATP. Como a membrana interna é impermeável a prótons, estes só podem voltar à matriz e desfazer o gradiente através de sítios específicos da membrana interna, constituídos pelo complexo sintetizador de ATP. Devido ao acoplamento entre a síntese de ATP com o oxigênio, podemos quantificar o consumo de oxigênio através da síntese do ATP. Usando a metodologia para quantificar o consumo de oxigênio, também somos capazes de identificar a integridade da célula, principalmente no que se refere a viabilidade da membrana.

6.2 – Objetivo

Neste capítulo investigamos a influência da luz nos processos energéticos das células. Nessa investigação utilizamos os protocolos convencionais para estudar a respiração mitocôndrial, mas realizamos algumas alterações no processo de aquisição de dados, bem como na metodologia usada na irradiação dos órgãos dos animais.

6.3 – Materiais e Métodos

Em nossos estudos analisamos algumas alterações ocorridas no sistema energético celular, ou seja, na respiração mitocôndrial através do monitoramento do

consumo de oxigênio no processo de fosforilação oxidativa. Realizamos este estudo em três etapas; na primeira fizemos o monitoramento do medicamento no fígado, em seguida irradiamos os animais e após esse procedimento, isolamos as mitocôndrias dos hepatócitos e avaliamos o processo de respiração mitocondrial.

6.3.1 – Fotossensibilização e irradiação dos animais

Os animais sadios foram fotossensibilizados com o sensibilizador PHOTOGEN[®] (PHOTOGEN[®], Moscou – Rússia), com uma diluição de 5 mg/ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%. A dose do medicamento diluído para cada animal foi de 2,5 mg/kg, valor que pode ser encontrado em aplicações clínicas de humanos. A via de administração foi a veia caudal lateral esquerda. Os animais foram anestesiados com solução anestésica à base de Ketamina (Francotar) e um relaxante muscular (Virbaxyl) na dose de 0,08 ml/100g e 0,004 ml/100g respectivamente.

Um laser de diodo Ceralas (Ceramoptec, Alemanha), emitindo em 630 nm, foi usado como fonte de luz. Usamos três doses de irradiação 36 J/cm², 72 J/cm² e 108 J/cm², com potência, área e intensidade fixadas em 1W, 5 cm² e 0,2 W/cm², respectivamente. Após esperarmos trinta minutos, tempo indicado pelas medidas de fluorescência, efetuamos a irradiação do fígado com o laser, nas doses de luz investigadas.

Figura 6.2: Irradiação do fígado do animal anestesiado, após uma espera de 30 minutos, irradiado com laser em 630 nm.

6.3.2 – Isolamento das mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial [78]. Os animais foram sacrificados; o lóbulo hepático foi removido imediatamente após a irradiação e colocado em 50 ml de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 1mM e Hepes-KOH 10 mM, pH 7,2, no qual foi lavado, picotado e homogeneizado em Potter-Elvehjem através de três ciclos de 15 segundos com 1 minuto de intervalo. O material homogeneizado foi centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O sedimento obtido foi suspenso em 10 ml de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM e Hepes-KOH 10 mM, pH 7,2, e centrifugado a 6000 rpm por 15 minutos. O sedimento final, contendo mitocôndrias isoladas, foi suspenso em 1 ml de meio contendo sacarose 250 ml e Hepes-KOH, pH 7,2, e utilizado durante um período máximo de 3 horas. Todas as etapas de isolamento das mitocôndrias foram conduzidas a 4 °C.

A proteína mitocondrial foi determinada utilizando-se a reação do biureto [79], com a utilização da albumina de soro bovino como padrão.

6 . 3 . 3 – Respiração das mitocôndrias

O consumo de oxigênio foi analisado a 30 °C em um oxígrafo com um eletrodo de oxigênio Clark (Gilson Medical Electronics, Middlenton, WI, EUA).

Figura 6.3: Eletrodo usado nas medidas de respiração mitocondrial, possuindo um catodo de platina e dois ânodos de prata.

Princípio do método: O eletrodo de Clark é constituído por um cátodo de platina acoplado a dois ânodos de prata através de uma ponte de KCl saturada e cobertos por uma membrana de teflon. Quando polarizado com 0,8 V o oxigênio dissolvido no meio de incubação é reduzido no cátodo de platina a íons OH⁻, de acordo com a reação:

O circuito é completado pela seguinte reação, que ocorre no ânodo de prata:

Assim, o fluxo de elétrons do ânodo de prata para o cátodo de platina produz uma corrente elétrica diretamente proporcional à quantidade de oxigênio presente no meio, que se difunde através da membrana de teflon, a qual é amplificada e registrada através de um potenciômetro. O oxígrafo foi calibrado com ditionite de sódio, como redutor do O₂ total presente no meio de incubação. Elaboramos um novo sistema de aquisição para

o equipamento, em substituição ao potenciômetro mecânico usado no equipamento convencional. Conectamos ao sistema um computador para o processamento dos dados, mas sem alterar a metodologia usada no método convencional, onde analisamos a inclinação das curvas para cada estado da respiração. Succinato, na concentração de 5 mM, foi usado como substrato rico em oxigênio em 1,4 ml de meio com 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM KH_2PO_4 , 0,1 mM EGTA e 10mM Hepes-KOH, pH 7,4, e foi usado 2,5 mg de proteína mitocondrial. A taxa de respiração no estado 3 foi induzida com 400 nmol MgADP, e a taxa de respiração no estado 4 (basal) foi determinada através da fosforilação do ADP adicionado, as taxas foram expressadas em n^o de átomos de oxigênio/ minuto/mg de proteína mitocondrial. Foi determinada a razão entre as taxas dos estados 3 e 4 (razão de controle respiratório – RCR), que representa o acoplamento entre o transporte de elétrons da cadeia respiratória e a fosforilação oxidativa.

Figura 6.4: Montagem experimental desenvolvida no laboratório para medidas do consumo de oxigênio nas mitocôndrias, usando o eletrodo descrito anteriormente.

6.4 – Resultados e Discussão

Os resultados serão apresentados segundo as etapas do procedimento experimental da respiração mitocondrial.

6.4.1 – Respiração mitocondrial

Mostramos na figura 6.5 um gráfico obtido durante o processo de consumo de oxigênio, onde observamos os dois estágios da respiração mitocondrial, antes e após o estímulo com ADP, para a formação de ATP.

Figura 6.5: Gráfico apresenta o consumo de O_2 em função do tempo em s, avaliando os estágios da respiração mitocondrial.

Na figura 6.6 mostramos a taxa de consumo de oxigênio para o estado 3 observamos um aumento desse estado para 9 minutos de irradiação. Entretanto, para 5 minutos observamos uma pequena queda do consumo de oxigênio, mas para 3 minutos de irradiação o consumo ficou dentro do controle.

Figura 6.6: Comportamento do estado 3 para as amostras nos três tempos de irradiação.

Figura 6.7: Comportamento do estado 4 para as amostras nos três tempos de irradiação.

Na figura 6.7 mostramos a taxa de consumo de oxigênio para o estado 4, observamos um diminuição desse estado para 9 minutos de irradiação, embora esteja dentro do desvio esperado, indicando que a respiração normal mitocôndrial permaneceu inalterada. Entretanto, para 5 minutos observamos um pequeno aumento do consumo de

oxigênio, mas para 3 minutos de irradiação o consumo ficou dentro do controle. Esse comportamento fica evidenciado quando fazemos a razão entre os estados 4 e 3 da respiração mitocondrial.

Figura 6.8: Observamos a relação da razão de controle respiratório (RCR), com o tempo de irradiação das amostras.

A razão de controle respiratório (RCR), figura 6.8, apresentou um aumento considerável para 9 minutos de irradiação, devido à diminuição da respiração normal indicando que ao irradiarmos por mais tempo, estamos melhorando a conversão de ADP em ATP. Entretanto, para 5 minutos observamos uma pequena queda dessa razão, mas dentro do erro esperado.

No experimento de respiração mitocondrial analisamos a influência da luz laser no processo da síntese de ATP. Na literatura encontramos trabalhos, [80], em que drogas foram adicionadas às mitocôndrias ficando evidente, após o processo de isolamento, que elas podem influenciar o processo de respiração mitocondrial. Na metodologia usada em nossos experimentos o medicamento PHOTOGEN[®] foi administrado ao animal vivo e

somente após a irradiação do fígado houve sua remoção, para realização dos procedimentos de isolamento das mitocôndrias. As taxas de respiração dos estados 3 e 4, e a razão de controle respiratório (RCR) estão mostrados nas figuras 6.6 – 6.8, onde vemos que a irradiação com o laser vermelho modifica o acoplamento do consumo de oxigênio com a síntese de ATP pela mitocôndria. O metabolismo energético das mitocôndrias do fígado foi aumentado para o maior tempo de irradiação, como pode ser mostrado pelo grande aumento do RCR.

6 . 5 – Conclusões

No experimento de respiração mitocôndrial, concluímos que a razão de controle respiratório (RCR), foi alterada pela irradiação do órgão antes de sua remoção, mostrando que as medidas de fluorescência indicaram que após o tempo de 30 minutos o medicamento foi metabolizado nas mitocôndrias. Alterando o consumo de oxigênio e a síntese de ATP, uma vez que para tempos maiores de irradiação tivemos um crescimento do estado 3, onde ocorre a síntese de ATP.

VII – Conclusão

Neste trabalho investigamos a fotodegradação, a farmacocinética, a penetração da luz e a morte celular, procurando inter-relacionar os resultados obtidos para serem utilizados no desenvolvimento de modelos de dosimetria em PDT. Chegamos as seguintes conclusões para cada item analisado:

1. Quanto à concentração: as amostras com maior concentração apresentaram um decréscimo na absorção e emissão da banda em 640 nm, indicando a formação de agregados. Os solventes utilizados apresentaram algumas alterações, pois se compararmos os resultados obtidos em DMSO com os encontrados em solução aquosa, observaremos um deslocamento para o vermelho nas bandas de absorção de 30 nm para banda de Soret, este comportamento deve-se a alta polaridade do DMSO. Notamos uma drástica mudança na formação de fotoprodutos do sensibilizador, que ocorre em regiões onde existe uma diferença de pH entre as células normais e tumorais, normais (7,0-8,06) e tumorais (5,85-7,68), portanto a dependência do pH na formação de fotoprodutos pode ser um fator que afeta a eficiência da PDT. O fotossensibilizador estudado, Photogem[®], é degradado ao ser irradiado com luz, sendo mais eficiente quando irradiado com 514 nm. No comprimento de onda usado na terapia fotodinâmica PDT, 630 nm, não observamos formação de fotoprodutos, embora ocorra o fotoclareamento do medicamento indicando que mesmo neste comprimento de onda existem modificações estruturais no PTG. Como verificamos a degradação do PTG, realizamos medidas em que o fotossensibilizador foi submetido a condições extremas de irradiação e variação de temperatura. Quanto à irradiação,

verificamos que a potência de irradiação é um parâmetro importante, pois a formação de certos fotoprodutos esta diretamente relacionada com a grandeza da potência de irradiação. Outro aspecto fundamental é o tempo de exposição das amostras a luz, pois quando este tempo é relativamente longo pode-se verificar a degradação dos fotoprodutos. Quanto à variação de temperatura concluímos que o PTG não sofre degradação ao sofrer variações de temperatura até 60 °C.

2. Através dos espectros de fluorescência pudemos identificar e acompanhar o tempo de acúmulo do PHOTOGEM[®], nos órgãos usados neste estudo. Concluímos que a distribuição desse fotossensibilizadores *in vivo*, pode ser monitorada utilizando-se seus espectros de fluorescência, não sendo possível quantificar essa substância.
3. Ao estudarmos a penetração da luz no sistema biológico, simplificamos cálculo da propagação da luz laser em diferentes tipos tecidos considerando um decaimento exponencial para a intensidade da luz ao atravessar esses tecidos. A luz é distribuída isotropicamente e cria zonas esféricas de igual intensidade. O decréscimo da intensidade ao longo de uma direção é exponencial, e a profundidade de penetração (α^{-1}) é um parâmetro importante no desempenho do laser em aplicações medicas. O comprimento de onda em 630 nm apresentou uma alta penetração em tecido abdominal adiposo, 17 mm. Mostrando que para várias aplicações a iluminação laser de tecido interno, podemos considerar o use da aplicação externa, especialmente se for no abdômen.
4. No experimento de respiração mitocôndrial, concluímos que a razão de controle respiratório (RCR), foi alterada pela irradiação do órgão antes de sua remoção,

mostrando que as medidas de fluorescência indicaram que após o tempo de 30 minutos o medicamento foi metabolizado nas mitocôndrias, alterando o consumo de oxigênio e a síntese de ATP. Um indicativo forte que o PTG tem como alvo às mitocôndrias.

Os aspectos da Terapia Fotodinâmica analisados neste trabalho, embora tenham sido investigados separadamente, podem ser correlacionados através da dosimetria, pois nela devemos considerar todas essas condições para termos um resultado efetivo da PDT. Esta é uma linha de investigação concreta, uma vez que sem esse estudo pode-se chegar a alguns resultados indesejáveis no tratamento clínico.

VIII – Referências bibliográficas.

1. ACKROYD, R. et al, The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.74, p. 656-669, 2001.
2. EPSTEIN J. H., Phototherapy and photochemotherapy. **The New England Journal of Medicine**, v.322, p. 1149-1151, 1990.
3. MACHADO, A.E.H., Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.3, p.237-243, 2000.
4. BONNETT R. and Martínez G., Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v.57, p.9513-9547, 2001.
5. DOUGHERTY, T.J.; Gomer, C.J.; et al, Review: photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.90, n.12, p.889-905, 1998.
6. DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy (yearly review). **Eur. J. Cancer**, v.28A, n.10, p.1734-1742, 1992.
7. SIMPLÍCIO, F. I.; Maionchi F. e Hioka N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v.25, n.5, p.801-807, 2002.
8. Instituto Nacional de Câncer. O que é o Câncer? Disponível em: <www.inca.org.br/cancer/cancer.html>. Acesso em: 05/ maio/ 2003.
9. Instituto Nacional de Câncer. Como se comportam as células cancerosas. Disponível em: <www.inca.org.br/cancer/comportamento_celula.html>. Acesso em: 05/ maio/ 2003.
10. Instituto Nacional de Câncer. O que causa o Câncer? Disponível em: <www.inca.org.br/cancer/causacancer.html>. Acesso em: 05/ maio/ 2003.
11. Instituto Nacional de Câncer. Epidemiologia. Disponível em: <www.inca.org.br/cancer/epidemiologia>. Acesso em: 05/ maio/ 2003.
12. Instituto Nacional de Câncer. Tratamento cirúrgico. Disponível em: <www.inca.org.br/tratamento/cirurgico.html>. Acesso em: 05/ maio/ 2003.

13. Instituto Nacional de Câncer. Quimioterapia. Disponível em: <www.inca.org.br/tratamento/quimioterapia.html>. Acesso em: 05/ maio/ 2003.
14. PINTO, A. C. L. C. e Leite, M. T. T., Radioterapia em oncologia, São Paulo, cap.2.
15. Instituto Nacional de Câncer. Radioterapia. Disponível em: <www.inca.org.br/tratamento/radioterapia.html>. Acesso em: 05/ maio/ 2003.
16. HENDERSON, B.W. AND Dougherty, T.J. How does photodynamic therapy works? **Photochem. Photobiol.**, v.55, n.1, p.145-157, 1992.
17. SIBATA, C.H., Colussi, V.C., et al, Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, p.869-880, 2000.
18. BAGNATO, V. S.; et all, Regional profile: PDT in Brazil. **Photodynamic News**, v.4, n.3, 2001.
19. PATRICE, T., Potential importance of PDT for countries with emerging economies? **Photodynamics News**, v. 2, n. 2, 1999.
20. WILSON, B. C. and Patterson, M. S., The physics of photodynamic therapy. **Phys. Med. Biol.**, v.31, n.4, p.327-360, 1986.
21. PROFIO, E. A. and Doiron D. R., Transport of light in tissue in photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.46, p.591-599, 1987.
22. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C., Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, p. 4151-4202, 1998.
23. GORMAN, A. A. and Rodgers, M. A. J., Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.14, p.159-176, 1992.
24. MOAN J. On the diffusion lenght of singlet oxygen in cells and tissues. **J. Photochem. Photobiol. B.Biol.**, v.6, p.343-4, 1990.
25. COLUSSI, Valdir Carlos. **Intensificação da terapia fotodinâmica do câncer pela variação da pressão parcial do oxigênio no tecido: efeitos físicos e**

- biológicos.** Campinas, 1997. 100p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.
26. BONNETT, R., Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chem. Soc. Rev.**, p.19-33, 1995.
27. MAZIERE, J. C., Santus, R., et al, Cellular uptake and photosensitizing properties of anticancer porphyrins in cell membranes and low and high density lipoproteins. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.6, p.61-68, 1990.
28. ROTOMSKIS, R., Bagdonas, S. and Streckyte, G., Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.33, p.61-67, 1996.
29. HAMBLIN, M. R.; Newman, E. L., On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.23, p.3-8, 1994.
30. VOGEL, A. and Venugopalan, V., Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissue. **Chem. Rev.**, v.103, p.577-644, 2003.
31. BONNETT, R. and Berenbaum M., **Photosensitizing Compounds: their Chemistry, Biology and Clinical Use.** Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 146), 1989, p.40-59.
32. TOMINAGA, Tania Toyomi. **Estudos espectroscópicos de porfirinas aquo-solúveis em função do pH e da interação com albumina de soro bovino.** São Carlos, 1997. 148p. Tese (Doutorado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
33. BYRNE, C. J., Marshallsay L. V. and Ward A. D., The composition of photofrin II. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.6, p.13-27, 1990.
34. MIRONOV, A. F., Nizhnic, A. N., et al, Hematoporphyrin derivatives: an oligomeric composition study. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.4, p.297-306, 1990.
35. BOYLET, R. W. and Dolphin D., Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochem. Photobiol.**, v.64, p. 469-485, 1996.

36. LIPSON, R. L.; Baldes E. J. and Olsen A. M., The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.26, n.12, p.1-11, 1961.
37. RICCHELLI, F., Stevanin, D. and Jori G., Porphyrin-liposome interactions: influence of the physico-chemical properties of the phospholipid bilayer, **Photochem. Photobiol.**, v.48, p. 13-18, 1988.
38. KHAIRUTDINOV, R. F. and Serpone N., Laser-attenuation in solutions of porphyrin aggregates, **J. Phys. Chem.**, v.99, p.11952-11958, 1995.
39. MA, L., Bagdonas, S. and Moan, J., The photosensitizing effect of the photoproduct of protoporphyrin IX. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.60, p.108-113, 2001.
40. GROSSWEINER, L. I., PDT light dosimetry revisited. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.38, p.258-258, 1997.
41. ROTOMSKIS, R., Bagdonas, S., Streckyte, G., et al, Phototransformation of sensitizers: 3. Implications for clinical dosimetry. **Lasers Med. Sci.**, v.13, p. 271-278, 1998.
42. Ministério público da Saúde e Industria Medica da federação Russa, Farmacopéia temporária, TPA 42-3198-98.
43. KALYANAUSUNDARAN, K., Photochemistry of polyridine and porphyrin complexos, London, Academic Press, 1992, p.626.
44. MOAN J. and Berg, K., The photodegradation of porphyrin in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. **Photochem. Photobiol.**, v.53, p. 549-553, 1991.
45. CUNDERLIKOVA, B., Bjorklund E. G., et al, pH-Dependence spectral properties of HpIX, TPPS_{2a}, mTHPP and mTHPC. **Photochem. Photobiol.**, v.74, p.246-252, 2001.
46. ROTOMSKIS, R., Streckyte, G and Bagdonas, S., Phototransformations of sensitizers 1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solutions of porphyrins therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.39, p.167-171, 1997.

47. UDAL'TSOV, A. V., Kazarin L. A., Sweshnikov, A. A., Self-assembly of large-scale aggregates of porphyrin from its dimers and their absorption and luminescence properties, **J. Mol. Structure**, v. 562, p. 227-239, 2001.
48. ZENKEVICH, E., Sagun, E., et al, Photophysical and photochemical properties of potencial porphyrin and clorin photosensitizers for PDT. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.33, p.171-180, 1996.
49. SHOPOVA, M. and Gantchev, T., Comparison of th photosensitizing efficiencies of haematoporphyrin (HP) and its derivative (HPD) with that of free-base tetrasulphophthalocyanine (TSPC-H₂) in homogeneous and microheterogeneous media. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.6, p.49-59, 1990.
50. MÓGER, G., Köhler, G. and Getoff N., Enhanced photochemical degradation of the haematoporphyrin dication irradiated at 560 nm in a lipid-like environment. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.33, p.27-37, 1996.
51. AGIRTAS, S., Ion, R. M. and Bekaroglu, O., Spectral study of the supramolecular assemblies porphyrins-phthalocyanines, **Materials Science and Engineering C**, v.7, p.105-110, 2000.
52. BRAULT, D., Physical Chemistry of porphyrins and their interactions with membranes: the importance of pH. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.6, p.79-86, 1990.
53. CUNDERLIKOVA, B., Gangeskar L. and Moan J., Acid-base properties of clorin e.g. relation to cellular uptake, **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.53, p.81-90, 1999.
54. ZIMMERMANN, A., Ritsch-Marte, M. and Kostron H., In vitro investigation on the pH dependence of absorption and fluorescence properties of the photosensitizer mTHPC. **Photochem. Photobiol.**, v.75, p. 335-338, 2002.
55. MOAN, J., Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy, **Cancer Letters**, v.33, 45-53, 1986.
56. ROTOMSKIS, R., Streckyte, G and Bagdonas, S., Phototransformations of sensitizers 2. Photoproducts formed in aqueous solutions of porphyrins therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.39, p.172-175, 1997.

57. RICCHELLI, F., Gobbo, S., Jori G., et al. Temperature-induced changes in fluorescence properties as a probe of porphyrin microenvironment in lipid membranes 1. The portion of hematoporphyrin and protoporphyrin in liposomes. **Eur. J. Biochem.**, v.233, p. 159-164, 1995.
58. Farmacocinética, <http://www.farmacia.ufmg.br/cespmed/text7.htm>, Acesso em: 05/ maio/ 2003.
59. POTTIER, R., In vitro and in vivo fluorescence monitoring of photosensitizers. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.6, p.103-109, 1990.
60. LEENGOENED, E. V., et al, Tissue-localizing properties of som photosensitizers studied by in vivo fluorescence imaging. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.6, p.111-119, 1990.
61. MOAN J., Porphyrins in tumor Phototherapy, pp-107, (1984), Edited by A. Andreoni.
62. BELLNIER, D., et al, An assay of the quantitation of photofrin in tissue and fluids. **Photochem. Photobiol.**, v.66, p.237-244, 1997.
63. BAUMGARTNER, R., et al, Pharmacokinetics of fluorescence polyporphyrin photofrin II in normal rat tissue and rat bladder tumor. **Photochem. Photobiol.**, v.66, p.569-574, 1992.
64. WANG, Z., et al, Pharmacokinetics, tissue distribution and photodynamic therapy efficacy of liposomal-delivered hypocrellin A, a potencial photosensitizer for tumor therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.70, p.773-780, 1999.
65. SCHWESINGER, W., The Surgical Clinics of North América, W. B. Saunders Company, 1992.
POTTIER, R.; Chow, Y. F. A., et al, Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra *in vivo*. **Photochem. Photobiol.**, v.44, p.679-687, 1986.
66. WILDEN, L. and Kartheim R., Import of radiation phenomena of electrons and therapeutic low-level laser in regard to the mitochondrial energy transfer. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.16, n.3, p.159-165, 2000.

67. STORER, T., et al, Zoologia geral, 6 ed., São Paulo, Nacionl, 1991, 816p.
68. JUNQUEIRA, L. C. e Carneiro, J., Histologia básica, 7 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1990, 388p.
69. PEAVY, G. M., Lasers and laser-tissue interation, **Vet. Clin. Small Anim.**, v. 32, p.517-534, 2002.
70. CHEONG, W., et al, A review of the optical properties of biological tissue, **IEEE J. Quantum Electronics**, v. 26, p.2166-2185, 1990.
71. WANG, L., et al, Biological laser action, **applied Optics**, v.35, p.1775-1779, 1996.
72. CAMMARATA, F. and Wautelet, M., Medical lasers and laser-tissue interations, **Physics Educ.**, v.34, p.156-161, 1999.
73. SALET, C., Moreno, G. and Ricchelli, F., Effectos of photodynamic action on respiration in nonphosphorylating mitochondria, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.358, p.257-263, 1998.
74. CASTRO-E-SILVA, O., Zucoloto, S., el al, Spectral responde for laser enhancement in hepatic regeneration for hepatectomized rats, **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 32, p.50-53, 2003.
75. LEHNINGER, A. L. (1962) *Physiol. Rev.* 42, 462-517.
76. MARZZOCO, A., and Torres, B. B., Bioquímica básica, 2 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1999, 360p.
77. MITCHELL, P., Coupling of phosphorylation to elétron and hydrogen transfer by a chemi0osmotic type of mechanism, **Nature**, v. 191, p.144-147, 1961.
78. MITCHELL, P. and Moyle, J., Stoichimetry of proton translocation through the respiratoty chain and adenosine triphosphatase systems of rat liver mitochondria, **Nature**, v. 208, p.147-151, 1965.
79. GORNALL, A. G., Bardawill, C. and David, M., Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, p. 751-766, 1948.
80. MORIMOTO, Y., Arai T., et al, Effect of low-intensity argon laser irradiation on mitochondrial respiration. **Laser in Surgery and Medicine**. v.15, p.101-199, 1994.

Apêndice

a. Lei de Beer-Lambert

Quando a luz passa através de uma amostra ou quando ela é refletida por uma amostra, a quantidade de luz absorvida é a diferença entre a radiação incidente (I_0) e a radiação transmitida (I). A quantidade de luz absorvida é expressa tanto como transmitância ou absorbância.

Transmitância é dada normalmente em termos de uma função da radiação transmitida (I) ou como uma percentagem, sendo definida como:

$$T = I/I_0 \text{ ou } \%T = (I/I_0) 100 \quad (\text{a-1})$$

A absorbância é definida como:

$$A = -\log T \quad (\text{a-2})$$

A primeira formulação matemática relacionando transmitância da luz com concentração de uma substância foi atribuída a Lambert em 1760, embora Bouguer tenha verificado este efeito em 1729:

$$T = I/I_0 = e^{-kb} \quad (\text{a-3}).$$

Com T sendo a transmitância, I a intensidade transmitida, I_0 a intensidade incidente, k uma constante e b o caminho óptico (cm).

A lei de Beer idêntica à lei de Bouguer, exceto que está relacionada com a concentração. A quantidade de luz absorvida é proporcional ao número de moléculas que absorvem a luz, no caminho óptico investigado.

Combinando as duas leis, encontramos que:

$$T = I/I_0 = e^{-kbc} \quad (\text{a-4})$$

Onde c é a concentração das espécies absorvedoras. Aplicando o logaritmo na equação A-4 encontramos:

$$A = -\log T = -\log(I/I_0) = \log(I_0/I) = \epsilon bc \quad (\text{a-5}).$$

Onde ϵ é a absorção molar ou coeficiente de extinção. Esta expressão é conhecida normalmente como lei de Beer.

b. Conceitos básicos de fluorescência.

A fluorescência é a emissão de radiação resultante do decaimento da molécula de um dos estados excitados singletos, S_1 e S_2 , para o estado singlete fundamental S_0 .

A fluorescência é um método que vem sendo utilizado em muitas áreas da ciência. Devido a grande sensibilidade da técnica, pode-se trabalhar com soluções bastante diluídas, entre 10^{-5} a 10^{-8} M. Uma outra vantagem da técnica é a seletividade.

Os tempos de vida de fluorescência são da ordem de 10^{-7} a 10^{-9} segundos, que são relativamente longos comparados aos fenômenos moleculares. Nesta escala de tempo vários processos podem ocorrer, tais como: reações de protonação, de desprotonação e reorientação do cromóforo.

O tempo da molécula no estado excitado depende da competição entre a emissão radiativa e outros processos não radiativos de relaxamento. Estes processos não radiativos correspondem aos mecanismos alternativos para as moléculas excitadas dissiparem o excesso de energia e retornarem ao estado fundamental resultando na diminuição ou supressão de fluorescência.

A figura b-1, apresenta o diagrama de Jablonski, onde se pode observar a absorção e os vários caminhos possíveis para de-excitação da molécula. Os processos não radiativos que competem com a fluorescência são: conversão interna (CI), cruzamento intersistema (CIS) e supressão de vários tipos.

Figura b-1: Diagrama de Jablonski resumindo os processos que ocorrem.