

CAPÍTULO 1

Introdução

1.1 As porfirinas na Medicina e Biologia

As porfirinas e seus derivados são compostos bem conhecidos nos sistemas vivos. Biomoléculas tais como citocromos, clorofilas - responsáveis pela fotossíntese, grupo heme - centro ativo de hemoglobinas, etc., são análogos de porfirinas e são imprescindíveis para o funcionamento de vários sistemas biológicos.

As porfirinas são alvos de diferentes campos de interesse, obtendo diversas aplicações, as quais tem aumentado constantemente com o decorrer dos anos. Uma de suas aplicações mais importantes se encontra na área da Medicina.

Devido às suas interessantes propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fototerapêuticas tais como fotoatividade, fotoestabilidade, estabilidade química, intensa absorção na região espectral visível e no infravermelho próximo e acumulação preferencial em tecidos tumorais, as porfirinas se tornaram os principais compostos usados no tratamento de câncer através da Terapia Fotodinâmica [1, 2]. Além do uso em oncologia, derivados de porfirinas estão sendo aplicados no tratamento de infecções virais, inclusive AIDS [3], psoríase [4], degeneração macular relacionada à idade (DMRI) [5] ou ainda como agentes de contraste em tomografia de fluorescência de tumores [6]. Os complexos de porfirinas com metais paramagnéticos (Fe^{3+} , Mn^{3+} , etc.) estão sendo estudados como possíveis agentes de contraste em tomografia por RMN [7, 8].

Entretanto, a eficácia biológica de derivados de porfirina depende fortemente do seu estado de agregação. A agregação das porfirinas modifica as características dos seus estados eletrônicos, alterando portanto, suas características espectrais e energéticas, levando à redução da sua eficácia nas aplicações médicas. Este processo é altamente

influenciado pela estrutura da molécula de porfirina e sua concentração, pelas características físico-químicas do ambiente, como por exemplo, temperatura, pH, força iônica, polaridade e viscosidade do solvente e pela interação da porfirina com outras moléculas [9-12].

Neste trabalho buscamos avaliar a influência do pH e da força iônica na interação das porfirinas meso-tetrasulfonatofenil – TPPS₄ e meso-tetrametilpiridil – TMPyP com sistemas microheterogêneos naturais (membranas e células neoplásicas) e sintéticos (micelas de diferentes cargas superficiais) e a influência desta interação na formação de agregados das porfirinas. Além disso, apresentamos um estudo comparativo entre a internalização e a fotoatividade das porfirinas e corantes ciânicos com dois cromóforos em células de adenocarcinoma coloretal humano – HT29.

Fundamentação Teórica

1.2 Terapia Fotodinâmica

Além das técnicas convencionais de combate ao câncer, atualmente uma nova técnica está sendo colocada à disposição da medicina: a Fotoquimioterapia e sua forma mais conhecida, a Terapia Fotodinâmica (do termo inglês *Photodynamic Therapy – PDT*). A PDT é uma inovadora e promissora modalidade terapêutica que emprega a combinação de luz visível, uma droga (fotossensibilizador – FS) e oxigênio molecular na destruição seletiva de tecidos tumorais. Embora sua principal aplicação seja o tratamento de câncer, o uso da PDT tem se estendido a tratamentos não-oncológicos, em especial no tratamento de doenças dermatológicas e oftalmológicas [4-5]. Além disso, o seu uso na inativação de bactérias, fungos e vírus (incluindo HIV) têm sido documentado [3, 13-15].

1.2.1 Histórico

O efeito fotodinâmico baseado na associação de luz, oxigênio e compostos fotossensíveis foi descrito primeiramente por Raab em 1900, após observar que um derivado de acridine era inofensivo ao *Paramecium* no escuro, porém letal quando este organismo era exposto à luz visível [16]. As primeiras experiências visando a aplicação do efeito fotodinâmico no tratamento de tumores em humanos foram feitas em 1903 por Tappenier, usando eosina como fotossensibilizador [17]. Embora os resultados tenham sido positivos este trabalho não sofreu continuidade. Posteriormente, em 1924, Policard observou uma emissão de luz vermelha pelos tumores quando estes eram expostos à luz UV e atribuiu este fato à localização de porfirina nos tecidos tumorais [18]. A partir de então as propriedades fotossensibilizadoras das porfirinas começaram a ser exploradas. Em 1961 Lipson e seus colaboradores reportaram um caso de tratamento bem sucedido de câncer, empregando derivados de hematoporfirina (HpD) e sugeriram a utilização destes compostos como método de detecção fluorescente de lesões neoplásicas [19]. Em 1976, Weishaupt e seus colaboradores postularam que o oxigênio molecular no seu estado excitado, chamado oxigênio singlete, gerado durante a irradiação do tumor na presença do fotossensibilizador, era o agente citotóxico responsável pela desativação das células tumorais [20].

Embora as propriedades fotodinâmicas de derivados da HpD terem sido descritas em 1960, o tratamento de câncer via PDT em humanos obteve grande impacto com os trabalhos do Dr. Thomas J. Dougherty e sua equipe em 1978, que apresentaram uma série de pacientes tratados com sucesso pela PDT utilizando derivados de hematoporfirina [21]. Os pacientes responderam ao tratamento, uma vez que as terapias convencionais haviam fracassado. A PDT passou então a ser reconhecida como uma alternativa para o tratamento de câncer.

HpD e sua fração ativa – Photofrin[®] (nome comercial dado a uma mistura oligomérica de ésteres e éteres de HpD) aprovados pelo FDA em 1994, constituíram,

portanto, a primeira geração de fotossensibilizadores, os quais têm sido extensivamente usados em aplicações clínicas [1].

1.2.2 Terapia Fotodinâmica: Mecanismos de Ação

O princípio da PDT [1] é introduzir no organismo do paciente um fotossensibilizador (FS), não ativo no seu estado fundamental, e esperar por um certo tempo (que dependerá da droga e do tipo de tumor) até que a sua maior parte tenha penetrado no tecido doente. Em seguida ilumina-se a região do corpo a ser tratada com luz visível, geralmente dentro da região de comprimentos de onda chamada "janela terapêutica" – entre 600 e 800 nm, devido a maior transparência dos tecidos biológicos nesta região.

Após absorver um fóton, a molécula do FS passa do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singleto (S_n) e pelo processo não radiativo de conversão interna de energia, a molécula passa ocupar seu estado excitado singleto S_1 . Neste estado excitado o FS pode emitir um fóton de fluorescência voltando para o estado fundamental e esta fluorescência pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico para a detecção de células tumorais. Ainda, através do processo de cruzamento intersistemas, caracterizado pela inversão do spin eletrônico, o fotossensibilizador pode passar do estado S_1 para o estado excitado tripleto (T_1). O processo pode então seguir dois caminhos (Figura 1.1):

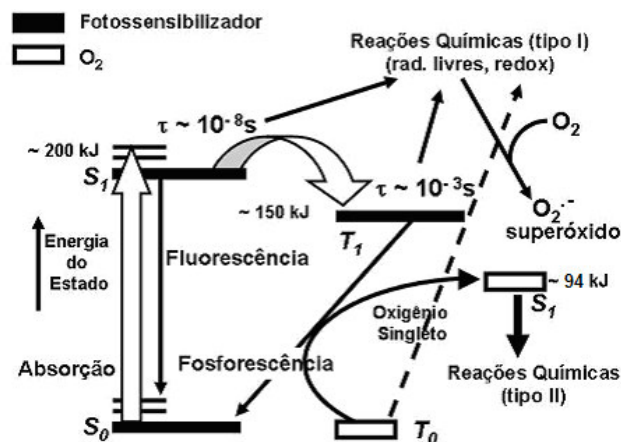


Figura 1.1) Diagrama dos mecanismos de ação envolvidos na PDT. Modificado de [1].

Mecanismo Tipo I: envolve reações de transferência de elétron entre a molécula do fotossensibilizador no seu estado excitado S_1 ou T_1 e o substrato, formando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio molecular, resultando em produtos oxidados. Os produtos formados dependem das propriedades redox do fotossensibilizador excitado e do substrato. Este mecanismo predomina quando existe uma baixa concentração de oxigênio no tumor.

Mecanismo Tipo II: a energia do estado T_1 pode ser transferida para molécula de oxigênio cujo estado fundamental é tripleto (3O_2), formando finalmente seu estado excitado singleto (1O_2). A eficácia deste mecanismo é atribuída a reação bimolecular entre o estado T_1 do fotossensibilizador e a molécula de oxigênio. Ela é maior quando o rendimento quântico do estado T_1 do fotossensibilizador é maior e seu tempo de vida mais longo, pois neste caso a produção de oxigênio singleto é mais efetiva.

Estudos sugerem que o oxigênio singleto seja a chave intermediária no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação da célula [1, 20, 22]. O 1O_2 pode induzir várias reações em cadeia com componentes moleculares e organelas das células, tais como: DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, mitocôndrias, lisossomos, etc., tendo como o resultado a morte da célula e de um modo geral a destruição do tumor [1, 21, 22].

O fator que determina se ocorrerá reação do Tipo I ou do Tipo II é a competição entre o substrato e o oxigênio molecular pelos estados excitados do FS. Portanto, o processo é dependente da concentração de oxigênio [2]. Em determinados sistemas a porcentagem de ocorrência do mecanismo tipo I é de aproximadamente 10% enquanto a ocorrência do mecanismo tipo II é de até 90 % [23]. Entretanto, este parâmetro pode variar, dependendo das características do FS usado como das propriedades do microambiente.

A eficácia da PDT está relacionada à acumulação seletiva do FS pelo tumor, o que permite a destruição de grandes áreas tumorais sem que o tecido saudável que

circunvizinha o tumor seja danificado. Esta acumulação seletiva do FS pelo tumor tem sido utilizada como base para o diagnóstico antecipado de tumores. Porém, este é um fenômeno complexo e não está completamente elucidado.

Uma das grandes vantagens para os pacientes que são tratados pela PDT é a redução de efeitos colaterais em comparação aos métodos tradicionais. A ação da luz visível não causa danos ao tecido sadio, ao contrário da radiação ionizante. Além disso, as drogas fotossensíveis utilizadas em PDT apresentam um baixo índice de toxicidade ao organismo quando comparadas aos agentes quimioterápicos mais freqüentemente utilizados [24]. Ao contrário da quimioterapia, a PDT é seletiva, uma vez que apenas a região irradiada sofre danos, visto que o $^1\text{O}_2$ possui um curto tempo de vida nos sistemas biológicos ($<0.04 \mu\text{s}$) e, além disso, possui um curto raio de ação ($0.02 \mu\text{m}$) [25]. A curta distância de difusão deste radical está associada a sua alta reatividade com constituintes das células vivas.

De um modo geral, a idéia principal da PDT de tumores é encontrar uma droga que não sofra decomposição pela luz antes de efetuar o dano fotodinâmico, incorpore preferencialmente nos tecidos tumorais em relação aos tecidos normais e seja eficiente na destruição do tecido tumoral.

1.3 Fotossensibilizadores (FS)

Derivados de Hematoporfirina (HpD) e sua fração ativa, Photofrin[®], Photogem[®] e Photosan[®], constituem a primeira geração de agentes fototerapêuticos utilizados em aplicações clínicas no tratamento de tumores.

Apesar da sua eficácia na eliminação de tumores, estes fármacos apresentam algumas desvantagens: possuem uma fraca absorção de luz na região de comprimentos de onda $> 600 \text{ nm}$, não são muito seletivos e podem induzir a fotossensibilidade da pele por várias semanas após a sua administração [1, 26]. Além disso, eles são constituídos de

misturas variáveis de porfirinas derivadas de Protoporfirina IX, de modo que não têm sido possível isolar nenhum constituinte ativo simples. Devido a estes inconvenientes, o estudo de novos compostos se torna bastante viável.

Diversos corantes estão sob investigação para aplicação em PDT. Derivados de clorinas, ftalocianinas e benzoporfirinas, chamados de segunda geração de fotossensibilizadores, têm sido desenvolvidos e alguns deles já estão sendo utilizados em PDT [27-29]. Eles apresentam uma atividade fotodinâmica favorável comparada ao Photofrin, com uma diminuição dos efeitos colaterais.

Os candidatos a FS de segunda geração devem preencher diversos critérios em relação a propriedades físico-químicas, fotofísicas, farmacológicas e fototerapêuticas. O perfil de um FS ideal pode ser descrito como [30]:

- Possuir alta pureza química, baixa tendência a se agregar em meio aquoso, alto coeficiente de absorvidade molar no vermelho ou infravermelho próximo (devido à maior penetração destes comprimentos de onda nos tecidos).
- Possuir alto rendimento quântico e tempo de vida longo do estado tripleto, pois neste caso a produção de oxigênio singleto (1O_2) é mais efetiva.
- Ser seletivo para diferentes tipos de tumores, apresentar uma eliminação rápida pelo organismo e ser menos tóxico possível no seu estado fundamental.
- Induzir a morte eficiente e preferencial das células malignas, apresentar acúmulo mínimo na pele (evitando assim a fotossensibilidade cutânea) e ausência de potencial mutagênico.

Até o momento nenhum fármaco disponível possui todas estas características e a procura por novas drogas fotossensibilizadoras continua.

Visto que na grande parte dos casos a administração do FS no organismo é feita sistemicamente (injeção intravenosa) e que o sangue possui como maior constituinte a água, FS aquo-solúveis seriam bons candidatos. Entretanto, o fotossensibilizador deve possuir afinidade aos meios hidrofóbicos, a fim de ser capaz de entrar nas células após

atravessar a membrana lipídica. Portanto, moléculas anfifílicas, cuja polaridade possa ser alterada pela adição de cadeias laterais, são candidatos ideais para aplicação em PDT.

Um dos caminhos promissores de desenvolvimento da PDT é a utilização de precursores endógenos de fotossensibilizadores. Neste caso, a estratégia que vem sendo utilizada é o uso do ácido aminolevulínico – ALA, precursor metabólico da Protoporfirina IX (PpIX). A PpIX pelo fato de ser endógena, apresenta um menor grau de toxicidade para o organismo. Administrando-se ALA ao paciente gera-se então um aumento temporário na produção de PpIX, que apresenta uma grande afinidade por células tumorais [1, 31].

Uma outra estratégia que vem sendo desenvolvida é a vetorização do fotossensibilizador, visando melhorar a seletividade e a acumulação destes compostos pelos tecidos tumorais. Diversos métodos de vetorização estão em desenvolvimento, sendo a maioria deles baseados em microesferas e nanopartículas, associadas à proteínas específicas ou anticorpos monoclonais [32,33]. Esta é a chamada terceira geração de fotossensibilizadores para PDT.

1.3.1 Porfirinas

As porfirinas são moléculas orgânicas de coloração intensa com forte absorção da luz na região visível devido à presença de um cromóforo tetrapirrólico cíclico conjugado na sua estrutura. A estrutura do anel porfirínico contém 4 átomos de nitrogênio. Entre eles, dois podem ser facilmente protonados, desprotonados ou ainda ligados com átomos de metais. Os termos porfirina desprotonada, monoprotonada e biprotonada são usados como referência às cargas 0, +1 e +2, respectivamente, e podem ser representadas como H_2P , H_3^+P e $H_4^{2+}P$ (Figura 1.2).

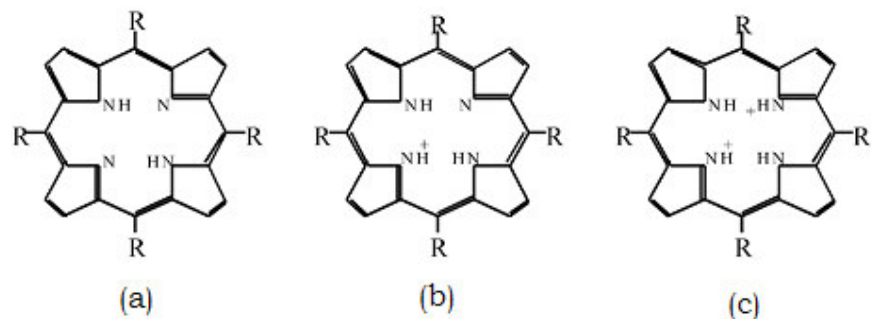


Figura 1.2) a) Porfirina desprotonada; b) porfirina monoprotonada; c) porfirina biprotonada.

Atualmente, derivados de porfirinas são os compostos mais utilizados na clínica médica em PDT. Vários tipos de tumores, tais como linfoma cutâneo, mesotelioma, câncer esofageal, testicular, gástrico, laringeal, coloretal, pulmonar, de bexiga, de mama, etc., foram tratados através da PDT com uso de porfirinas [34, 35].

1.3.2 Derivados de cianinas

Várias publicações têm reportado sobre o interesse de cianinas para a utilização em PDT [36, 37]. Estes compostos possuem uma intensa absorção na região visível e infravermelho próximo ($\epsilon \approx 10^5$), são aquo-solúveis, quimicamente e fotoquimicamente estáveis e não-citotóxicos. As cianinas possuem alta afinidade com estruturas celulares, principalmente com ácidos nucleicos [38, 39] e por isso são amplamente utilizadas como agentes de contraste em biologia celular.

1.4 Distribuição intracelular dos fotossensibilizadores e dano aos alvos subcelulares

A localização do fotossensibilizador é um parâmetro extremamente importante na compreensão do mecanismo de fotocitotoxicidade envolvido em PDT. Visto que a distância de migração das espécies reativas formadas pelo fotossensibilizador é pequena, a eficácia e o mecanismo de ação destes compostos depende do alvo celular envolvido (DNA,

proteínas, membrana celular externa ou interna, etc).

A localização preferencial de um fotossensibilizador na superfície da célula ou no seu interior pode determinar a eficiência da ação fotodinâmica e o tipo de morte celular (necrose ou apoptose) [35]. Fotossensibilizadores que se localizam na mitocôndria, como Photofrin, ou que são produzidos na mitocôndria, como a PpIX, induzida pelo ALA, geralmente induzem a apoptose ou morte celular programada, provocada pela quebra da cadeia respiratória celular. Fotossensibilizadores localizados na membrana plasmática possuem uma maior probabilidade de causar necrose durante exposição à luz.

Com algumas exceções, somente as porfirinas incorporadas dentro das células levam a fotoinativação. Isso ocorre presumivelmente porque a produção de $^1\text{O}_2$ fora da membrana é suprimida pelo solvente antes que a sua difusão através da membrana possa ocorrer [40]. Portanto, um dos principais parâmetros que governam a eficiência de um fotossensibilizador é a sua habilidade, após a localização na membrana plasmática, em atravessá-la e atingir alvos intracelulares.

A seletividade celular e distribuição subcelular de um fotossensibilizador *in vitro* depende de vários fatores, tais como o mecanismo pelo qual o FS entra na célula, a estrutura química do fotossensibilizador (hidrofobicidade/hidrofilicidade, tipo e número de cargas, etc) e das características bioquímicas e fisiológicas do tumor [41]. *In vivo*, a situação é ainda mais complicada. Quando o FS é introduzido na corrente sanguínea, ele interage com proteínas do sangue e/ou lipoproteínas e conseqüentemente sua penetração nas células será determinada não somente pelas suas propriedades mas pelas propriedades dos componentes sanguíneos que o carregam [2].

Assim a internalização e a determinação da localização dos FS em linhagem de células neoplásicas e a sua fotoatividade *in vitro* é o passo preliminar para determinar sua eficácia no tratamento de câncer através da fotoquimioterapia, em especial PDT.

1.5 Agregados moleculares

O fenômeno de agregação é de grande importância na natureza. O elemento principal na arquitetura da célula viva, a membrana, é o resultado de agregação dos fosfolipídios, que formam uma bicamada separando o interior da célula do ambiente exterior. Em plantas, a fotossíntese ocorre devido a antenas de armazenamento de luz e centros fotoreativos, os quais são compostos de uma associação supramolecular de moléculas de clorofila.

Este fenômeno recebe várias aplicações em diversas áreas como Química, Física, Engenharia, etc. Cristais moleculares são estudados pelas suas estruturas e aplicações em química do estado sólido e ciência de materiais. A criação de vários dispositivos nanoeletrônicos, sensores e sistemas fotoquímicos para a conversão de energia, por exemplo, baseia-se na utilização de agregados moleculares [42, 43].

Um agregado pode ser considerado como um aglomerado de algumas partículas ou moléculas, que se juntam sem ligações químicas. Ele é caracterizado pela sua estrutura espacial (posição relativa de partículas dentro do agregado) e pelo número de agregação n (número médio de partículas no agregado). O tamanho destes sistemas complexos pode variar de poucos nanômetros (micelas) a vários micrometros ou mais (filmes finos, membranas).

Apesar do efeito de agregação ser estudado durante várias décadas, diversos aspectos teóricos e experimentais do problema ainda não estão bem estabelecidos e continuam atraindo a atenção de pesquisadores no mundo todo. O estudo da dinâmica de formação de tais sistemas, por exemplo, é interessante e necessário na compreensão das funções associadas à eles.

O mecanismo de formação de agregados moleculares baseia-se na ação de forças intermoleculares tais como eletrostática, interação π - π , pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e o efeito hidrofóbico. Estas interações são relativamente fracas quando comparadas às ligações covalentes. Entretanto, a modulação dessas interações pode de

alguma maneira influenciar as características do agregado, modificando seu número de agregação e/ou sua estrutura espacial.

Os estudos da agregação de compostos em sua interação com sistemas biológicos e biomiméticos, são de grande importância para a medicina e a biologia bem como para o desenvolvimento tecnológico. A agregação modifica as características dos estados eletrônicos dos fotossensibilizadores, alterando, portanto, suas características espectrais e energéticas, levando à redução dos rendimentos quânticos e tempos de vida dos estados excitados singleto e tripleto [44-47]. Tal processo reduz a produção de oxigênio singleto e por sua vez a atividade fotodinâmica do FS. Para os complexos de porfirinas com metais paramagnéticos, por exemplo, é típico o processo de formação de μ -oxo dímeros, o que reduz seu paramagnetismo [48, 49], diminuindo sua eficácia como agente de contraste na detecção de tumores através da tomografia por RMN.

Variações nas características do ambiente no qual estes compostos se encontram, como o aumento ou diminuição da força iônica ou do pH, por exemplo, modificam as interações eletrostáticas entre as moléculas dos fotossensibilizadores e entre os FS com sistemas biomiméticos e deste modo podem modificar a probabilidade de agregação do FS.

1.5.1 Interações responsáveis pela formação de agregados

Agregados homogêneos são constituídos de moléculas (monômeros) do mesmo composto, que se unem formando agregados de diversos graus de agregação (dímeros, trímeros, quadrímeros, etc.). A formação de agregados é um processo comum para os compostos com sistema de conjugação π . Consideremos os efeitos que exercem influência na formação de agregados [30]:

1. Interação eletrostática

As moléculas carregadas sofrem uma repulsão, cuja energia é a energia Coulombiana

$$W_Q = \frac{Q^2}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad (1.1)$$

em que Q é a carga do monômero, ϵ_0 é a constante dielétrica do meio e r é a distância entre os monômeros.

Quando os monômeros possuem momentos dipolos permanentes a força entre eles depende da sua orientação relativa. Para os dipolos livres a força resultante é atrativa. A energia dessa interação (energia de Keesom) é dada por:

$$W_K = -\frac{U^4}{3(4\pi\epsilon_0)^2 kTr^6} \quad (1.2)$$

em que U é o momento dipolo do monômero, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura em graus Kelvin.

Além dessas interações, entre duas moléculas ou dois átomos sempre existe uma força atrativa conhecida como "força de London", "força de dispersão" ou "força de dispersão de van der Waals". A origem dessa força é a interação entre dois dipolos, que cada partícula induz uma na outra. A energia dessa interação é dada por:

$$W_L = -\frac{3}{4} \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (1.3)$$

em que h é a constante de Planck, ν é a frequência de absorção eletrônica e α é polarizabilidade elétrica da molécula.

Entre essas três interações, a eletrostática repulsiva é de longo alcance, pois é proporcional a $1/r^2$. As duas atrativas, que são proporcionais a $1/r^6$, são mais eficientes em distâncias curtas.

Além disso, para distâncias muito curtas entre as moléculas, mais uma interação repulsiva se destaca, devido, principalmente, à repulsão eletrostática entre os núcleos dos átomos que compõem as moléculas. Essa interação repulsiva é proporcional a $1/r^{12}$.

A energia potencial da interação total pode ser apresentada pelo potencial de Lennard-Jones mais a energia da repulsão eletrostática (Figura 1.3).

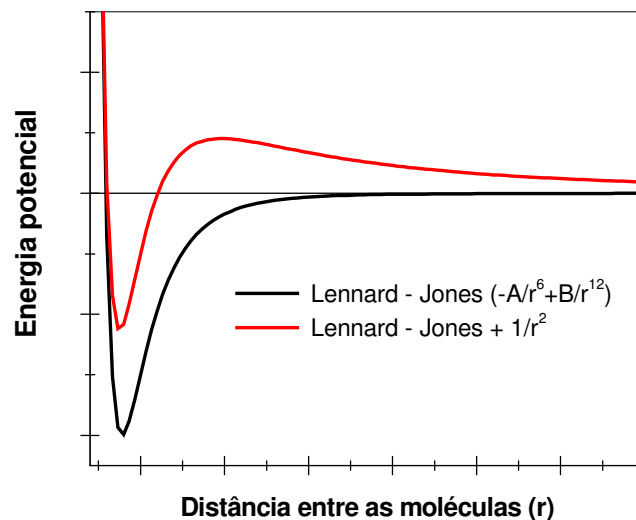


Figura 1.3) Curvas de energia potencial para interação entre partículas.

Finalmente, para se associar e atingir o mínimo da energia potencial as moléculas carregadas devem ultrapassar uma barreira de potencial, que existe devido à repulsão eletrostática.

2. Formação de pontes de hidrogênio

Essa ligação se forma entre átomos eletronegativos de uma molécula e o átomo de hidrogênio de outra. Para ser realizada os monômeros devem se aproximar para que as nuvens eletrônicas dos átomos que formam essa ligação se sobreponham. Esta interação é eficiente para distâncias curtas e pode produzir um poço de energia mais profundo, favorecendo a estabilização do agregado.

3. Formação de complexos π - π

As moléculas com sistemas desenvolvidos de conjugação π são capazes de formar complexos através da sobreposição de suas nuvens de elétrons π (Figura 1.4).

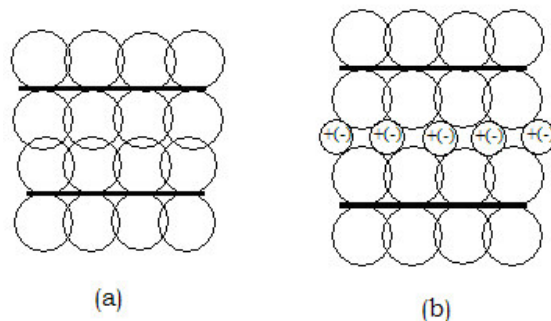


Figura 1.4) Sobreposição de nuvens de elétrons π durante agregação de duas moléculas na ausência (a) e na presença (b) de íons de sal (positivos ou negativos).

Esse tipo de ligação é eficiente somente em distâncias curtas, como no caso de pontes de hidrogênio.

4. Interação hidrofóbica

Quando moléculas hidrofóbicas, que interagem fracamente com moléculas de água, são introduzidas numa solução aquosa, elas quebram as pontes de hidrogênio entre as moléculas de água, alterando a sua estrutura. Esse processo é acompanhado pelo aumento da energia livre da solução.

A tendência das moléculas hidrofóbicas é, então, promover a associação das regiões não polares de duas moléculas, fazendo com que o número de pontes de hidrogênio quebradas diminua e, conseqüentemente, o aumento da energia livre se tornará relativamente menor. Esta é a descrição simplificada do efeito hidrofóbico.

Essa interação atrativa possui o papel principal na formação de membranas biológicas, micelas, vesículas, etc. Dependendo do tamanho e da hidrofobicidade das moléculas, essa interação pode ser considerada tanto de longo quanto de curto alcance.

1.5.2 Agregados J e H

Entre os agregados moleculares existem duas importantes classes que possuem um arranjo altamente ordenado das moléculas que os constituem. Eles são conhecidos como agregados J e H, nos quais as moléculas estão dispostas em diferentes modos.

O agregado J é um arranjo de moléculas dispostas lado-a-lado enquanto que arranjos de moléculas dispostas face-a-face são chamados agregados H. Ainda, em muitos casos, podem ser observados os agregados mistos HJ, onde o contato face-a-face não é completo (Figura 1.5).

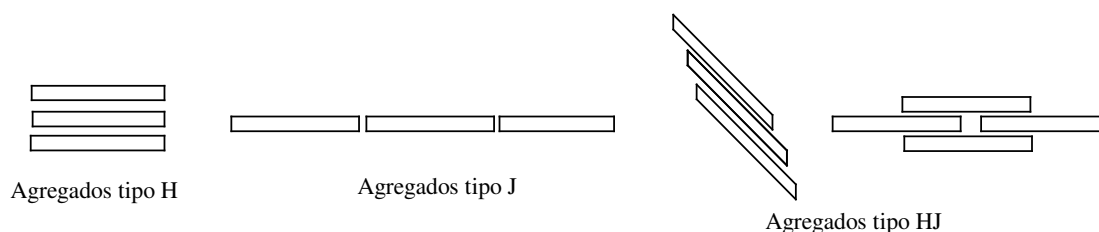


Figura 1.5) Geometria dos agregados do tipo H, J e HJ.

A estabilidade do agregado depende da área de contato entre os monômeros. Por isso, os agregados H, onde as moléculas possuem uma maior área de contato, deveriam ser mais estáveis. Contudo, vários fatores podem atrapalhar a formação de agregados do tipo H, favorecendo a formação de agregados do tipo J.

A primeira descrição para a formação de agregados J ocorreu em 1936 [50]. Estes eram agregados unidimensionais de cianinas, os quais são usados como eficientes fotossensibilizadores em emulsões fotográficas. Algumas porfirinas iônicas que formam agregados similares foram descobertas posteriormente, em 1971 [51].

1.5.3 Níveis de energia e espectros de absorção ótica dos agregados

As propriedades eletrônicas e óticas dos agregados moleculares são distintivamente diferentes daquelas dos seus monômeros constituintes. Os níveis de energia dos agregados dependem da orientação relativa entre os dipolos dos monômeros [52]. Pode-se escrever as Hamiltonianas para os dímeros como:

$$H = H_1 + H_2 + V = 2 H_1 + V \quad (1.4)$$

em que H_1 e H_2 são as Hamiltonianas dos monômeros livres, e V é um operador, que

descreve a interação dipolo-dipolo:

$$V = \frac{(U_1 * U_2)}{r_{12}^3} - 3 \frac{(U_1 * r_{12})(r_{12} * U_2)}{r_{12}^5} \quad (1.5)$$

em que U_1 e U_2 são os operadores de momento de dipolo dos monômeros 1 e 2, respectivamente, e r_{12} é a distância entre os centros dos dipolos.

As energias dos estados eletrônicos para os dímeros podem ser obtidas resolvendo a equação de Schrödinger com a Hamiltoniana descrita acima. Seguindo os critérios da mecânica quântica apenas duas funções de onda satisfazem a equação. Diante disso, as frequências de absorção podem ser descritas como:

$$\begin{aligned} \nu_+ &= \frac{1}{h}(V_{0a} + V_{12}) \\ \nu_- &= \frac{1}{h}(V_{0a} - V_{12}) \end{aligned} \quad (1.6)$$

em que V_{0a} é a soma da energia dos monômeros individuais, V_{12} é a energia potencial de interação entre os monômeros 1 e 2 e h é a constante de Planck.

O momento de transição é:

$$\begin{aligned} D_{0A^*} &= D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta \\ \sqrt{D_{0a}} &= |\langle \phi_{10} | U_1 | \phi_{1a} \rangle| = |\langle \phi_{20} | U_2 | \phi_{2a} \rangle| \end{aligned} \quad (1.7)$$

em que θ é o ângulo entre os dipolos de transição dos monômeros 1 e 2.

Assim, as intensidades relativas das bandas dos espectros de absorção dependem do ângulo entre os dipolos das moléculas, que formam os agregados, e podem ser calculadas pelas equações 1.5, 1.6 e 1.7.

A característica principal dos agregados J é que eles exibem uma banda de absorção ótica deslocada para o vermelho em relação à banda de absorção do monômero. O espectro de absorção do agregado H consiste em uma banda deslocada para o azul em relação a absorção do monômero. A mudança de energia das bandas de absorção tem sido explicada pela teoria dos excitons [53].

Este efeito pode ser explicado simplificadaamente da seguinte maneira: para os

agregados J o ângulo entre o momento de transição e a linha que une o centro dos monômeros é zero. Os dipolos induzidos orientam-se de tal forma, que o pólo positivo de um deles fica próximo ao pólo negativo do outro, diminuindo a energia de transição e deslocando a banda de absorção para comprimentos de onda maiores (Figura 1.6a). Nos agregados H os momentos de transição dos monômeros são perpendiculares à linha que os une. Desta forma a onda eletromagnética induz a formação de dois dipolos, onde cargas semelhantes se aproximam, aumentando a energia de transição e deslocando a banda de absorção para comprimentos de onda menores (Figura 1.6b).

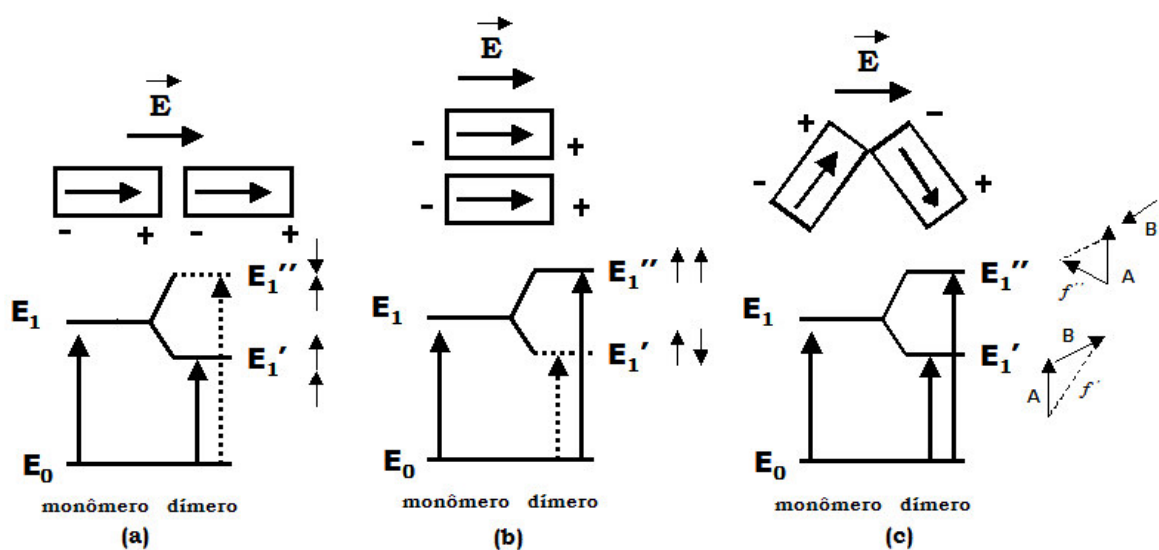


Figura 1.6) Diagrama de energia para dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição. (a) Agregados J ; (b) Agregados H e (c) Agregados mistos. As setas indicam a orientação dos momentos de dipolo de cada monômero, as linhas contínuas e tracejadas (dos dímeros) representam a transição de maior e menor probabilidade, respectivamente. Modificado de [53].

1.6 Agregados de porfirinas

Em diversos processos biológicos, as porfirinas podem existir na forma monomérica ou na forma agregada, assumindo a forma de dímeros, trímeros ou de agregados ainda maiores, através da interação física ou química, dependendo do meio em que se encontram.

Os mecanismos que regem o fenômeno de agregação das porfirinas não estão ainda completamente estabelecidos. Entretanto, é conhecido que o efeito hidrofóbico, forças de natureza eletrostática e de van der Waals, contribuem para a formação de agregados e complexos moleculares [30, 54]. Hunter e Sanders mostraram que a interação π - π entre as moléculas aromáticas, em especial as porfirinas, possui um papel importante na sua agregação no estado sólido e em solução. Concluíram que as forças de van der Waals se manifestam em intervalos de 3.4 Å, que é o intervalo comum entre os monômeros [55]. Todas estas interações estariam envolvidas também na definição da estrutura espacial dos agregados.

A hidrofobicidade é um importante fator no processo de agregação. Porfirinas hidrofóbicas presentes em meios aquosos podem formar dímeros ou agregados maiores mais facilmente [56]. A tendência das porfirinas a sofrer agregação pode ser reduzida pela presença de cadeias polares laterais, as quais favorecem a solvatação da molécula pela água induzindo a repulsão eletrostática ou formando dificuldades estéricas [41].

Tem sido sugerido que as porfirinas que possuem na sua estrutura grupos colaterais hidrofóbicos podem penetrar na região lipídica da membrana, o que aumenta sua eficácia em PDT [57]. Por outro lado a alta hidrofobicidade da porfirina facilita sua agregação diminuindo sua eficácia.

As porfirinas solúveis em água apresentam uma menor possibilidade de se agregar e são também capazes de atravessar a membrana celular. Além disso, foi observado um eficiente acúmulo de porfirinas hidrofílicas no seio tumoral [58]. Por isto, considera-se importante estudar a interação de modelos de sistemas biológicos com porfirinas solúveis em água, em comparação com as porfirinas hidrofóbicas.

Além da influência da estrutura da molécula de porfirina, a formação de agregados depende de vários fatores, tais como pH, força iônica e interação com outras moléculas. Mudanças na força iônica ou protonação da molécula podem induzir ou reduzir o processo de formação de agregados devido à mudança da interação eletrostática entre as moléculas

do composto fotoativo [9, 10]. Além disso, a presença de sistemas microorganizados como membranas biológicas, micelas e macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas), pode influenciar na agregação ou desagregação das porfirinas [11-12].

Afetando o equilíbrio entre monômeros e agregados, as condições externas afetam não somente a estrutura dos agregados, mas também o tempo de agregação, o qual pode ser alterado de segundos para horas. Provocando a agregação ou a desagregação, estes fatores exercem uma grande influência na eficácia das porfirinas em suas aplicações médicas.

As características das drogas (FS) no organismo sofrem a influência de vários fatores:

- Ao ser introduzido na corrente sanguínea do paciente (injeção intravenosa), o composto fotoativo (porfirina) aparece num meio onde se encontram várias estruturas biológicas, tais como eritrócitos, leucócitos, linfócitos, fagócitos, etc. e macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, etc.) [59]. Os fotossensibilizadores hidrofílicos são em grande parte transportados pela albumina enquanto os fotossensibilizadores hidrofóbicos se ligam, em geral, fortemente à lipoproteínas distribuídas no sistema sanguíneo [2].
- A força iônica do sangue é alta devido à grande concentração de íons (aproximadamente 0,36 M). A força iônica é um fator de grande importância no estudo do processo de agregação de porfirinas, visto que ela pode induzir modificações no processo de interação das porfirinas com biomoléculas, tais como albumina e DNA, modificando, em particular, as características de sua agregação [11, 12].
- Foi mostrado que devido a uma inadequada função vascular, os tecidos tumorais possuem pH mais baixo que os tecidos normais [60]. A influência do pH no processo de formação dos agregados de porfirinas é de grande relevância tendo em vista a importância deste fator no mecanismo de acumulação das drogas usadas em PDT [61, 62]. Pequenas mudanças no pH podem levar à mudanças nas características de equilíbrio das formas protonada e desprotonada do fotossensibilizador, influenciando no

processo de sua agregação ou desagregação.

- Além disso, em PDT a droga percorre todo o corpo sendo absorvida tanto pelos tecidos saudáveis quanto pelos tecidos modificados. As células saudáveis eliminam o FS num período de 24 a 36 horas e as células cancerosas, por apresentarem um metabolismo diferenciado, retêm a droga por um período mais prolongado, cerca de 72 horas [65, 66]. Durante esse período pode-se esperar tanto a agregação quanto a desagregação da porfirina.

Embora existam vários estudos sobre o processo de agregação de porfirinas, até o momento não há estudos sistemáticos sobre a dinâmica desse processo. Portanto, estudar a dinâmica da formação de agregados é imprescindível para entender o mecanismo e determinar as características temporais deste processo, permitindo assim uma melhor avaliação dos resultados nas suas aplicações biomédicas e tecnológicas.

1.7 Aplicação de sistemas biomiméticos nos estudos biofísicos

Sendo os sistemas vivos, inclusive as células, muito complexos tanto estruturalmente quanto funcionalmente, o procedimento comum dos estudos iniciais dos processos ligados a eles é a utilização de sistemas modelos simplificados.

A ação da maioria dos compostos exógenos de atividade biológica (fármacos, por exemplo) é mediada pela membrana celular. Por outro lado, a ligação desses compostos com a membrana modifica suas características físicas (empacotamento das moléculas de lipídios, viscosidade da membrana) o que altera as condições para o transporte passivo através da membrana e induz à mudanças no funcionamento de proteínas ligadas à ela: canais iônicos, receptores, etc.

O uso de sistemas biomiméticos possibilita estudar tanto os princípios moleculares da organização estrutural e funcionamento dos sistemas naturais como as possíveis aplicações nas áreas da ciência e tecnologia [67-70]. Além disso, estes sistemas ajudam a

esclarecer os mecanismos moleculares da atividade biológica dos compostos introduzidos no organismo.

A utilização de sistemas-modelo organizados nos estudos dos mecanismos moleculares de ação de compostos com atividade biológica se mostra bastante proveitosa, pois permite esclarecer a correlação entre a estrutura, localização, orientação e agregação dessas substâncias dentro dos sistemas organizados e sua atividade funcional.

Deste modo, o conhecimento das mudanças produzidas nas características fotoquímicas e fotofísicas dos fotossensibilizadores em sua interação com sistemas biomiméticos traz importantes informações sobre suas interações com os sistemas vivos, visto que as interações nos meios biomiméticos têm similaridades com o ambiente celular.

1.7.1 Membranas biológicas e seus modelos simplificados

1.7.1.1 Membrana biológica

As membranas biológicas são sistemas naturais de alto nível de organização que podem realizar suas funções devido à presença de moléculas com atividade biológica incorporadas na sua estrutura, proteínas, em particular.

A membrana celular, denominada também membrana plasmática ou citoplasmática, representa o limite da célula com o exterior e constitui um lugar ativo de intercâmbios seletivos entre o ambiente exterior e o citoplasma. A Figura 1.7 apresenta o modelo esquemático da membrana biológica.

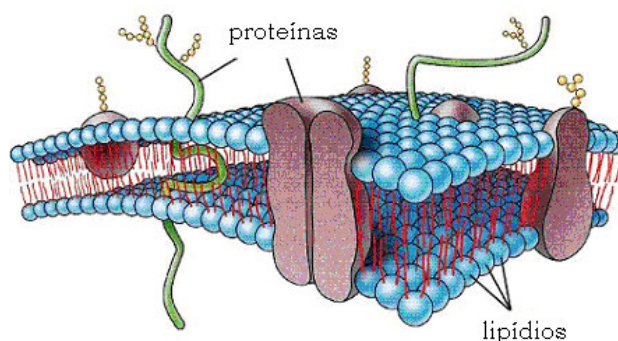


Figura 1.7) Representação esquemática tridimensional de uma seção da membrana biológica.

Segundo o modelo de Singer e Nicolson, a matriz da membrana biológica é composta por uma dupla camada de lipídios na qual estão incorporadas as proteínas [71]. Os lipídios da membrana são moléculas com caráter anfifílico, ou seja, possuem um grupo apolar de natureza hidrofóbica e um grupo polar, que pode ou não conter cargas. Os grupos hidrofílicos são denominados de “cabeça” polar enquanto os grupos hidrofóbicos são chamados de “cauda”. Assim pode-se dizer que a estrutura da membrana é composta por três regiões distintas, caracterizadas por diferentes constantes dielétricas ϵ [67]:

(a) região interna hidrofóbica, formada pela parte apolar das moléculas de fosfolipídios.

Essa região não contém água e é caracterizada por uma baixa constante dielétrica.

(b) região superficial, formada pela parte polar do fosfolipídio.

(c) entre a parte polar da membrana e o meio aquoso, existe uma região intermediária caracterizada por um alto gradiente de constante dielétrica numa distância que varia de acordo com a força iônica do meio.

Devido ao fato de que o estudo de membranas biológicas é algo extremamente complexo, visto a complexidade do próprio sistema, torna-se necessário o uso de sistemas modelos, tais como micelas, vesículas, lipossomos, etc., no estudo de fenômenos que ocorrem nas membranas.

1.7.1.2 Micelas

Como um primeiro passo no estudo da interação de porfirinas com modelos de membrana, utilizamos as micelas, por se tratar de um sistema mais simplificado.

As micelas são agregados termodinamicamente estáveis, formadas pela associação de compostos anfifílicos, também conhecidos como tensoativos, os quais contém na sua estrutura duas partes distintas: uma cabeça polar e uma cauda hidrofóbica [67].

O mecanismo de formação das micelas é um processo espontâneo e altamente cooperativo que ocorre como resposta às interações desfavoráveis entre o tensoativo e a água. Assim, as micelas se formam automaticamente fazendo com que a concentração

micelar crítica (c.m.c) seja atingida na solução do anfifílico em água.

A estrutura das micelas (Figura 1.8) mimetiza a estrutura da membrana, tendo em vista a presença das três regiões indicadas anteriormente.

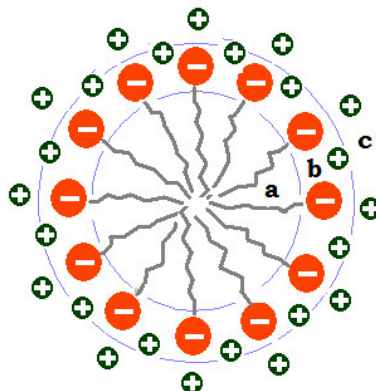


Figura 1.8) Estrutura micelar indicando as diferentes regiões que a compõe.

A formação do agregado, porém, leva o tensoativo a uma situação onde os grupos hidrofílicos (cabeças) estão muito próximos, gerando uma repulsão eletrostática que se opõe ao processo de micelização. Aqui os contra-íons desempenham um papel fundamental: blindam a carga do tensoativo, diminuindo a repulsão entre as cabeças dos monômeros.

Embora exista uma certa controvérsia no uso de micelas como modelos de membranas biológicas, uma vez que elas não possuem estrutura de bicamada e têm forma próxima à esférica, Tanford, Zana e outros [67-70] mostram que as micelas são eficazes no estudo da localização de moléculas exógenas num sistema organizado de substâncias anfifílicas. A presença de regiões polares e hidrofóbicas em sua estrutura permite estudar a afinidade de pequenas moléculas a várias regiões da membrana, caracterizadas por diferentes constantes dielétricas. Atualmente as micelas são amplamente usadas como modelos de membrana biológica [72-75].

Neste trabalho, utilizamos vários tipos de micelas, formadas de tensoativos catiônicos como CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), aniônicos como SDS (dodecil

sulfato de sódio) e zwitteriônicos como HPS (N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano sulfonato).

1.7.1.3 Células "Ghost" de eritrócitos

As células *ghost* são formadas pelas membranas externas ou pedaços de membrana de eritrócitos. Os eritrócitos, conhecidos como células vermelhas do sangue, possuem o formato de um disco bicôncavo e não possuem núcleos ou organelas, o que facilita o estudo de sua membrana plasmática, permitindo com que esta seja isolada sem contaminação de outras membranas [76].

O sistema *ghost*/fotossensibilizador é mais realístico ao estimar as características dos fotossensibilizadores quando comparado ao sistema fotossensibilizador/micela ou lipossomo [77]. Neste estudo, utilizamos células *ghost* de eritrócitos com o intuito de estudar a interação dos compostos citados com um sistema mais próximo ao sistema biológico real.

1.8 Cultura de células de adenocarcinoma coloretal humano HT29

O câncer coloretal abrange tumores que atingem o cólon (intestino grosso) e o reto. De acordo com o INCA, Instituto Nacional de Câncer, o câncer coloretal atua como a 5ª causa de morte por câncer no Brasil e como o 6º tumor maligno mais freqüente para ambos os sexos [78].

As células de adenocarcinoma coloretal humano HT29 foram utilizadas no estudo da eficiência fotodinâmica das porfirinas e biscinaninas. Este tipo celular foi escolhido em 1992 pelo INSERM – Instituto Nacional Francês de Saúde e Pesquisa Médica, a fim de padronizar as práticas em cultura celular de modo a permitir comparações interlaboratoriais naquele país.