

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

MARILEI CASTURINA MENDES

ESTUDO DAS PROPRIEDADES DAS PORFIRINAS TMPyP E ZnTPPS₄ PARA
POTENCIAL APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

PONTA GROSSA
2008

TERMO DE APROVAÇÃO

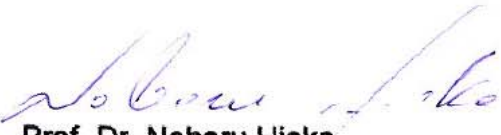
MARILEI CASTURINA MENDES

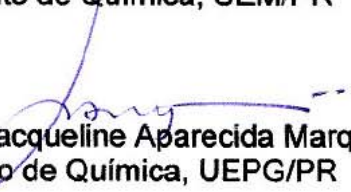
**"Estudo das Propriedades das Porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄,
para Potencial Aplicação em Terapia Fotodinâmica".**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientadora:


Prof^a. Dr^a. Christiane Philippini Ferreira Borges
Departamento de Química,UEPG/PR


Prof. Dr. Noboru Hioka.
Departamento de Química, UEM/PR


Prof^a. Dr^a. Jacqueline Aparecida Marques
Departamento de Química, UEPG/PR

Ponta Grossa, 17 de novembro de 2008.

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

M538e Mendes, Marilei Casturina
 Estudo das propriedades das porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ para
 potencial aplicação em terapia fotodinâmica. / Marilei Casturina Mendes.
 Ponta Grossa, 2008
 122f

 Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade
 Estadual de Ponta Grossa.

 Orientadora: Profa. Dra . Christiane Philippini Ferreira Borges

 1. TMPyP. 2. ZnTPPS₄. 3. Terapia fotodinâmica 4. Escherichia coli
 5. *Artemia Salina*. 6. UV-Vis. I. Borges, Christiane Philippini Ferreira.
 II. T

CDD : 547.593

MARILEI CASTURINA MENDES

ESTUDO DAS PROPRIEDADES DAS PORFIRINAS TMPyP E ZnTPPS₄ PARA
POTENCIAL APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Química na Universidade Estadual de
Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em
Química Aplicada.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Christiane Philippini Ferreira
Borges.

PONTA GROSSA
2008

Dedico aos meus pais Valdenir e Rosilda, aos meus irmãos Valdenir, José (*in memoriam*), Paulo e Suzana, a meu marido Ricardo e a nosso filho Gabriel.

Sinto saudades dos dias que caminhamos lado a lado e da amizade que sempre nos uniu. Te amo pra sempre meu irmão!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre estar ao meu lado, por me carregar nos dias difíceis e por ter me trazido até aqui.

Agradeço meus pais, que sempre se empenharam em me ensinar a retidão, o caráter, a perseverança e todos os valores que me permitiram alcançar essa conquista. Agradeço ainda o amor ímpar que sempre me dedicaram, e a doçura de suas palavras no decorrer do caminho.

Aos meus irmãos, meus sobrinhos, enfim, a toda minha família que sempre torceu e acreditou em mim.

Ao meu marido, meu amigo, meu companheiro e grande incentivador dos meus sonhos, que sempre me apoiou.

A Prof. Christiane, por ter sido mais que uma orientadora e estendido nossos laços à amizade, sendo compreensiva e paciente nos momentos em que mais precisei.

As colegas de pesquisa Juliana Hyckzy, Ariana Antonangelo e Jeanine Domareski, pela ajuda neste trabalho.

As minhas grandes amigas Ana Paula e Silvia, pela amizade, carinho e gentileza com que sempre me ajudaram e me acolheram em seus lares.

Ao Professor Fábio e a laboratorista Luzia, que se mostraram imensamente solícitos e me auxiliaram na execução dos testes microbiológicos.

Ao Professor Noboru Hioka e seus alunos que muito me ajudaram para o entendimento das técnicas colocadas em prática neste trabalho.

A Professora Shirley Nakagaki por ter gentilmente fornecido a porfirina ZnTPPS₄, para o estudo apresentado neste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a porfirina base livre, catiônica, *meso*-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina, TMPyP e a porfirina metalada, aniônica, Zinco(II)-*meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil), ZnTPPS₄, para avaliar suas possíveis aplicações em terapia fotodinâmica (TFD). Para tanto, foram investigadas através de espectroscopia molecular UV-Vis, a interação das referidas porfirinas com modelos biomiméticos, a capacidade de agregação em diferentes proporções água/etanol, o foto-branqueamento perante iluminação de LEDs vermelhos e a geração de oxigênio singlete através do teste do ácido úrico. Também foram realizados testes com a *Artemia salina* e com a bactéria *Escherichia coli*, a fim de avaliar a ação fotodinâmica *in vitro* sobre esses microrganismos. O comportamento espectral da porfirina ZnTPPS₄, foi avaliado variando-se o pH da solução de porfirina em meio aquoso e em acetato/fosfato na presença e na ausência dos surfactantes SDS (aniônico), CTAB (catiônico) e HPS (zwitteriônico). Através dessa análise, verificou-se que a mudança espectral da porfirina em decorrência da variação de pH, ocorreu em pHs menores quando a porfirina encontrou-se na presença dos surfactantes CTAB e HPS, indicando que houve interação entre porfirina/micela de surfactante, mediada por interações hidrofóbicas e eletrostáticas. A capacidade de agregação foi avaliada, acrescentando solução das porfirinas a misturas água/etanol de diferentes proporções, a fim de analisar o comportamento espectral de ambas as porfirinas com o aumento do teor de água. Através dessa análise verificou-se o deslocamento da banda Soret para comprimentos de onda menores, bem como, a diminuição da intensidade da absorbância em condição de 100% de água, fato que pode estar relacionado aos diferentes valores de coeficiente de absortividade molar das porfirinas nos solventes utilizados. A análise de foto-branqueamento foi realizado colocando-se soluções aquosas e etanólicas de porfirina sob iluminação de LEDs vermelhos durante um período total de 1 hora, e mostrou que ambas as porfirinas não se decompõem perante a fonte de luz empregada. Quanto a geração de oxigênio singlete realizado através do teste do ácido úrico, verificou-se que a geração dessa espécie é melhor em água que etanol. A porfirina TMPyP mostrou maior atividade fotodinâmica (AF) que a ZnTPPS₄, por possuir maior absorção na faixa de emissão dos LEDs empregados. Em relação aos testes microbiológicos verificou-se que o maior índice de mortalidade sobre *A. salina* ocorre na presença das porfirina e sob iluminação, indicando ação fotodinâmica das porfirinas sobre esse microrganismo. No teste feito com a *E. coli*, evidenciou-se maior inibição no crescimento das colônias desse microrganismo quando as mesmas foram tratadas com porfirinas e luz, em comparação com os controles: I) sob luz e sem porfirina; II) na presença de porfirina e sem luz; III) na ausência de luz e porfirina.

ABSTRACT

In this work is to porphyrin free base, cationic, *meso*-tetrapyrrolylporphyrin, TMPyP, and porphyrin metal, anion, zinc (II)-*meso*-Tetrakis (4-sulfonatophenyl), ZnTPPS₄, in order to assess its possible applications in photodynamic therapy (PDT). For both, were investigated by molecular spectroscopy and UV-Vis, some properties of these porphyrins, such as interaction with biomimetic models, the ability to aggregate in different proportions water/ethanol, the photo-bleaching before lighting the red LEDs and generation of singlet oxygen through the test of uric acid. Microbiological tests were also conducted with *Artemia salina* and the bacterium *Escherichia coli*, to assess the in vitro photodynamic action on these microorganisms. The spectral behavior of porphyrin ZnTPPS₄ was estimated to be varying the pH of the solution of porphyrin in aqueous medium and acetate/phosphate in the presence and absence of surfactant SDS (anion), CTAB (cationic) and HPS (zwitterionic). Through this analysis, we found that the porphyrin spectral change due to changes in pH, occurred at pHs lower when the porphyrin found himself in the presence of surfactants CTAB and HPS, indicating that there was interaction between porphyrin/micelle surfactant, mediated by hydrophobic and electrostatic interactions. The ability of aggregation was evaluated by adding the solution of the porphyrin mixtures water/ethanol in different proportions in order to analyze the spectral behavior of both porphyrins with the increase of water content. Through this analysis it was found the displacement of the Soret band for a wavelength smaller, and the decrease in absorbance intensity of the condition of 100% water, a fact that may be related to different coefficients of molar absorptivity of porphyrins in solvents used. The photo-bleaching was putting itself and ethanol aqueous solutions of porphyrin under lighting of LEDs red during a total period of 1 hour, and showed that both porphyrins do not fall apart before the light source used. As the generation of singlet oxygen conducted through the test of uric acid, found that the generation of this species is better in water than ethanol, probably because there is more molecular oxygen dissolved in the first solvent. The porphyrin TMPyP showed increased photodynamic activity (PA) that ZnTPPS₄, due to higher absorption in the range of issuing LEDs employees. Regarding microbiological tests found that the highest viewing on *A. salina* mortality occurs in the presence of porphyrin and under illumination, indicating photodynamic action of porphyrins on the microorganism. The testing done with *E. coli*, it is further inhibit the growth of this microorganism colonies where they were treated with porphyrins and light, compared with the controls: I) under light and without porphyrin; II) in the presence of porphyrin and no light; III) in the absence of light and porphyrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Detecção de lesões cancerosas por TFD: (a) tecido sendo irradiado; (b) tecido após a Irradiação.....	16
Figura 02 - Estrutura do agente fototerapêutico <i>Photofrin</i> [®] na forma de éter.....	18
Figura 03 - Medicamento <i>Levulan</i> [®] <i>Kerastick</i>	18
Figura 04 - Medicamento <i>Visudyne</i> [®]	19
Figura 05 - Mecanismos de atuação da TFD.....	22
Figura 06 - Estrutura básica das porfirinas.....	27
Figura 07 - Estrutura básica de (a) porfirinas, (b) clorinas e (c) bacterioclorinas.....	27
Figura 08 - Estrutura de porfirina de primeira geração.....	28
Figura 09 – Estrutura de porfirina de segunda geração.....	29
Figura 10 - Estrutura de porfirina de terceira geração.....	29
Figura 11 - Grupo heme presente na hemoglobina e na mioglobina.....	31
Figura 12 - Tabela periódica com os metais que podem constituir as metaloporfirinas	31
Figura 13 - Espectro de absorção de porfirinas na forma de base livre (—) e na forma metalada (—), (a) banda de Soret (b) bandas Q.....	32
Figura 14 - Agregados do tipo J e H.....	38
Figura 15 - Estrutura da: (a) micela; (b) bicamada lipídica.....	40
Figura 16 (a) – Foto-branqueamento de um composto porfirínico na presença de oxigênio singlete.....	43
Figura 16 (b) - Reações do oxigênio singlete no meio biológico. Reações com moléculas do próprio fotossensibilizador caracterizam uma via de reação de foto-branqueamento.....	44
Figura 17 - Estrutura química da porfirina TMPyP.....	51
Figura 18 - Espectros de absorção na região visível e ultravioleta da porfirina TMPyP em acetato/fosfato 20 mmol/L em função do pH (a) na faixa de pH de 0,5 até 7,0 (b) na faixa de pH 7,0 até 14,0.....	52
Figura 19 - (a) frações das componentes em função do pH na faixa de pH de 0,5 até	

7,0; (b) Frações dessas componentes em função do pH na faixa de pH de 7,0 até 14,0.....	53
Figura 20 – Estrutura química da porfirina ZnTPPS ₄	57
Figura 21 - Estrutura química da quitosana.....	61
Figura 22 - Sistema de LEDs, utilizado para iluminação das soluções de porfirina...	67
Figura 23 - Recipiente utilizado para eclosão dos ovos de <i>Artemia salina</i>	69
Figura 24 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em água em função do pH, na faixa de pH de 6,73 a 0,73.....	72
Figura 25 - Gráfico da absorbância da porfirina ZnTPPS ₄ em solução aquosa, em função do pH em 421 nm (■) e 434 nm (●).....	73
Figura 26 (a) - Espectros de absorção da porfirina TPPS ₄ em água na faixa de pH de 0,55 a 13,59.....	74
Figura 26 (b) - Gráfico da absorbância da porfirina TPPS ₄ em solução aquosa, em água em função do pH em 434 nm (■) e 413 nm (●) após ajuste pela função sigmoidal.....	75
Figura 27 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em água na faixa de pH de 7,0 a 13,2.....	75
Figura 28 (a) - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato/fosfato em função do pH na faixa de pH de 5,86 a 0,91.....	76
Figura 28 (b) - Deslocamento das bandas Q da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato/fosfato na faixa de pH de 5,86 a 0,91.....	77
Figura 29 - Gráfico da absorbância da porfirina ZnTPPS ₄ em solução de acetato fosfato, em função do pH em 421 nm (■) e 434 nm (●).....	77
Figura 30 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato/fosfato na faixa de pH de 5,83 a 13,18.....	78
Figura 31 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato fosfato na presença de SDS na faixa de pH de 5,86 a 0,96.....	79
Figura 32 - Gráfico da Absorbância da porfirina ZnTPPS ₄ em solução de acetato fosfato, na presença de SDS em função do pH em 421 nm (■) e 434 nm (●).....	80
Figura 33 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato fosfato na presença de SDS na faixa de pH de 5,90 a 13,13.....	81
Figura 34 - Espectro de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato/fosfato na	

presença de CTAB na faixa de pH de 5,83 a 0,76.....	81
Figura 35 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato/fosfato na presença de CTAB na faixa de pH de 5,79 a 13,09.....	82
Figura 36 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato/fosfato na presença de HPS, na faixa de pH de 5,88 a 0,98.....	83
Figura 37 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em acetato/fosfato na presença de HPS na faixa de pH de 5,85 a 13,22.....	83
Figura 38 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS ₄ em diferentes misturas água/etanol.....	87
Figura 39 - Espectros de absorção da porfirina TMPyP em diferentes misturas água/etanol.....	87
Figura 40 - Espectros da porfirina ZnTPPS ₄ durante o teste de foto-branqueamento em água, durante um período total de iluminação de 60 minutos.....	90
Figura 41 - Espectros da porfirina ZnTPPS ₄ durante o teste de foto-branqueamento em etanol, durante um período total de iluminação de 60 minutos.....	91
Figura 42 - Espectros da porfirina TMPyP durante o teste de foto-branqueamento em água, durante um período total de iluminação de 60 minutos.....	91
Figura 43 - Espectros da porfirina TMPyP durante o teste de foto-branqueamento em água, durante um período total de iluminação de 60 minutos.....	92
Figura 44 - Espectros de absorção da solução de porfirina ZnTPPS ₄ a 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹ em etanol, na presença de ácido úrico a 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ e sob iluminação com LEDs vermelhos por um período total de 30 minutos.....	94
Figura 45 - Espectro de emissão da fonte a base de LEDs.....	95
Figura 46 - Espectros de absorção da solução de porfirina ZnTPPS ₄ a 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹ em água, na presença de ácido úrico a 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ e sob iluminação com LEDs vermelhos por um período total de 30 minutos.....	96
Figura 47 - Espectro de absorção das bandas Q da porfirina TMPyP em água.....	97
Figura 48 - Espectros de absorção da solução de porfirina TMPyP a 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹ em etanol, na presença de ácido úrico a 10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ e sob iluminação com LEDs vermelhos por um período total de 30 minutos.....	97
Figura 49 - Espectros de absorção referentes às bandas do ácido úrico com λ_{max} em 293 nm, e da banda Soret da porfirina TMPyP durante o período de iluminação com LEDs vermelhos.....	98
Figura 50 - Espectros de absorção da solução de porfirina TMPyP a 10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹ em	

água, na presença de ácido úrico a 10^{-4} mol.L ⁻¹ e sob iluminação com LEDs vermelhos por um período total de 30 minutos	98
Figura 51 - Espectros de absorção referentes à banda do ácido úrico com λ_{max} em 287 nm, durante o período de iluminação com LEDs vermelhos na presença da porfirina TMPyP	99
Figura 52 - Toxicidade da porfirina ZnTPPS ₄ frente a <i>Artemia salina</i> sem iluminação (■) e sob iluminação (■)	102
Figura 53 - Toxicidade da porfirina TMPyP frente à <i>Artemia salina</i> sem iluminação (■) e sob iluminação (■).....	102
Figura 54 - Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, na presença da porfirina ZnTPPS ₄ sob iluminação azul (●) e iluminação vermelha (■).....	106
Figura 55 - Unidades formadoras de colônias de <i>E. coli</i> na presença da porfirina ZnTPPS ₄ (a) sob iluminação de luz vermelha e (b) sob iluminação de luz azul por 30 minutos.....	107
Figura 56 - Unidades formadoras de colônias de <i>E. coli</i> (a) na presença da porfirina ZnTPPS ₄ sem iluminação (b) sob iluminação de luz vermelha por 30 minutos e sem porfirina	107
Figura 57 - Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, na presença da porfirina TMPyP sob iluminação azul (●) e iluminação vermelha (■).....	108
Figura 58 - Unidades formadoras de colônias de <i>E. coli</i> na presença da porfirina TMPyP (a) sob iluminação de luz vermelha e (b) sob iluminação de luz azul por 30 minutos.....	108
Figura 59 – Unidades formadoras de colônias de <i>E. coli</i> (a) na presença da porfirina TMPyP sem iluminação (b) sob iluminação de luz vermelha por 30 minutos e sem porfirina.....	109
Figura 60 – Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, sem porfirina sob iluminação azul (●) e iluminação vermelha (■).....	109
Figura 61 – Unidades formadoras de colônias de <i>E. coli</i> sem porfirina e sem iluminação.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos utilizados em TFD.....	20
Tabela 2 - Distribuição eletrônica dos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado singlete ($^1O_2^*$ e 1O_2) e estado fundamental triplete (3O_2)	45
Tabela 3 - Coeficientes de absortividade molar das porfirinas ZnTPPS ₄ e TMPyP..	71
Tabela 4 - Valores das cmc's dos surfactantes SDS, HPS e CTAB.....	79
Tabela 5 - pK ₁ da porfirina ZnTPPS ₄ em diferentes meios a 421 e 434 nm.....	84
Tabela 6- pK ₂ da porfirina ZnTPPS ₄ em diferentes meios a 421 e 430 nm.....	85
Tabela 7 - Valores médios de algumas grandezas, obtidas através dos espectros do teste do ácido úrico para as porfirinas TMPyP e ZnTPPS ₄	96
Tabela 8 – Valores de Atividade Fotodinâmica (AF) determinado pelo teste do ácido úrico, de alguns fotossensibilizadores comerciais.....	100
Tabela 9 - Número de UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônias - E.coli na presença e na ausência de porfirinas, sob diferentes tempos de iluminação vermelha e azul.....	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AF – Atividade Fotodinâmica
ALA – Ácido-5-aminolivulínico
AU – Ácido Úrico
BPMDA – Derivado Benzoporfirínico Monoácido
CMC – Concentração Micelar Crítica
CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio
CuTPPS₄ - Cu(II) *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina
D₂O – Água deuterada
DEAEMA - 2 – dietilamino etil metacrilato
Dp – Deuteroporfirina
EAEC – *Escherichia coli* Enteroagregativa
EHEC – *Escherichia coli* Enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* Enteroinvasiva
EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica
ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigênica
FDA – Food and Drug Administration
Fe(III)TPPS₄ – Fe(III) *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina
FMRP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FS – Fotossensibilizador
HEMA - 2-hidroximetil metacrilato
HpD - Derivado hematoporfirínico
HPS - *N*-hexadecil-*N,N*-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato
IARC - International Agency Research on Cancer
INCA – Instituto Nacional de Câncer
LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do termo em inglês: *low- density lipoproteins*)
LED – Diodo emissor de luz (do termo em inglês: *light emitting diode*)
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
MAA - Ácido metacrílico
Mn(II)TPPS₄ – Mn (II) *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina
nm – nanômetro
OMS – Organização Mundial da Saúde
Pp IX – Protoporfirina IX
RLS – do inglês: *resonance light scattering*
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SDS - Dodecil sulfato de sódio
TAS – Toxicidade sobre *Artemia Salina*
TFD – Terapia Fotodinâmica
TMPyP - *meso*-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina
TPPS₄ - *meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina
TSA – do inglês: *tripticase soy agar*
UEPG – Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFPR – Universidade Federal do Paraná
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
UV-Vis – Ultravioleta e Visível
ZnTPPS₄ - *Zinco(II)-meso-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Terapia fotodinâmica (TFD).....	15
1.2 Mecanismos de ação da TFD.....	21
1.3 Como se faz uso da TFD.....	24
1.4 Porfirinas.....	26
1.5 Metaloporfirinas.....	30
1.6 Porfirinas como agentes da TFD.....	34
1.7 Fatores que interferem na eficiência do fotossensibilizador.....	36
1.7.1 Agregação de compostos porfirínicos.....	36
1.7.2 Localização do fotossensibilizador no tecido doente.....	39
1.7.3 Reações de foto-branqueamento.....	41
1.7.4 Geração de oxigênio singlete.....	44
1.8 Testes de toxicidade.....	46
1.9 Porfirinas TMPyP e ZnTPPS ₄	51
1.9.1 TMPyP.....	51
1.9.2 ZnTPPS ₄	57
2 OBJETIVOS.....	63
2.1 Objetivo geral.....	63
2.2 Objetivos específicos.....	63
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	64
3.1 Materiais e equipamentos.....	64
3.2 Determinação do coeficiente de absorvidade molar das porfirinas nos solventes água/etanol.....	64
3.3 Estudo espectrofotométrico da porfirina ZnTPPS ₄ sob variação de pH na ausência e na presença de surfactantes.....	65

3.4	Análise da capacidade de agregação.....	66
3.5	Reações de foto-branqueamento.....	66
3.6	Teste do ácido úrico.....	67
3.7	Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	68
3.7.1	Toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> (TAS).....	68
3.7.2	Ensaio <i>in vitro</i> : cultura bacteriana.....	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.1	Determinação do coeficiente de absorvidade molar das porfirinas nos solventes água e etanol.....	71
4.2	Estudo espectrofotométrico da porfirina ZnTPPS ₄ sob variação de pH na presença e na ausência de surfactantes.....	72
4.3	Análise da capacidade de agregação.....	87
4.4	Teste de foto-branqueamento.....	90
4.5	Teste do ácido úrico.....	93
4.6	Testes de toxicidade.....	101
4.6.1	Teste de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> (TAS).....	101
4.6.2	Ensaio <i>in vitro</i> : cultura bacteriana.....	103
5	CONCLUSÕES.....	111
6	PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....	113
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer - INCA a estimativa de casos de câncer para o ano de 2008 é de 466.730 novos casos entre homens e mulheres considerando todos os tipos de neoplasias. Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) através da International Agency Research on Cancer – IARC, apontou uma crescente incidência da doença, sendo que a previsão é de que 12 milhões de pessoas no mundo todo serão diagnosticadas ainda esse ano com a doença. Esse número pode chegar a 17 milhões no ano de 2020, ou seja, um aumento de quase 50% de casos em 12 anos.

Devido ao registro do crescimento da incidência de câncer pela comunidade científica, tem se buscado constantemente métodos de tratamento com maior eficiência de cura e que sejam menos agressivos que as terapias utilizadas atualmente, quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Dentro dessa perspectiva, a terapia fotodinâmica (TFD) surge como uma opção com potencial aplicação. Essa técnica consiste basicamente na utilização de luz com comprimento de onda adequado capaz de excitar eletronicamente uma substância fotossensível, a qual por sua vez gera espécies reativas, com capacidade de destruição celular. Para seu êxito, no entanto, é necessário que a substância fotossensibilizadora empregada, apresente características satisfatórias à aplicação do método, a luz incidente alcance o alvo desejado e por consequência dê-se origem a uma concentração razoável de espécies reativas, em especial o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$).

A comunidade científica interessada nessa nova terapia concentra esforços em estudar substâncias fotossensíveis que possam apresentar maior destruição celular com menos efeitos colaterais; transportadores eficazes capazes de localizar com precisão e em concentração adequada o fotossensibilizador (FS) no tecido

doente; fontes adequadas de luz, capazes de penetrar de forma efetiva o tecido alvo sem representar danos ao paciente, e assim tentar garantir a geração das espécies reativas necessárias ao sucesso da terapia.

As porfirinas estão entre as substâncias mais utilizadas como fotossensibilizadores comerciais e devido a isso surge o interesse em estudar os fatores que podem viabilizar e/ou otimizar a utilização desses compostos na terapia fotodinâmica.

1.1 Terapia fotodinâmica (TFD)

A terapia fotodinâmica tem como base a combinação de um composto fotossensível com luz de comprimento de onda capaz de ativá-lo, gerando espécies reativas capazes de induzir a inviabilização de células (MACHADO, 2000; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Essa terapia visa à destruição localizada de tecido anormal mediante sua necrose ou apoptose (CHARLESWORTH, 1994; SILVA, 2003). A TFD vem sendo utilizada como um tratamento alternativo no tratamento de tumores, podendo ser este de natureza benigna ou maligna (câncer), já que outras terapias para esse tipo de patologia, tais como, a radioterapia, a quimioterapia e a cirurgia, apresentam efeitos colaterais severos. No entanto, essa terapia não se restringe somente ao tratamento de tumores, mas aplica-se também no tratamento de outras doenças que têm como característica o crescimento anormal de células tais como degeneração macular da retina – doença que acomete grande parte dos idosos - psoríase, infecções bacterianas, verrugas, arteriosclerose, entre outras (BECHARA, 2004; PERUSSI, 2007; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Clinicamente, a TFD já vem sendo empregada no tratamento de alguns casos de câncer de bexiga, pulmão, pele, intestino, trato digestivo, ou seja, casos onde a penetração da luz é facilitada por simples exposição ou pelo uso de endoscópios acoplados a fibras óticas. Sua aplicação vem crescendo também no diagnóstico e delineamento de lesões por fluorescência (Figura 1), além de poder ser aliada com técnicas convencionais, para redução do tumor antes da intervenção cirúrgica bem como, da profilaxia após a cirurgia com uma pequena margem de segurança, apresentando bons resultados em ambos os casos (MACHADO, 2000; MENEZES, 2006; BEGA, 2008).

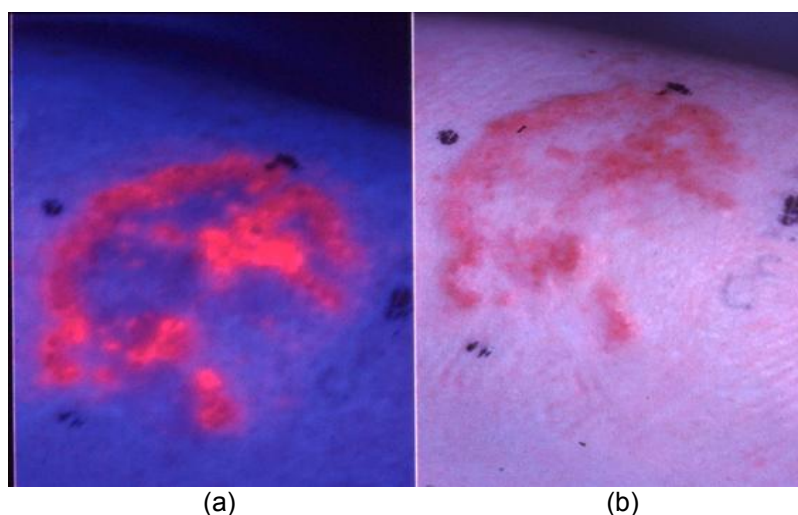


Figura 1 - Detecção de lesões cancerosas por TFD: (a) tecido sendo irradiado; (b) tecido após a irradiação (BEGA, 2008)

Essa terapia é mais eficaz quando aplicada em tumores pequenos a médio e onde a aplicação de luz é facilitada, pois nesses casos a penetração da luz se dá de forma mais fácil e os resultados são mais eficazes (MACHADO, 2000; MENEZES, 2006; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Essa modalidade de tratamento permite a completa restauração do tecido e pode ser repetida várias vezes, além de causar um mínimo de danos ao tecido saudável, sendo estas as maiores vantagens em relação aos incômodos das outras

terapias (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007b; GANDINI, et al.; 2005; MENEZES, 2006;).

A terapia fotodinâmica começou a ser utilizada de forma leiga, desde tempos remotos, com a associação de qualquer substância fotossensível e luz, mas foi somente em 1925 que estudou-se a fototoxicidade das porfirinas em tumores malignos. A partir da década de 50, com a purificação de uma hematoporfirina por Schwartz, iniciou-se a primeira geração de drogas para terapia fotodinâmica. (ALI; VAN LIER, 1999; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002)

Em 1960, Lipson, sob a orientação de Schwartz, passou a estudar o acúmulo preferencial dessas substâncias em tecidos tumorais em ratos e constatou que com a incidência de luz sobre o tecido promovia-se a regressão da doença. Dessa forma, já no final da década de 60, Lipson tratou uma mulher com câncer de mama, com êxito. Deu-se início então a TFD como terapia clínica contra o câncer. (MACHADO, 2000; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A partir da década de 70, várias preparações de derivados de porfirina começaram a ser testadas, até obtenção do *Photofrin II*[®], medicamento desenvolvido por Thomas J. Dougherty (DOUGHERTY, 1993). No fim da década de 80, a empresa QLT purificou e otimizou o produto inicial e obteve o *Photofrin*[®] (Figura 2), no ano de 2000. A natureza estrutural do *Photofrin*[®], ainda não está totalmente elucidada, sendo considerada uma mistura de oligômeros de hematoporfirina em que as ligações preponderantes entre as unidades monoméricas são ligações éster ou éter (ALI; VAN LIER, 1999; MACHADO, 2000).

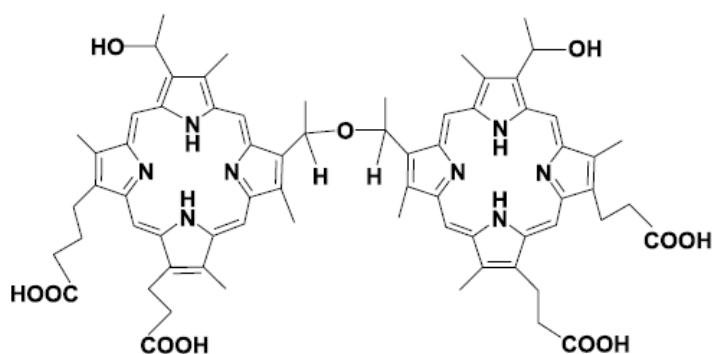


Figura 2 - Estrutura do agente fototerapêutico Photofrin® na forma de éter (MACHADO, 2000)

A segunda geração de medicamentos para a TFD busca substâncias com características foto-físicas melhores que o Photofrin®. Assim, alguns outros medicamentos tais como o *Levulan® Kerastick* (Figura 3), e mais tarde o *Visudyne®* foram desenvolvidos, sendo que este último foi desenvolvido também pela QLT em associação com a University of British Columbia e foi aceito com grande impacto pela área médica, tendo sido aprovado pelas autoridades de saúde da Suíça em 1999, pela FDA – Food and Drug Administration /EUA - em abril de 2000 e na Grã Bretanha/ União Européia em julho de 2000 (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, SALA, 2007a; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

O ácido-5-aminolevulínico, ALA, precursor do PpIX, princípio ativo do *Levulan® Kerastick*, concentra-se trinta vezes mais nos tecidos doentes que nos tecidos saudáveis e é a substância mais utilizada nos últimos anos (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, SALA, 2007a; CHAVANTES, 2007).

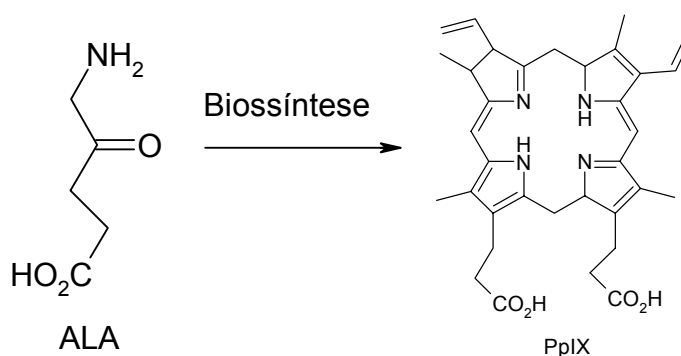


Figura 3 – Princípio ativo do medicamento *Levulan® Kerastick* (SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002)

O composto ativo do *Visudyne*[®] (Figura 4), também é um derivado da porfirina, o BPMDA, uma benzoporfirina. Contudo, esse medicamento foi aprovado somente para o tratamento de degeneração macular da retina, e encontra-se em fase de testes para a terapia do câncer e demais doenças (MACHADO, 2000).

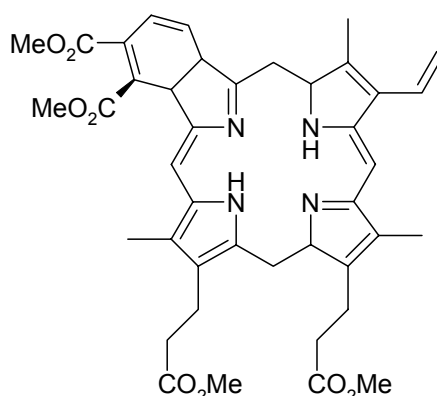


Figura 4 - Medicamento *Visudyne*[®] (SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002)

Os fotossensibilizadores mais utilizados em TFD, ainda têm sido os derivados de hematoporfirina, que são considerados de primeira geração, destacando-se o *Photofrin*[®] (americano), *Photosan*[®] (alemão) e *Photogem*[®] (russo). Todos são misturas de monômeros, dímeros e oligômeros de até oito unidades de porfirinas unidos por ligação éter ou éster e são produzidos a partir da protoporfirina IX existente na circulação sanguínea, de acordo com a tecnologia de desfribilação de sangue de animais e de humanos. Não são considerados ideais porque apresentam elevada retenção cutânea, causando efeito colateral indesejável de fotossensibilização do paciente que deve se proteger da luz por 4 a 8 semanas. Além dos mais a última banda de absorção desses FS se encontra na faixa de 620 a 630 nm com baixo coeficiente de absortividade molar (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, SALA, 2007a; MENEZES, 2006).

Há ainda os fotossensibilizadores de segunda geração, que apresentam estrutura básica semelhante às porfirinas, contudo são quimicamente puros e apresentam menor fotossensibilização cutânea. Esses FS são divididos nas seguintes classes: a) ftalocianinas e naftalocianinas, b) clorinas e bacterioclorinas, c) purpurinas. Os nomes comerciais estão citados na Tabela 1.

Tabela 1 - Medicamentos utilizados em TFD (MENEZES, 2006)

Família	Drogas aprovadas (TFD)		Data e local de aprovação	Indicações	Coefficiente de Absortividade Molar banda Q (mol.L ⁻¹ .cm ⁻¹)	λmax (nm)
Porfirina	Derivado de HpD	Photofrin®	1998 EUA	Câncer de pulmão, estômago, esôfago, bexiga, laringe, cavidade oral, pele	1,0 x 10 ⁴	630
		Photogem® Photosan®	1999 Rússia 2002 Europa			
Clorinas	Precursor da PpIX	Levulan®	1999 EUA	Câncer de pele	1,0 x 10 ⁴	450
		Metvix®	2001 Europa			
	Verteoporfirina – derivado monoacídico da benzoporfirina (BPDMA): Visudyne® m-THPC (Temoporfin): Foscan®	Photoditazine®	1999 EUA	Degeneração macular da retina	3,5 x 10 ⁴	690
			2001 Europa	Câncer de cabeça e pescoço	2,24 x 10 ⁴	652
			1999 Rússia	Câncer de pele, cavidade oral, laringe, brônquios, esôfago,	3,2 x 10 ⁴	662
	Clorina e ₆	Radaclorin®	2001 Rússia	estômago, vulva	3,0 x 10 ⁴	662
Câncer de mama, lábios, melanoma, esôfago,						
Bacterioclorina	Pheophorbite	Mono-Laspatil clorina e ₆ (NPe ₆ ou MACE)	Não aprovado	Câncer de pele, bexiga, pulmão, gastrointestinal	4,0 x 10 ⁴	654
			1999 Alemanha		3,2 x 10 ⁴	780
Ftalocianina	Ftalocianina tetrasulfonada: Photosense®		1999 Rússia	Câncer de pele, bexiga, pulmão, gastrointestinal	1,1 x 10 ⁵	675

No Brasil, a terapia fotodinâmica chegou em 2002 e já está sendo empregada no tratamento do câncer no Hospital do Câncer Amaral Carvalho, no Hospital Sírio Libanês, no Hospital Universitário da UNICAMP, no INCOR e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), todos do estado de São Paulo, obtendo bons resultados (BECHARA, 2004, MENEZES, 2006).

1.2 Mecanismos de ação da TFD

O câncer ocorre quando determinadas células de um organismo se multiplicam de maneira descontrolada devido a anormalidades nos genes. Forma-se então um núcleo sólido de células com velocidade de multiplicação muito rápida sustentada por uma rede de vasos sanguíneos. Através da corrente sanguínea ou linfática as células malignas podem atingir outros órgãos do corpo, dando origem a novos tumores, num processo conhecido como metástase. Assim, acionar um mecanismo capaz de bloquear a irrigação sanguínea e o suprimento de nutrientes a essas células é uma forma de evitar que esse processo se sustente.

O mecanismo de ação da TFD está relacionado a capacidade do fotossensibilizador absorver radiação na faixa do visível, preferencialmente próximo ao vermelho. Para que o tratamento seja satisfatório, a droga fotossensível deve se acumular, preferencialmente, no tecido doente, para que este seja irradiado de forma localizada e não ocorram danos ao tecido sadio. Assim, ao receber a radiação de comprimento de onda apropriado, as moléculas da substância passam do estado fundamental S_0 a um estado singlete excitado (S_1) e podem ter diferentes rotas de atuação (Figura 5), (ALI; VAN LIER, 1999; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2007a):

- A molécula poderá sofrer desativação do estado S_1 por colisão ou fluorescência voltando ao estado S_0 , cuja luz de emissão possibilita detecção de tecidos tumorais;
- Poderá no estado excitado (S_1 ou T_1) reagir com diferentes biomoléculas gerando radicais ou íons radicais que através de transferência de elétrons a molécula de oxigênio pode gerar radicais livres extremamente reativos, tais

como $\cdot\text{O}_2^-$ (ânion superóxido), $\cdot\text{OH}$ (radical hidroxil), que provocarão a morte celular, constituindo assim, a chamada TFD do tipo I;

- Ou ainda poderá sofrer uma conversão não radioativa entre sistemas, passando do estado S_1 para um estado triplete (T_1) e daí transferir essa energia a uma molécula de O_2 , normalmente no estado triplete ($^3\text{O}_2$), o qual será promovido a um estado singlete $^1\text{O}_2$. Esta espécie reagirá com o substrato biológico resultando no processo chamado TFD do tipo II, ilustrado na figura abaixo.

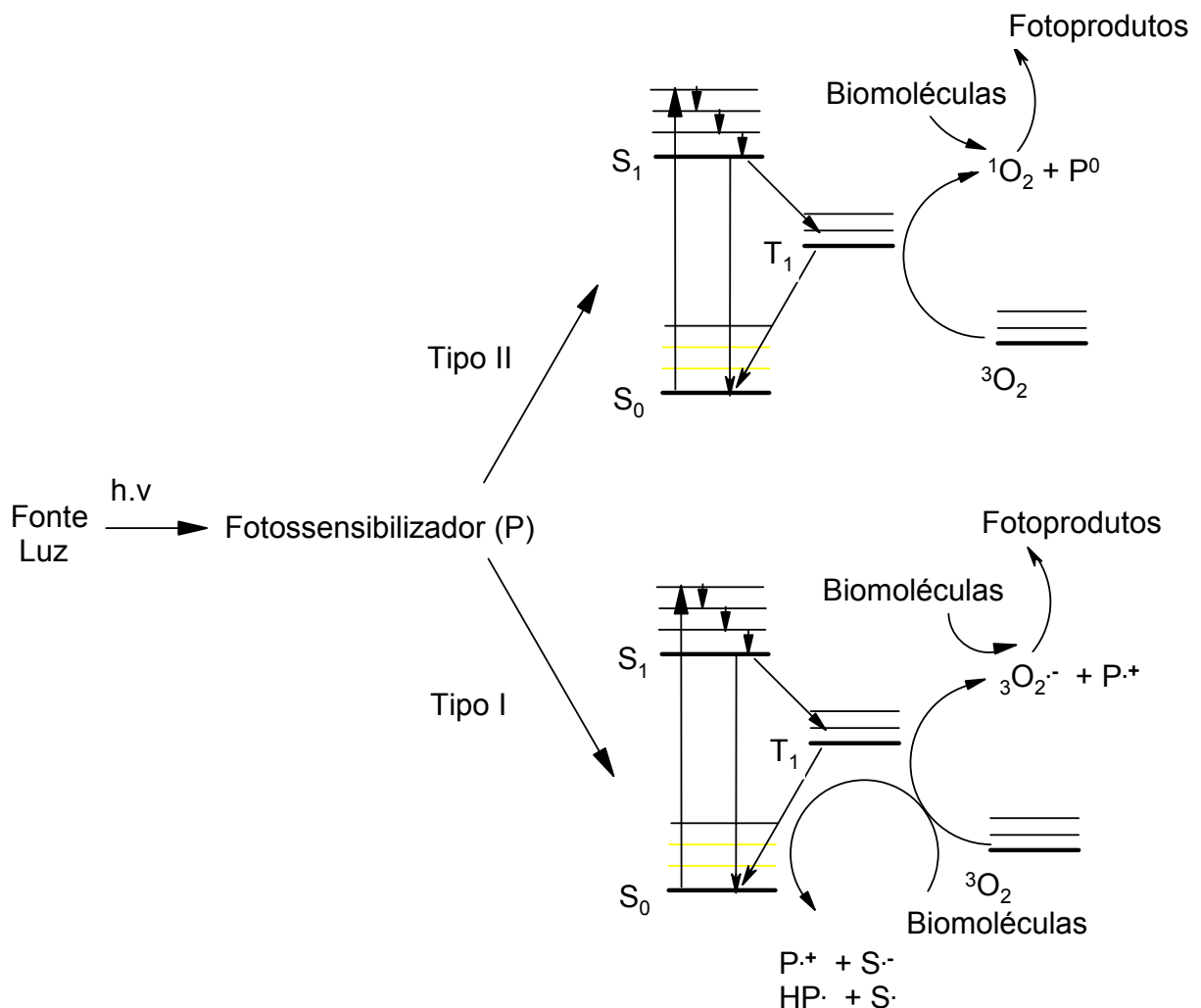


Figura 5 - Mecanismos de atuação da TFD (BORISSEVITCH; SCHABERLE, 2006)

No estado singlete o oxigênio é uma espécie altamente reativa, com tempo de vida de cerca de 0,04 μs em sistemas biológicos e por ser extremamente

oxidante poderá reagir com sítios de alta densidade eletrônica, como colesterol, cadeias laterais de aminoácidos contendo anéis aromáticos ou enxofre, ligações duplas de esteróides, DNA e membranas celulares, sendo portanto, citotóxico e levando a interrupção de processos biológicos (BECHARA, 2004; HOPPER, 2000; MACHADO, 2000; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). O mecanismo do tipo II, é o mais aceito, mas há a possibilidade de os dois tipos de mecanismos ocorrerem nos sistemas biológicos, sendo que o que determinará a ocorrência do mecanismo I ou II é a competição entre o substrato (macromoléculas) e o oxigênio pelo estado excitado do fotossensibilizador (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA b, 2007; BORISSEVITCH; SCHABERLE, 2006).

A morte celular pode ainda ser atribuída a outras espécies reativas tais como radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil ($OH^{\cdot}$) via reação Fenton e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A espécie $OH^{\cdot}$ causa avarias nas membranas celulares por reação com ácidos graxos insaturados, resultando na formação de radicais lipídicos $L^{\cdot}$, radicais alcóxil lipídicos ($LO^{\cdot}$), peróxidos lipídicos ($LOO^{\cdot}$) e hidroperóxidos lipídicos ($LOOH^{\cdot}$) (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, SALA, 2007).

Esses produtos iniciam reações em cadeia, causando danos a seções extensivas de membranas. No entanto, dos vinte aminoácidos naturais apenas cinco (cisteína, histidina, tirosina, triptofano e metionina) são altamente suscetíveis a oxidações via mecanismo de tipo I e, por isso, o mecanismo via oxigênio singlete é freqüentemente mais eficiente que processos radicalares. O oxigênio singlete possui ainda alta difusibilidade e maiores constantes de velocidade de reação com substratos corporais, facilitando sua ação (SETÚBAL, 2007)

Como o raio de ação do oxigênio singlete é muito curto (aproximadamente 0,02 μm), não se verifica logo após a irradiação a diminuição do tumor, contudo a

região mais superficial que sofre a ação da luz sofre necrose e o efeito ao restante do tumor é propagado pela falta de irrigação sanguínea do tecido. Com o sistema vascular comprometido a irrigação tumoral que alimenta as células deixa de existir e elas sofrem apoptose (MACHADO, 2000; SILVA, 2003).

1.3 Como se faz uso da TFD

Na terapia fotodinâmica o FS pode ser aplicado de forma tópica, oral ou intravenosa, dependendo da natureza do câncer. Para o uso de forma intravenosa, o medicamento que geralmente se encontra no estado sólido deve apresentar boa solubilidade no veículo utilizado para aplicação (BECHARA, 2004).

Assim que o medicamento é injetado, ele percorre todo o corpo, sendo absorvido por todas as células, no entanto, as células saudáveis eliminam essa droga em um período de 24 a 36 horas, enquanto as células cancerosas, que apresentam um metabolismo diferente, retêm essa droga por mais tempo, cerca de 72 horas. Decorrido o tempo mínimo necessário para que este se acumule preferencialmente no tecido doente, faz-se a incidência da luz. Esse tempo mínimo necessário, bem como o tempo para a excreção irá depender de cada medicamento. No caso do *Photofrin*[®], por exemplo, são necessárias cerca de 48 horas para incorporação da droga pelas células, e até 90 dias para total excreção (MENEZES, 2006; PHOTOFRIN, 2006; SILVA, 2003; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Após a decorrência do tempo de assimilação do FS, o paciente pode ser exposto a radiação direcionada, com comprimento de onda que varia de 600 a 800 nm, pois quanto maior o comprimento de onda na região do visível, menor será o espalhamento sofrido pela mesma ao penetrar o tecido. Comprimentos de onda que ultrapassam 800 nm também não são convenientes, pois acima dessa faixa

encontra-se a radiação infravermelha, que é facilmente absorvida pelas moléculas de água presentes em grande quantidade em nosso organismo (TESSARO, 2005). No caso das porfirinas e similares a excitação é geralmente realizada através das bandas Q localizadas entre 600 a 800 nm (TOMINAGA et al; 2004). Assim, ao receber a luz nessa faixa de comprimento de onda a substância fotossensível será excitada e desencadeará os processos descritos anteriormente (Figura 5), levando a morte do tecido.

As quantidades aplicadas e as características da luz incidida (tipo, dosagem de potência e tempo de iluminação) dependem da droga que está sendo aplicada, da espécie e da gravidade da doença (SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Contudo como esses compostos costumam se localizar por mais tempo nos tumores, pele, fígado e baço, durante o tratamento recomenda-se que o paciente seja protegido da luz para que não tenha fotossensibilidade (irritações na pele semelhante às porfirias), originadas da excitação da substância.

Apesar de apresentar os inconvenientes de fotossensibilização do paciente caso este seja exposto à luz e exigir o resguardo da mesma, a TFD é uma técnica de combate ao câncer muito menos agressiva que as convencionais (quimioterapia e radioterapia), apresentando um número reduzido de efeitos colaterais e tendo a vantagem de necessitar de radiação com comprimento de onda não agressivo, ao contrário da radioterapia, que se utiliza de raios X. O fato da terapia ser localizada também evita que regiões sadias do corpo sejam atingidas e debilitadas.

As drogas usadas na TFD devem apresentar algumas características essenciais:

- Possuir características fotofísicas favoráveis;
- Ser seletivo em relação aos tecidos doentes;

- Apresentar alta absorção de luz na região do espectro entre 600 a 800 nm, onde a luz apresenta maior penetração nos tecidos e onde os tecidos são relativamente transparentes;
- Ter alto rendimento quântico de estado triplete;
- Ter alto rendimento quântico de geração de oxigênio singlete;
- Ter baixa toxicidade no escuro;
- Fotossensibilidade não prolongada;
- Apresentar farmacocinética favorável (rápida eliminação);
- Ter baixo rendimento de reação de foto-branqueamento;
- Apresentar simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade de formulação (tempo mínimo de 2 anos), bem como, seja passível de obtenção em escala industrial e de preferência com baixo custo; (SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; TESSARO, 2005).

1.4 Porfirinas

Porfirina é o nome dado à grande classe de compostos intensamente coloridos vermelhos ou púrpuros, pigmentos cristalinos fluorescentes, de origem natural ou sintética. As porfirinas são substâncias precursoras do grupo heme, que estão presentes na hemoglobina e em outras proteínas, desempenhando funções vitais nesses sistemas bioquímicos, como o transporte de elétrons na cadeia respiratória e o transporte de oxigênio (LEHNINGER, 2000; NELSON; COX, 2002; SETÚBAL, 2007; WHITE, 1968).

A estrutura básica das porfirinas (Figura 6) é formada por quatro anéis pirrólicos conectados por pontes de metileno numa configuração cíclica, sendo que

uma variedade de cadeias laterais podem encontrar-se ligadas nas posições α , β , γ , δ , diferenciando-as.

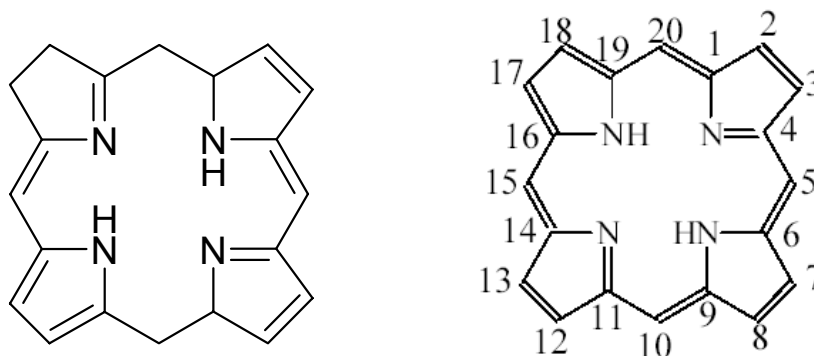


Figura 6 - Estrutura básica das porfirinas

Os quatro anéis pirrólicos são numerados empregando-se algarismos romanos de I a IV e os quatro carbonos das metinas, denominadas também como posição *meso*, são identificadas pelas letras gregas α , β , γ , δ respectivamente 5, 10, 15 e 20 (DAL SANTOS, 1999; NELSON; COX, 2002).

As porfirinas possuem um sistema eletrônico altamente conjugado, com 22 elétrons π , mas apenas 18 deles sofrem deslocalização, segundo a regra de Hückel ($[4n + 2] \pi$; sendo $n = 4$). O número de elétrons π , diferencia as porfirinas das clorinas e bacterioclorinas, (Figura 7) sendo que estas possuem 20 e 18 elétrons respectivamente (DAL SANTOS, 1999; RIBEIRO, 2005).

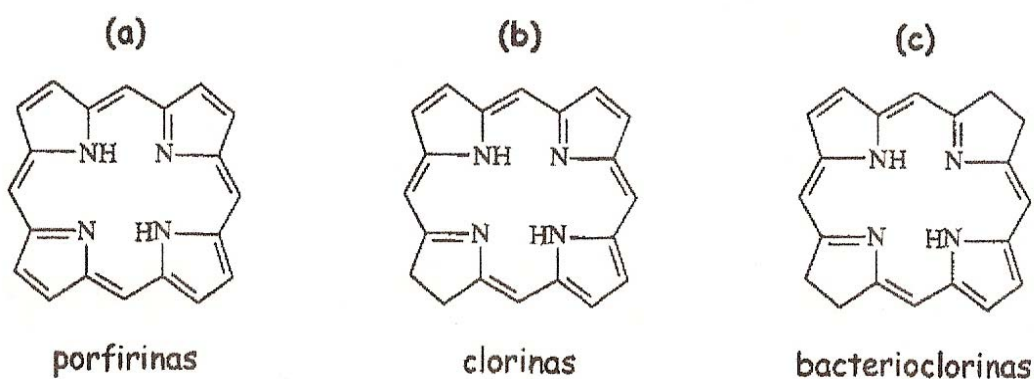


Figura 7 - Estrutura básica de (a) porfirinas, (b) clorinas e (c) bacterioclorinas (RIBEIRO, 2005)

Quando se encontra na forma de base livre o macrociclo porfirínico possui dois átomos de nitrogênio capazes de aceitar prótons e dois grupos NH capazes de perder prótons. A protonação da porfirina pode ser promovida em meio fortemente ácido e, como consequência, há uma alteração significativa das suas propriedades espectroscópicas. Essas porfirinas possuem um espectro com uma banda extremamente intensa, ($\epsilon = 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) na região de 400 nm (banda Soret), e mais quatro bandas no visível na região de 500 a 700 nm (bandas Q). As cinco bandas têm origem na transição $\pi \rightarrow \pi^*$ (HALMA, 2004; SOARES, 2005; TOMINAGA, 1997).

Porfirinas substituídas com grupos fenila nas posições *meso* do anel, representam a classe das porfirinas de 1ª geração, também denominadas de *meso* substituídas (Figura 8). As porfirinas de primeira geração incluem as *meso-tetrakis*-fenilporfirinas. Tais porfirinas não apresentam grupos volumosos que levem a impedimento estérico para a formação de dímeros. Além disso, não há a proteção contra destruição oxidativa (auto-oxidação) do macrociclo da porfirina.

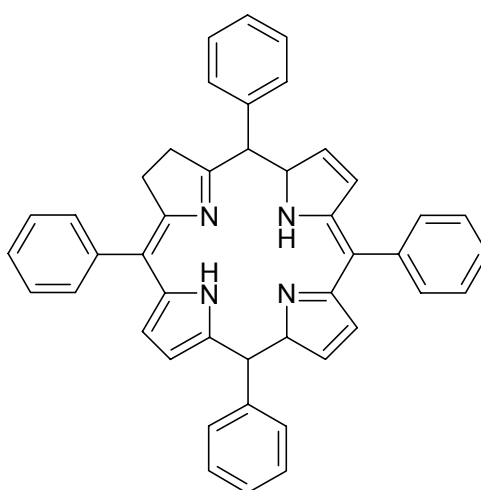


Figura 8 - Estrutura de porfirina de primeira geração

As porfirinas de segunda geração são as que possuem grupos fenil substituídos nas posições *meso*, com halogênios ou outros substituintes elétrôn-

retiradores (Figura 9). Essas porfirinas apresentam uma melhor ativação do anel, uma vez que os halogênios atuam como retiradores de densidade eletrônica do anel da porfirina.

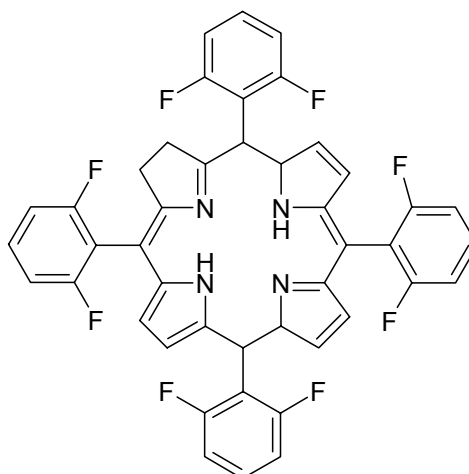


Figura 9 – Estrutura de porfirina de segunda geração

As porfirinas de terceira geração correspondem àquelas que apresentam halogênios (ou outro tipo de substituintes volumosos) nas posições β do macrociclo da porfirina (Figura 10). A presença de grupos volumosos nestas posições confere a estas porfirinas maior proteção à destruição oxidativa e impede ou minimiza a formação de espécies diméricas (HALMA, 2004; SETÚBAL, 2007). As porfirinas podem ainda ser carregadas positiva (catiônicas) ou negativamente (aniônicas) de acordo com as cargas presentes nos substituintes situados no anel porfirínico.

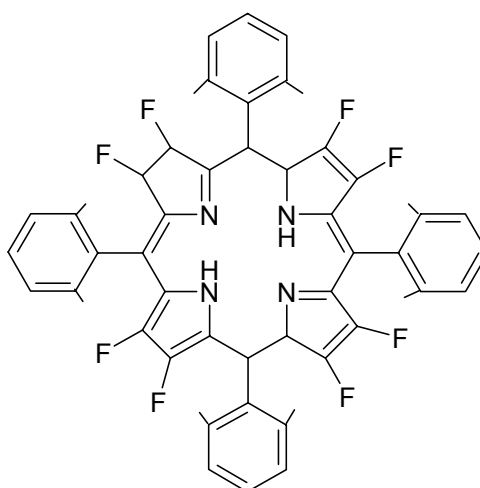


Figura 10 – Estrutura de porfirina de terceira geração

1.5 Metaloporfirinas

Quando há remoção dos prótons do nitrogênio dos anéis II e IV e coordenação de diferentes íons de metais com os quatro átomos de nitrogênio dá-se origem a uma grande variedade de metaloporfirinas. O macrociclo da porfirina é capaz de coordenar metais de transição em diversos estados de oxidação devido principalmente às dimensões internas da cavidade do macrociclo, cerca de 70 pm.

Durante o processo de metalação, ocorre uma mudança significativa na simetria do anel da porfirina. O tamanho do cátion influencia a conformação do anel e, conseqüentemente a estabilidade da porfirina. Este tipo de modificação do anel porfirínico leva a alterações do comportamento da porfirina a níveis eletrônicos e estéricos, alterações essas que por sua vez, são fortemente dependentes do próprio metal introduzido (HALMA, 2005; PEREIRA, 2004; SETÚBAL, 2007). Em nível estrutural, a porfirina metalada perde a planaridade e passa a ter uma conformação em forma de cela ou cesta, em onda ou em cúpula (PEREIRA, 2004).

Estes compostos apresentam atividade catalítica atuando em reações de oxidação e redução. O macrociclo altamente conjugado da porfirina, bem como, muitos dos seus derivados metálicos estão presentes em diversas proteínas (HALMA, 2005; SETÚBAL, 2007). Como exemplo tem-se:

- Os grupos heme da hemoglobina e da mioglobina, pigmentos com função de transportar e armazenar oxigênio respectivamente - em que há um átomo de ferro no centro do anel porfirínico (Figura 11);
- Clorofila, com a qual as plantas captam energia solar para síntese de carboidratos e outros compostos, e possui um anel porfirínico coordenado ao íon magnésio;
- Vitamina B12 ou cobalamina: vitamina presente em alimentos de origem animal e que atua em sistemas enzimáticos de transferência de certos grupos entre

moléculas, e apresenta um íon cobalto em sua estrutura (LENINGER, 2000; NELSON; COX, 2002).

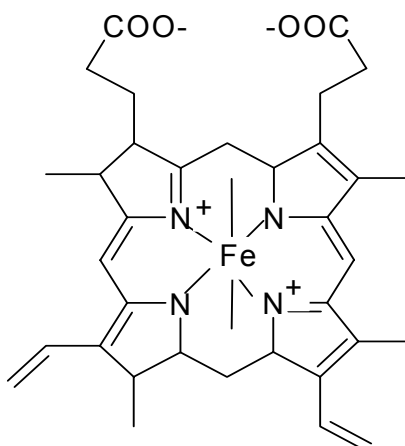


Figura 11 - Grupo heme presente na hemoglobina e na mioglobina (NELSON; COX, 2002)

Na figura 12, encontram-se sublinhados na tabela periódica todos os metais que podem ser coordenados ao anel porfirínico.

3	4											5	6	7	8		
Li	Be											B	C	N	O		
11	12											13	14	15	16		
Na	Mg											Al	Si	P	S		
19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34		
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se		
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52		
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te		
55	56	*	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	
Cs	Ba		Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	
87	88	**	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	
Fr	Ra		Lr	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Uub	Uut	Uuq	Uup	Uuh	
*Lantanídeos			*	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
				La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb
**Actinídeos			**	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
				Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No

Figura 12 - Tabela periódica com os metais que podem constituir as metaloporfirinas (MERCK, 2008)

As metaloporfirinas apresentam um espectro com bandas diferenciadas das porfirinas base livre visto que a inserção de íons metálicos pouco eletronegativos

resulta em deslocamentos batocrômicos da banda Soret (Figura 13 a). As bandas Q das metaloporfirinas são reduzidas a duas (Figura 13 b) sendo que com a metalação duas delas tornam-se proibidas e deixam de ser observadas (HALMA, 2005; SOARES, 2005).

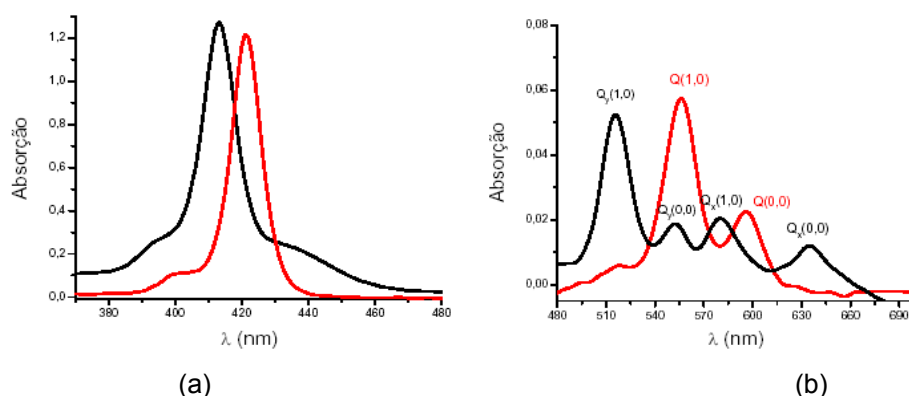


Figura 13 – Espectro de absorção de porfirinas na forma de base livre (—) e na forma metalada (—), (a) banda Soret (b) bandas Q (SOARES, 2005)

As metaloporfirinas desempenham importantes papéis como catalisadores em sistemas biológicos. O citocromo P- 450, metaboliza diferentes substratos e processa materiais xenobióticos gerando metabólitos hidroxilados, que são mais facilmente excretados, assim surgiu o interesse em estudar esses compostos como catalisadores em reações (HALMA, 2005).

Nas reações de catálise utilizando metaloporfirinas, a formação do complexo metálico de alta valência, o qual supostamente é responsável pela atividade catalítica, se dá através da reação de metaloporfirinas com um doador de oxigênio. Esta reação depende da natureza do oxidante, bem como da estrutura da metaloporfirina. Os compostos porfirínicos principalmente de manganês (II) e (III) e ferro (III) são estudados como catalisadores para oxidação de substratos orgânicos, bem como em reações eletroquímicas. Tanto sistemas homogêneos (reagentes e catalisador contidos na mesma fase) e heterogêneos (catalisador e reagentes em fases distintas) têm sido estudados (HALMA et al., 2008; HALMA, 2005).

Certas porfirinas têm-se apresentado altamente ativas como catalisadores para hidroxilação de alcanos na presença de diferentes doadores de oxigênio. Observa-se freqüentemente que a catálise homogênea utilizando ferroporfirinas de primeira geração, podem apresentar algumas desvantagens como a destruição do catalisador, causada por ataques de espécies oxidantes às posições *meso* do anel porfirínico num processo muitas vezes denominado de auto-oxidação. Além disso, a dimerização da porfirina pode dificultar os processos catalíticos pela formação de espécies diferentes daquelas esperadas como catalíticas ativas (HALMA, 2005).

No entanto, as metaloporfirinas podem ser usadas em solução homogênea ou imobilizadas em matrizes sólidas, tais como, polímeros orgânicos amorfos ou materiais inorgânicos cristalinos a exemplo da sílica e, crisólita e zeólita. O suporte inorgânico confere seletividade para a metaloporfirina promovendo assim um ambiente especial para a reação entre o substrato e a espécie cataliticamente ativa, o que não acontece em meio homogêneo (HALMA et al., 2008)

A imobilização de metaloporfirinas em matrizes sólidas confere algumas vantagens ao processo catalítico, porque impede a agregação das metaloporfirinas e a sua auto-destruição, evitando a desativação do catalisador, além de facilitar sua recuperação do meio reacional e posterior reutilização, o que minimiza impactos ambientais. A forma como a metaloporfirina está ligada ao suporte é extremamente importante, porque diferentes modos de vinculação com a matriz podem levar a diferentes seletividades nas reações de oxidação, inclusive à regioseletividade (HALMA et al., 2008; MACHADO et al., 2008).

A atividade catalítica das porfirinas metaladas para promover oxidações de alcanos sob condições brandas, tem sido alvo de muitos estudos. Sabe-se que há uma grande quantidade de hidrocarbonetos, em especial de alcanos, presentes nas

reservas de gás natural e petróleo, contudo, a grande estabilidade das ligações C-H e C-C, fazendo com que se torne um obstáculo para seu aproveitamento. Há uma grande dificuldade em encontrar reagentes capazes de quebrar estas ligações de maneira seletiva e em condições brandas (BEGA, 2008; HALMA et al., 2008; MACHADO et al., 2008).

A oxidação de alcanos por porfirinas ocorre a partir da formação de espécies metal-oxo, onde o metal adquire alta oxidação. Esta espécie retira um átomo de hidrogênio do hidrocarboneto, gerando um radical. Este radical irá retirar a hidroxila ligada ao centro metálico, provocando uma redução do metal. Além de alcanos, as porfirinas podem oxidar também olefinas, através de dois mecanismos: 1) oxidação alílica; e 2) adição a dupla ligação, podendo levar a uma epoxidação. Sendo este último mecanismo de grande interesse, visto que a síntese de epóxidos está envolvida na síntese industrial de muitos produtos, como os inseticidas, detergentes e solventes (BEGA, 2008).

1.6 Porphirinas como agentes da TFD

As porfirinas se tornaram drogas com alto potencial de utilização na TFD já que são cromóforos fotossensíveis aos comprimentos de onda a faixa de 630 nm (bandas Q), com alto rendimento quântico do estado triplete e bons geradores de oxigênio no estado singlete (PERUSSI, 2007; TOMINAGA et al., 2004).

Os derivados porfirínicos exibem alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (LDL) as quais são encontrados em altas concentrações em tecidos neoplásicos, em comparação com os tecidos saudáveis. Sendo assim, na tentativa de explicar o acúmulo preferencial dessas substâncias no tecido doente, sugere-se que esses compostos porfirínicos são encaminhados aos tecidos doentes junto às

lipoproteínas acumulando-se nessas células e possibilitando uma ação localizada da TFD (MACHADO, 2000; SIMPLÍCIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; TESSARO, 2005; TOMINAGA et al., 2004).

Outro fator que pode contribuir para a maior retenção das porfirinas no tecido doente são os baixos valores de pH do fluido intersticial do tecido doente. O pH de tecidos tumorais é freqüentemente menor que o de tecidos normais, devido a grande produção de ácido láctico ocasionada pela microvasculatura alterada e o fluxo de sangue reduzido nesse tecido. Assim, enquanto o pH em tecidos normais está entre 7,2 e 7,4; o pH de tecidos doentes varia entre 6,0 e 7,0. Com o aumento da acidez, a ionização de espécies de porfirina com valores de pK_a levemente ácidos é afetada, elas se tornam mais hidrossolúveis podendo assim, ser retidas de forma seletiva (LEHNINGER, 2000; MENEZES, 2006).

Contudo, as porfirinas possuem uma alta hidrofobicidade, sobretudo na forma desmetalada. Essa propriedade faz com que haja grande tendência a esses compostos se auto-agregarem em solução aquosa (SOARES, 2006). Com isso diminui drasticamente a capacidade dessas substâncias em gerar oxigênio singlete, espécie essencial para o sucesso da terapia pelo mecanismo tipo II.

As porfirinas podem ainda sofrer reações de foto-branqueamento, que refere-se à capacidade de a substância cromófora sofrer reações químicas induzidas pela luz, transformando-se em espécies com outras características fotofísicas e menos interessantes a TFD. Outra desvantagem que acompanha os compostos porfirínicos são seus elevados custos, o que dificulta sua utilização. Dessa forma no intuito de romper essas barreiras, tem-se buscado rotas sintéticas economicamente mais viáveis que as já existentes, assim como, estudar os efeitos que controlam a auto-agregação, na intenção de evitá-la.

1.7 Fatores que interferem na eficiência do fotossensibilizador

1.7.1 Auto - agregação de compostos porfirínicos

Os FS são compostos sólidos, no entanto, é necessário um meio líquido para injeção ou uma emulsão para aplicação tópica. Ao serem introduzidos em um meio incompatível com sua polaridade, as moléculas de FS tendem a sofrer agregação (MUSSI, 2003).

As porfirinas são conhecidas por sofrer diferentes tipos de agregação, mesmo a concentrações inferiores a 10^{-6} mol/L, que dependem normalmente de fatores (a) intrínsecos, como a presença ou não de átomos metálicos centrais; da coordenação; da natureza de seus substituintes ou ainda da posição no anel onde ocorre a substituição (nas posições *meso* ou nos anéis pirrólicos), (b) de fatores extrínsecos motivados, por exemplo, por baixas solubilidades no solvente utilizado, por diferentes pH ou força iônica da solução, ou mesmo pela própria natureza do solvente (PEREIRA, 2004).

Os mecanismos que regem o fenômeno de auto-agregação de porfirinas ainda não estão totalmente estabelecidos. Entretanto, é conhecido que forças de natureza eletrostática, forças de van der Waals, efeito hidrofóbico, etc. contribuem para a formação desses agregados (HUNTER; SANDERS, 1990). A natureza dos substituintes das porfirinas, força iônica, temperatura, pH e presença de surfactantes também podem influenciar na formação de auto-agregados (GANDINI, 2001).

A auto-agregação de porfirinas gera espécies pequenas (dímeros e trímeros) e/ou agregados grandes (poliméricos). Este estado afeta fortemente suas propriedades espectrais e energéticas, reduzindo o tempo de vida dos estados excitados, conseqüentemente o rendimento quântico de formação de oxigênio

singlete e, portanto, comprometendo a eficácia em TFD (BORISSEVITCH; GANDINI, 1998; MUSSI, 2003).

A auto-associação dessas moléculas pode ser ocasionada por diferentes razões, entre as quais se destaca a interação do FS com o solvente (auto-agregação em solução aquosa), bem como a interação da porfirina com estruturas biológicas (MENEZES, 2006). É de salientar também que muitos dos agregados observados derivam da formação prévia de formas protonadas das porfirinas. De fato, a repulsão resultante da forte densidade eletrônica do anel central é fortemente atenuada se for colocada carga positiva no centro desse mesmo anel que, assim, favorece a aproximação entre os monômeros ao aumentar a atração eletrostática entre partes da molécula com diferentes cargas efetivas (PEREIRA, 2004).

Uma das principais maneiras de aferir a presença de espécies agregadas numa amostra de porfirina passa pela análise espectroscópica das amostras, através de testes de conformidade à lei de Beer - Lambert. Desvios negativos a esta lei evidenciam uma provável presença de agregados. Os seus espectros de absorção também evidenciam diferenças, principalmente do comprimento de onda dos máximos de absorção, bem como, do próprio coeficiente de absorvidade molar (PEREIRA, 2004).

As propriedades espectrais típicas intrínsecas dos agregados dos FS com respeito aos monômeros são: deslocamento e alargamento da banda Soret e da última banda Q para o vermelho no caso de formação de agregado J e deslocamento em torno de 10 nm da banda Soret e das bandas Q para o azul no caso de agregado H (Figura 14); tempo relativamente curto do estado singlete (S_1); baixo rendimento quântico de fluorescência e também uma insignificante geração de oxigênio singlete (MENEZES, 2006; PEREIRA, 2004).

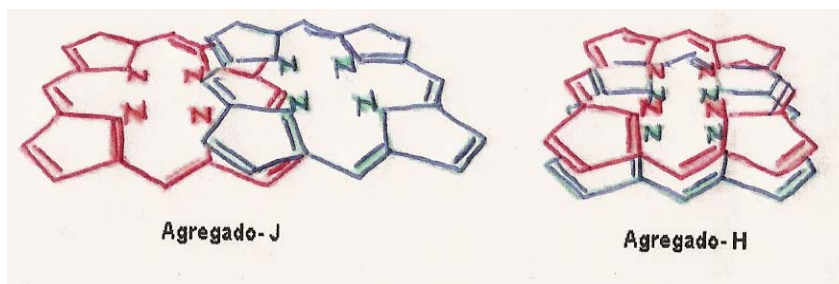


Figura 14 – Agregados do tipo J e H (MENEZES, 2006)

A agregação pode ainda, levar a precipitação do fármaco com perda de material, ou mesmo obstrução de artérias no corpo humano (AVELINE, et al., 1995). Desta forma, a auto-agregação de fármacos deve ser evitada para aplicação em TFD, ou seja, desde as etapas de processamento industrial, aplicação clínica, circulação corpórea, até o momento da iluminação, o fármaco deve ser mantido no estado monomérico (SOARES, 2006; TESSARO, 2006).

Algumas modificações podem ser promovidas no anel porfirínico a fim de evitar esse fato indesejado, tais como, promover a inclusão de substituintes periféricos carregados que, em virtude da repulsão eletrostática, impedem ou minimizam a tendência de agregação ou ainda a inserção de íons metálicos hexavalentes, já que, nesse caso, há um impedimento estérico que impossibilita a formação de dímeros (MACHADO, 2000). A agregação também pode ser evitada através da adição de pequenas concentrações de solventes orgânicos, detergentes, proteínas do sangue ou a incorporação do FS em micelas (MUSSI, 2003).

A literatura mostra que a hematoporfirina (Hp) e alguns de seus derivados em solução são encontrados em forma de misturas de monômeros, dímeros, e oligômeros em solução aquosa e que são os maiores responsáveis pelo efeito fotodinâmico, uma vez que são os melhores localizadores tumorais. Sendo assim, as espécies agregadas dos derivados de Hp são conhecidos por serem essenciais para o tratamento do tumor ao contrário das espécies monoméricas. Deste modo, pode-

se dizer que deve existir um equilíbrio da proporção monômero/agregado na solução do FS a tal ponto que não interfira nos processos de distribuição da droga e, conseqüentemente, não comprometa a atividade anti-tumoral (MENEZES, 2006).

O conhecimento sobre a relação entre a agregação e a atividade fotodinâmica pode facilitar o desenvolvimento de drogas e poderá contribuir significativamente para aumentar a eficiência em TFD. Uma vez que os agregados moleculares podem ser diferenciados de suas formas monoméricas por suas características espectroscópicas, os métodos espectroscópicos são os mais adequados para sua investigação (MENEZES, 2006).

1.7.2 Localização do fotossensibilizador no tecido doente

A membrana plasmática ou membrana celular consiste numa estrutura lipoprotéica, semipermeável e que funciona como uma barreira à entrada e saída de substâncias (LEHNINGER, 2000). Funciona como um elemento mediador da comunicação entre a célula e o meio externo e possui uma variedade de transportadores, proteínas que atravessam a espessura da membrana e transportam nutrientes para dentro e produtos residuais para fora da célula. Possuem ainda proteínas de superfície de membrana - receptores de sinais - que apresentam sítios altamente específicos, constituindo assim um sistema complexo (LEHNINGER, 2000; MARZZOCO; TORRES, 1999)

Os modelos biomiméticos ou biofísicos consistem em modelos simples que simulam as membranas celulares. Através desses modelos é possível simular a estrutura lipídica básica das membranas e analisar a interação dos fármacos com essas estruturas, isto permite prever a capacidade de penetração que a substância

apresenta em relação a membrana, fator essencial para sua ação como agente terapêutico.

Para obtenção desses modelos biomiméticos utiliza-se freqüentemente surfactantes na forma de micelas, os quais permitem um estudo inicial de um grande número de fenômenos que ocorrem nas membranas (BORGES, 1994; MOREIRA, 2005; TOMINAGA et al., 2004). Os surfactantes são compostos por monômeros de moléculas anfóteras que se organizam em micelas, com a parte polar voltada para o meio externo e a parte apolar organizada internamente (Figura 15 a), e fornecem boa semelhança com a bicamada lipídica, constituinte da membrana celular (Figura 16 b).

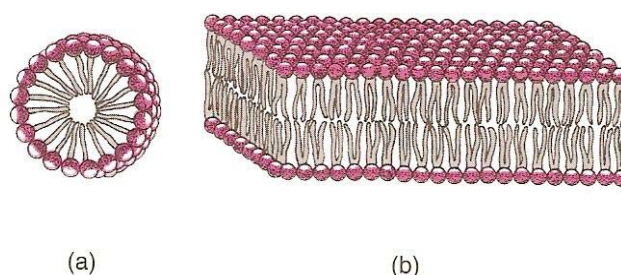


Figura 15 - Estrutura da: (a) micela; (b) bicamada lipídica (MARZZOCO; TORRES, 1999)

As micelas são definidas como agregados coloidais, estáveis termodinamicamente, espontaneamente formados quando se atinge uma determinada concentração de anfifílico em solução (concentração micelar crítica – cmc). A cmc é um parâmetro característico de cada tipo de surfactante e define o balanço de interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Geralmente anfifílicos com longas cadeias de hidrocarbonetos possuem uma cmc baixa (da ordem de mmol/L).

É muito importante saber se a solução de FS preparada está acima ou abaixo da cmc. A formação de micelas em solução aquosa depende da presença de forças de repulsão entre as cabeças polares anfifílicas dos surfactantes que podem

ser neutros, catiônicos, zwitteriônicos ou aniônicos, e da associação entre as caudas hidrofóbicas, bem como do seu tamanho, que são responsáveis pela formação das micelas e da cmc (MENEZES, 2006).

Um fator que deve ser levado em consideração quando se estuda a interação de um fármaco com membranas celulares é o pH, uma vez que, em organismos vivos pode existir variação de pH de acordo com as regiões corpóreas. Embora o pH fisiológico esteja na faixa de 7,2 a 7,4, alguns meios intra ou extracelulares têm variações micro-locais e a intensa atividade neo-vascular, característica comum em tecidos neoplásicos, aparentemente proporciona aumento de acidez em regiões micro-localizadas (TESSARO, 2005). Sendo assim, o estudo da influência da variação de pH do meio sobre os agentes fotossensibilizadores passa a ter grande importância.

Os derivados porfirínicos apresentam como grupamento ácido-base os nitrogênios dos anéis pirrólicos e, eventualmente grupos periféricos ligados à estrutura porfirínica. O fator pH determina a estrutura da espécie presente afetando as propriedades de absorção de luz, rendimento quântico, geração de oxigênio singlete, foto-branqueamento, facilidades na formulação, solubilização, lipofilicidade, afinidade celular, tempo de retenção, biodistribuição, etc.

1.7.3 Reações de foto-branqueamento

Outra característica importante de um bom FS é que o mesmo não sofra foto-degradação durante o tratamento clínico. O processo denominado foto-branqueamento em substâncias cromóforas corresponde a reações químicas induzidas pela luz, onde as moléculas são transformadas em outros compostos e podem ocorrer *in vitro*, *in vivo*, nos fluidos celulares, células e tecidos. A ocorrência

desse processo resulta na diminuição de absorção e intensidade de fluorescência do FS. O foto-branqueamento mais comum em TFD pode ocorrer por processo de foto-oxidação ou foto-redução, sendo o primeiro o mais comum (MENEZES, 2006). Existem dois tipos irreversíveis de foto-degradação que levam a mudanças fotoquímicas em cromóforos:

I – Foto-modificação: quando a diminuição na intensidade de absorção e emissão de fluorescência ocorre em alguns comprimentos de onda, mas o cromóforo é retido em uma forma modificada (Equação 1). Ocorre também a diminuição da intensidade dos picos de absorção e o surgimento de uma nova banda de absorção.



Em caso de algumas porfirinas ocorre a formação de fotoprodutos com absorção no vermelho.

II – Fotoclareamento verdadeiro: quando as mudanças químicas são profundas e resulta em fragmentos pequenos que não tem mais uma absorção apreciável na região do visível (Equação 2). A amostra torna-se incolor.



Ambos os processos acarretam no decréscimo da concentração do FS original no sítio de ação da TFD e menor poder de absorção de luz do cromóforo modificado, no comprimento de onda da fonte utilizada. Isso implica em menor quantidade de princípios ativos excitados, o que diminui a ação fotodinâmica. Em consequência tem-se menor formação de espécies citotóxicas, ou seja, compromete a eficácia do tratamento (SILVA, 2003; STERNBERG; DOLPHIN, 1998).

Por comprometer a formação de espécies reativas capazes de matar o tecido alvo, o foto-branqueamento implica na necessidade de administração de doses elevadas do FS para compensar a perda ocasionada no processo de foto-degradação. Mas, se a velocidade deste foto-branqueamento for lenta, e não prejudicar o tratamento, ele passa a ser interessante, uma vez que serve para eliminar o FS após a terapia. Isto é importante, já que diminui o tempo em que o paciente tem que ficar ao abrigo da luz solar para evitar fotossensibilidade da pele. Deste modo a foto-degradação dos fotossensibilizadores é o elo fundamental da distribuição da dose fotodinâmica dos fluidos biológicos, estando relacionada com a cinética de eliminação do FS do organismo (MENEZES, 2006; RIBEIRO, 2005).

O oxigênio singlete, por ser uma espécie extremamente reativa, pode por si levar a degradação dos compostos fotossensibilizadores (os seus próprios precursores), caracterizando um tipo especial de foto-branqueamento. Em resumo ao receber a luz, o fármaco gera $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete) que por sua vez pode reagir com as moléculas do substrato que o produziu, ocasionando nestas, modificações químicas, como mostra a figura 16 (a) e descreve-se na figura 16 (b).

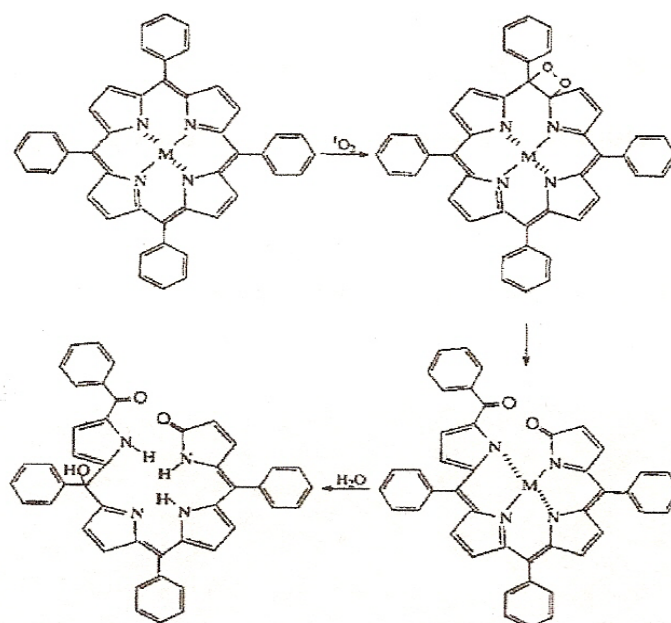


Figura 16 (a) – Foto-branqueamento de um composto porfirínico na presença de oxigênio singlete (RIBEIRO, 2005)

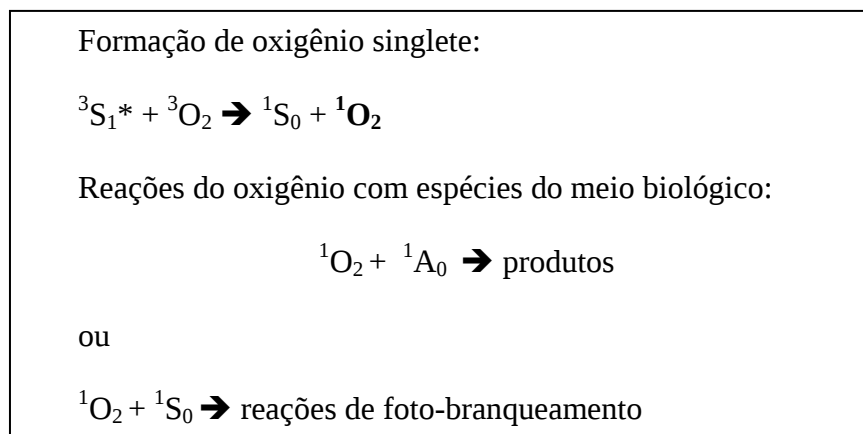


Figura 16 (b): Reações do oxigênio singlete no meio biológico. Reações com moléculas do próprio fotossensibilizador caracterizam uma via de reação de foto-branqueamento (SOARES, 2006)

Quanto a foto estabilidade, os FSs comportam-se diferentemente um do outro em relação a foto-degradação, apresentando-se estáveis ou instáveis frente a iluminação. Uma forma de tentar corrigir a foto-degradação é a diminuição da dose de luz, seguida por múltiplas sessões de irradiação (MENEZES, 2006).

1.7.4 Geração de oxigênio singlete

Uma vez que a TFD consiste na associação de um FS com luz visível para geração de espécies reativas capazes de matar o tecido alvo e tendo-se em vista que o principal mecanismo de ação dessa terapia se utiliza da geração de oxigênio singlete, então entende-se a geração dessa espécie como sendo determinante para o sucesso da técnica.

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com *spins* paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia, chamados de degenerados, caracterizando, portanto, um estado triplete (3O_2). Conseqüentemente, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do *spin*. Uma forma mais reativa do oxigênio, conhecida como oxigênio singlete,

pode ser gerada por um acréscimo de energia. Nela, a restrição da regra de conservação do spin é removida (RONSEIN et al, 2006).

Sendo assim, o oxigênio singlete é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental. Existem dois estados singlete do oxigênio: o primeiro estado excitado, $^1\text{O}_2$, tem dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, possui uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental e tempo de meia vida em solvente aquoso de aproximadamente 10^{-6} s; o segundo estado excitado, $^1\text{O}_2^*$ tem um elétron em cada orbital π degenerado, com spins opostos, e possui uma energia de 37,5 kcal acima do estado fundamental. O estado $^1\text{O}_2^*$ tem um tempo de vida muito curto (10^{-11} s) em meio aquoso, sendo rapidamente desativado para o estado $^1\text{O}_2$ (Tabela 2). Portanto, apenas o primeiro estado apresenta interesse em sistemas biológicos e será denotado por $^1\text{O}_2$ (RONSEIN et al, 2006).

Tabela 2 – Distribuição eletrônica dos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado singlete ($^1\text{O}_2^*$ e $^1\text{O}_2$) e estado fundamental triplete ($^3\text{O}_2$)

Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal/mol)	Tempo de vida (s)
$^1\text{O}_2^*$	$\uparrow \downarrow$	37,5	10^{-11}
$^1\text{O}_2$	$\uparrow\downarrow$	22,5	10^{-6}
$^3\text{O}_2$	$\uparrow \uparrow$	-----	-----

A ação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na morte ou inviabilização de células tumorais tem sido evidenciada de diversas maneiras (MACHADO, 2000). Para avaliar os possíveis danos a biomoléculas, causadas pelo $^1\text{O}_2$ e por moléculas por ele oxidadas, faz-se necessária à utilização de ferramentas analíticas, tais como seqüestradores químicos do $^1\text{O}_2$. Seqüestradores químicos são moléculas que reagem com o $^1\text{O}_2$ gerado e o produto pode ser identificado (RONSEIN et al., 2006)

Para mensurar a capacidade de geração de oxigênio singlete utiliza-se freqüentemente o teste do ácido úrico. O ácido úrico (AU) é um conhecido acceptor eficiente de oxigênio singlete, tem sido usado como reagente para determinação química quantitativa da ação fotodinâmica de compostos fotossensibilizadores em TFD nos casos em que a produção de oxigênio singlete esta associada ao processo fotodinâmico (MAESTRIN et al., 2004).

1.8 Testes de toxicidade

A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes. Seus ovos são comumente comercializados em lojas para aquaristas e não apresentam custo elevado, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco (BARBOSA et al.; 2006; SIQUEIRA et al., 1998). Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio com *A. salina*, sobretudo a partir da década de 90 (LHULLIER et al., 2006). O ensaio foi proposto inicialmente por Michael, Thompson e Abramovitz, e posteriormente desenvolvido por Vanhaecke. A metodologia admite variações, segundo Solis e colaboradores (1993) e permite também a triagem de novos fármacos (LHULLIER et al., 2006).

Os testes com *Artemia salina* são amplamente utilizados para extratos de plantas, para detectar compostos bioativos nesses extratos (RUIZ et.al., 2005), mas, recentemente, tem sido utilizado também com testes de substâncias sintéticas. O teste da *Artemia salina* pode ser utilizado ainda como avaliação prévia de toxicidade, sendo a substância posteriormente testada em diferentes culturas de células tumorais, com boa aproximação de resultados (LHULLIER et al., 2006; SIQUEIRA et al., 1998). Assim, o teste da *Artemia salina* (TAS) pode ser conveniente para estimar o potencial de uma determinada substância em ser utilizada em TFD.

Uma substância é considerada citotóxica quando a DL_{50} (dose letal mediana) ou CL 50 (citotoxicidade basal) < 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) (MEYER, 1982). A citotoxicidade basal pode ser definida como os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo. A citotoxicidade basal é expressa como concentração que inibe 50% das células ou organismos, quando comparadas com o controle não tratado (VALADARES, 2006).

Avaliar a toxicidade de fotossensibilizadores em microrganismos pode passar uma idéia prévia da sua ação em células doentes. Especialmente, o teste de toxicidade sobre bactérias se faz interessante, porque oportuniza avaliar a capacidade de inativação desses microrganismos sobre os quais os antibióticos – medicamentos mais comumente empregados no seu combate – já não mais se mostram suficientemente eficazes. Também viabiliza o estudo da TFD não somente para tratamento do câncer, abrindo um leque de possibilidades de aplicação dessa técnica, como já vem sendo reportado em muitos trabalhos que focam essa modalidade de tratamento.

Testes *in vitro* com cultura de microrganismos, tais como bactérias e leveduras, podem também ser um excelente modelo para mimetizar células tumorais. Bactérias são microrganismos resistentes que possuem alta velocidade de reprodução, identificando-se e relacionando-se com células doentes (ex: tecidos em metástase) que se reproduzem mais rapidamente que células normais. Quando determinadas substâncias apresentam atividade frente a esses microrganismos, acredita-se que as mesmas interferem na síntese protéica (principalmente DNA e RNA), inviabilizando a reprodução celular, fato que poderia ser repetido com células tumorais. Intuitivamente, pode-se concluir que a *Escherichia coli*, bactéria que se

desenvolve em ambientes internos ao corpo humano, é um bom modelo para enfermidades em órgãos internos, enquanto que a *Staphilococcus aureus*, que se desenvolve em superfícies corpóreas, acaba sendo um bom modelo para doenças de pele (SOARES, 2006).

A *E. coli*, é uma espécie da família *Enterobacteriaceae* extremamente heterogênea e complexa. Pode-se distinguir dois grandes grupos de amostras: uma que habita nossos intestinos desde o nascimento e outro que causa diferentes tipos de infecções. O primeiro é chamado de *E. coli* comensal e o outro de *E. coli* patogênica. A *E. coli* comensal só causa infecções em imunodepressivos ou quando encontra situações não fisiológicas como o uso de cateteres implantados nas vias urinárias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Há categorias de *E. coli*, designadas pelas siglas EPEC; EHEC; EAEC; ETEC e EIEC que são diarreiogênicas, sendo capazes de causar uma lesão histopatológica no epitélio do intestino denominada lesão A/E (*attaching and effacing*), a qual ocorre depois que a bactéria atravessa a barreira gástrica e adere à mucosa do intestino delgado e grosso, determinando alterações que levam a diarreia. Há ainda categorias de *E. coli* que causam infecções extraintestinais, como infecções no trato urinário, meningite neonatal ou infecções intraperitoneal – em qualquer tecido do corpo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

As bactérias podem ser classificadas como Gram-negativas ou Gram-positivas de acordo com seu comportamento frente ao corante de Gram, sob o qual as Gram negativas mostram-se em rosa no microscópio e as Gram-positivas mostram-se violeta púrpura (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Além desse fator, as paredes de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam diferenças marcantes. As Gram-negativas apresentam parede celular composta de várias

camadas que diferem na composição química e são mais complexas que as das bactérias Gram-positivas, que apesar de ter a parede celular mais espessa, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

A parede celular das bactérias Gram-negativas possui duas membranas, uma citoplasmática e uma membrana externa complexa (ZANCANELA et al., 2007). A camada interna é formada por fosfolipídeos enquanto a mais externa é composta predominantemente por lipopolissacarídeos e proteínas. A membrana externa constitui uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias como antibióticos e metais pesados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005), o que as tornam ainda mais difíceis de serem combatidas.

O mecanismo de morte fotodinâmica das bactérias Gram-positivas induzida por deuteroporfirina (Dp), mostrou perturbação da síntese do RNA e DNA levando a morte da célula. No entanto, a inativação fotodinâmica da bactéria *Escherichia coli* e *Pseudomonas auroginosa*, falhou quando foi usada a porfirina natural aniônica, tendo dano fotoinduzido apenas na presença de espécies que estimulam a translocação de porfirinas através da membrana da bactéria. Isso mostra que a complexidade das espécies Gram-negativas previne a ação intracelular de porfirinas hidrofóbicas ou carregadas negativamente e assim impede a ação fotodinâmica das mesmas (ASHKENAZI, 2002; DIVON, 2004).

Apesar da aplicação de luz e corantes para inativação de microorganismos não ser uma descoberta recente, esta técnica não se disseminou na prática clínica, possivelmente devido a grande disponibilidade de agentes antimicrobianos desenvolvidos a partir do descobrimento da penicilina. No entanto, após dois anos da introdução da penicilina como agente terapêutico, foram descobertas cepas de

bactérias resistentes a este agente. A partir de então começou um fenômeno cíclico: tão logo um novo agente antibiótico era introduzido na terapêutica, bactérias resistentes ao seu mecanismo de ação eram isoladas (NUÑEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2007).

Assim, como até o momento não existem evidências de resistência microbiana à TFD, esta modalidade terapêutica pode ser de extremo valor para o tratamento de doenças ocasionadas por esses microorganismos, principalmente em casos de infecções superficiais como as de ocorrência mais freqüente na pele ou na cavidade oral.

Infecções generalizadas ou localizadas causadas por microorganismos são as doenças de maior prevalência na cavidade oral e determinados tipos de microorganismos podem tornar o indivíduo mais ou menos susceptíveis a infecções oportunistas ou a uma determinada patologia (NUÑEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2007).

Por esse motivo tem crescido as aplicações da TFD na Odontologia, sendo utilizado em doenças periodontais para redução microbiana pós tratamento e equilíbrio da flora normal, evitando a perda óssea. Também em endodontia, implantodontia e no combate a bactérias cariogênicas a TFD tem se mostrado um eficiente método de redução microbiana e seu uso na odontologia parece bastante promissor (MENDES, 2005; NUÑEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2007).

Outras doenças causadas por microorganismos têm dado bons resultados de cura quando tratadas por TFD, como é o caso da Leishmaniose, particularmente a do tipo Tegumentar Americana (TA), causada por um protozoário, transmitido por um mosquito do tipo flebótomo, que leva a ulcerações desfigurativas em seres humanos e animais (HIOKA; 2007).

1.9 Porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄

1.9.1 TMPyP

As porfirinas catiônicas têm atraído considerável atenção como fotossensibilizadores efetivos, devido sua afinidade para ácidos nucleicos, podendo fotoclivar seletivamente DNA. Estudos mostram também sua capacidade de fotoinativação de bactérias extremamente resistentes e sua atividade antiviral (MOSINGER et al., 2006). Entre as porfirinas mais estudadas está a porfirina catiônica TMPyP - *meso-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina* (Figura 17).

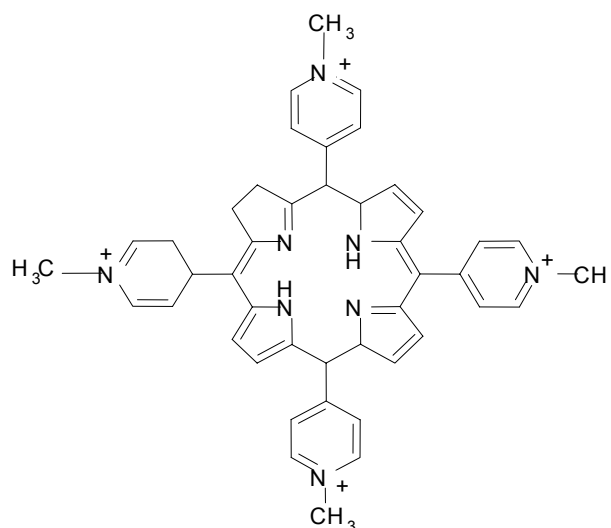
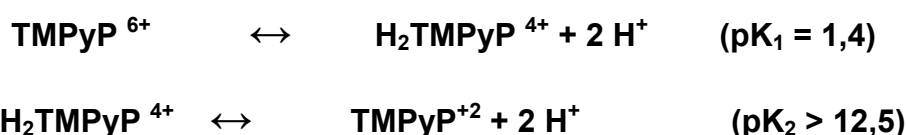


Figura 17 – Estrutura química da porfirina TMPyP

O motivo de interesse nessa porfirina reside na sua capacidade de solubilização tanto em solventes orgânicos como em água, mostrando-se monomérica em soluções orgânicas e aquosas em concentrações menores que 10^{-4} mol.L⁻¹, até mesmo a altas forças iônicas, além de outros aspectos já comprovados experimentalmente, tal como sua estabilidade em uma ampla faixa de pH e sua fotoestabilidade, mesmo na presença de ¹O₂ (MOSINGER et al., 2006; TOMINAGA et al., 2004). A porfirina TMPyP possui capacidade de produzir ¹O₂ com alta

eficiência ($\Phi_{\Delta} = 0,77$), além de ser relativamente estável à irradiação (ZEBGER et al., 2004).

O grupo de pesquisa SCEOM - Síntese e Caracterização Espectroscópica de Compostos Orgânicos e Materiais da UEPG, em trabalhos anteriores analisou a referida porfirina, determinando o pK_a da mesma na ausência e na presença dos surfactantes SDS, HPS e CTAB. Observou-se a presença de três espécies em equilíbrio na ausência de micelas e sob variação de pH: TMPyP^{6+} , $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ e TMPyP^{+2} (TOMINAGA et al., 2004).



As mudanças espectrais decorrentes da variação de pH e do surgimento de cada uma das espécies acima citadas, estão nas figuras 18 (a) e 18 (b), bem como, os valores de pK para cada uma dessas espécies estão nas Figuras 19 (a) e 19 (b).

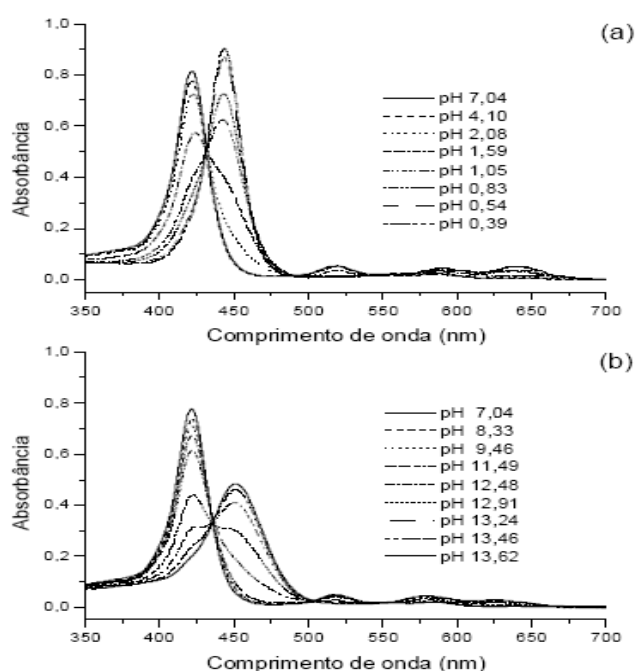


Figura 18 - Espectros de absorção na região visível e ultravioleta da porfirina TMPyP em acetato/fosfato 20 mmol/L em função do pH (a) na faixa de pH de 0,5 até 7,0 (b) na faixa de pH 7,0 até 14,0 (TOMINAGA et al, 2004)

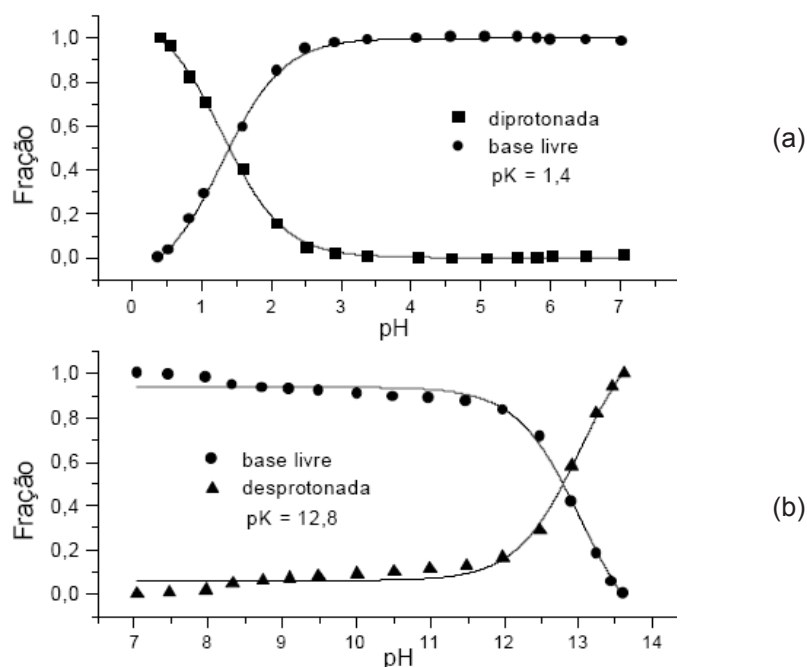


Figura 19 - (a) frações das componentes em função do pH na faixa de pH de 0,5 até 7,0; (b) Frações dessas componentes em função do pH na faixa de pH de 7,0 até 14,0 (TOMINAGA et al, 2004).

Portanto, pode-se verificar que a porfirina TMPyP encontra-se em sua forma base livre numa ampla faixa de pH (entre 3,0 e 12,0), o que lhe confere vantagens em sua possível utilização em TFD, pois mesmo exposta a grandes diferenças de pH não há alterações em seu sistema eletrônico, o que poderia gerar deslocamentos em suas absorções na janela fotodinâmica e diferentes rendimentos de fluorescência.

Na presença de micelas do surfactante SDS (aniônico), observou-se que o pK_1 ficou próximo de 0,0 e o pK_2 não foi observado indicando que o mesmo ocorre em pH's muito altos. Tendo isso em vista, verificou-se que houve interação, provavelmente de caráter eletrostático, entre a porfirina e o surfactante, ocorrendo a proteção da porfirina com relação a protonação e desprotonação. Em presença de HPS, observou-se comportamento espectral semelhante ao observado em solução acetato/fosfato, com uma diminuição discreta no valor de pK_1 , que passou de 1,4 para 0,8 na presença desse surfactante, indicando alguma interação entre porfirina e

micela. Na presença de CTAB, não foram observadas mudanças em relação aos dados obtidos em solução acetato/fosfato 20 mmol/L, indicando que não houve interação entre as micelas de CTAB e a porfirina (TOMINAGA et al, 2004).

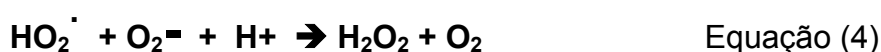
A TMPyP também vem sendo estudada para inativação de microorganismos, sendo feita a associação do FS e luz visível para inativação de bactérias, fungos e vírus. A fotoinativação de bactérias desperta um interesse especial, visto que esses microorganismos mostram-se resistentes a uma gama de antibióticos hoje utilizados. A resistência de bactérias patogênicas a antibióticos representa nos dias de hoje um desafio para o desenvolvimento de modalidades antibacterianas. A possibilidade de erradicar bactérias, especialmente as espécies Gram-negativas através de drogas ativadas por luz tem imediato potencial terapêutico para controlar doenças infecciosas. A fotossensibilização de bactérias tem mostrado ser independente da resistência dessas aos antibióticos hoje utilizados (ASHKENAZI, 2002; DIVON, 2004; PERUSSI, 2007).

Porfirinas catiônicas e ftalocianinas têm mostrado produzir inativação direta de bactérias Gram-negativas sem a presença de agentes permeabilizantes adicionais (ASHKENAZI, 2002). Testes feitos com a porfirina TMPyP em dose de 3 a 11 $\mu\text{mol/L}$ e uma dose de luz de 6 $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$, mostram que há conjugação das cargas positivas da TMPyP com resíduos negativamente carregados da *E. coli*. Assim, a conjugação faz com que o fotodano seja localizado em alvos macromoleculares, em proteínas e ácidos nucleicos por ação do $^1\text{O}_2$ através da excitação luminosa da TMPyP. Com isso, conclui-se que a natureza catiônica do FS é crucial para a inativação da bactéria Gram-negativa (DIVON, 2004).

Experiências de fotoinativação das bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* e a espécie mutante *A. calcoaceticus Rec (-)* com doses

baixas de TMPyP (0,73 $\mu\text{mol/L}$) e 4 J/cm^{-2} de luz azul (407 nm a 420 nm) mostraram que os principais danos se dão na membrana citoplasmática e ao DNA das células bacterianas, sendo que observou-se a inatividade das espécies em até 60% e de 95 a 98% quando aumentou-se a dose do FS para 14,6 $\mu\text{mol/L}$ (ASHKENAZI, 2005; NITZAN; 2004).

Sabe-se que a agregação da porfirina pode ser um fator desfavorável a formação de oxigênio singlete, porém, estudos realizados por Keiko et al. (2006), utilizando agregados eletrostáticos entre a porfirina catiônica TMPyP e a porfirina aniônica TPPS₄ numa razão de 1:1 evidenciam que na forma altamente agregada, estes agregados são bons geradores da espécie citotóxica H₂O₂ em solução aquosa, porque são capazes de transferir elétrons para a molécula de O₂, produzindo o íon superóxido (O₂⁻) que leva a formação de H₂O₂ pelas reações ilustradas nas equações 3 e 4:



Em solução aquosa o O₂⁻ está sempre em equilíbrio com seu ácido conjugado HO₂[·], o que permite a ocorrência das reações descritas.

O agregado eletrostático TMPyP-TPPS₄ é eficiente na produção de H₂O₂ porque este se forma na superfície da fase sólida do agregado, o qual atua como um semicondutor. Dessa forma percebe-se que embora os agregados formados por essas porfirinas não sejam capazes de gerar ¹O₂, podem levar a produção de outras espécies citotóxicas, igualmente interessantes para TFD (KEIKO et al., 2006).

Essas duas porfirinas – TMPyP e TPPS₄ – também foram estudadas através da ligação destas a materiais hidrogéis modificando suas superfícies. Ao ligar essas porfirinas a copolímeros de HEMA (2-hidroximetil metacrilato), MAA (ácido metacrílico) ou DEAEMA (2 – (dietilamino) etil metacrilato), esses hidrogéis carregados mostraram alta interação eletrostática com a porfirina apropriada catiônica ou aniônica, resultando em materiais que são usados para gerar ¹O₂ na fotoexcitação e podem assim ser usados para reduzir infecções pós-operatório intraocular de cirurgias de catarata para recolocar lentes com base em hidrogéis (BRADY, et al, 2007)

A porfirina aquo-solúvel TMPyP também tem sido estudada extensivamente por causa de suas propriedades físico-químicas que comandam a interação com o ácido nucléico, bem como sua ação fototerapêutica. A formação de um complexo entre TMPyP e DNA quadruplex G-paralelo, constituído por uma seqüência simples de telômero humano d(TAGGG) tem sido estudado em um esforço de compreender o modo de reconhecimento entre a TMPyP e o DNA (MITA, et al., 2006).

A porfirina TMPyP foi estudada em associação com o *DIAGNOdent*[®], utilizado no diagnóstico por fluorescência de lesões de cárie. Foi utilizada uma solução de porfirina 0,2 mmol/L preparada em dimetil sulfoxido e água 1:1 associada ao *DIAGNOdent*[®] para avaliar o desempenho no método de detecção de cáries em superfície lisa ou oclusais, avaliar a capacidade de detecção precoce da desmineralização e testar a capacidade do método em quantificar a perda mineral de lesões de superfícies lisas. Verificou-se que a associação da porfirina ao *DIAGNOdent*[®] proporcionou uma melhor performance na detecção de lesões artificiais de cáries de superfície lisa e na detecção precoce da desmineralização causada pela cárie dentária em dentes decíduos (MENDES, 2005).

1.9.3 ZnTPPS₄

A porfirina Zinco(II)-*meso*-tetrakis(4-sulfonatofenil) - ZnTPPS₄ - é um fotossensibilizador de caráter aniônico em que quatro grupos sulfonatofenil encontram-se ligados ao anel porfirínico, sendo que ao centro há um átomo de zinco no estado de oxidação 2+, coordenado aos nitrogênios dos anéis pirrólicos (Figura 20).

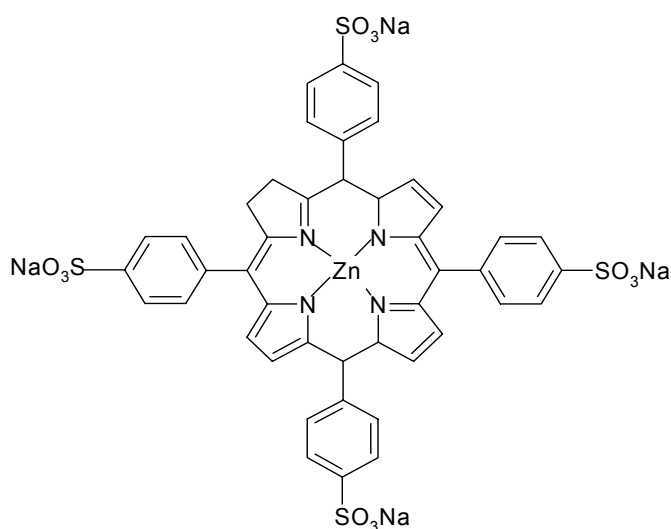


Figura 20 – Estrutura química da porfirina ZnTPPS₄

A ligação de porfirinas e metaloporfirinas a modelos biomiméticos (micelas de surfactantes) têm atraído interesse devido a possibilidade de entendimento de muitos processos biológicos e fotoquímicos, tal como, fotossíntese, transporte de oxigênio, oxidação e redução e transporte de elétrons (GANDINI; YUSHMANOV; TABAK, 2001). Assim são encontrados muitos estudos da interação desses FS com micelas de surfactantes (GANDINI; YUSHMANOV; TABAK, 2001; KADISH, 1989).

Gandini e colaboradores conduziram estudos com a metaloporfirina ZnTPPS₄ em presença de micelas do surfactante zwitteriônico HPS, mostrando que há interação dessas porfirinas com micelas de HPS devido sua carga negativa interagir com a parte dipolo do surfactante, levando a um aumento considerável do

valor da constante de ligação micela/porfirina quando comparada com porfirinas catiônicas em presença do mesmo surfactante (GANDINI et al, 2005).

Kadish e colaboradores estudaram as porfirinas aniônicas TPPS₄, CuTPPS₄ e ZnTPPS₄ em soluções contendo micelas de CTAB (catiônica), SDS (aniônica) e Triton X - 100 (neutra), visando o uso dessas porfirinas em TFD e ressonância magnética de imagem, visto que a TPPS₄ é conhecida por localizar-se em tumores, em alta concentração comparado com outros tecidos. As porfirinas Fe(III)TPPS₄, Mn(II)TPPS₄ e CuTPPS₄ também tem se mostrado úteis como agentes de contraste por imagem de RMN para tumores (KADISH et al., 1989).

Ao analisar espectroscopicamente a porfirina ZnTPPS₄ na presença de micelas dos referidos surfactantes, observou-se mudanças nas propriedades espectrais da porfirina, com deslocamento da banda Soret para a região do vermelho na presença de CTAB e Triton X - 100. O λ_{max} da banda Soret que se encontrava em 422 nm em água mudou para 427 nm na presença do surfactantes CTAB e 428 na presença do Triton X - 100. O valor de absorvidade molar das bandas Q também sofreu alteração passando de $348 \times 10^{-3} \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em água para $426 \times 10^{-3} \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em CTAB e $356 \times 10^{-3} \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em Triton X - 100. Nenhuma mudança foi observada em presença de SDS (KADISH et al., 1989).

No mesmo estudo, verificou-se através de espectros de RMN ¹H que soluções da porfirina ZnTPPS₄ preparadas em D₂O, na concentração de $6,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ou mais concentradas, mostram a presença de agregados. Contudo a adição de surfactantes CTAB e Triton X-100 a essas soluções promove a desagregação da porfirina devido a proteção que a micela do detergente promove às moléculas da porfirina, visto que o espectro de RMN registrado para essas soluções mostrou-se semelhante ao da porfirina em concentrações na ordem de 10^{-4} , onde predomina

seu estado monomérico. Mais uma vez o surfactante SDS não mostrou interagir com a porfirina de modo que ao adicionar esse detergente às soluções de ZnTPPS_4 o espectro de RMN mostrou-se inalterado em relação ao espectro da espécie agregada (KADISH et al., 1989).

Assim pode-se observar que porfirina ZnTPPS_4 , por ter caráter aniônico é capaz de se solubilizar em micelas contendo cargas positivas ou neutras, mas não em micelas que contem apenas carga negativa. Essa interação porfirina/micela é tão efetiva que promoveu a desagregação da ZnTPPS_4 , mesmo em concentrações relativamente altas. Esse efeito deve-se a fatores eletrostáticos, mas no caso do surfactante neutro o efeito dominante é de interações hidrofóbicas (KADISH et al., 1989).

Em estudo com as porfirinas Fe(III)TPPS_4 e ZnTPPS_4 , realizado na presença de micelas iônicas e não iônicas em solução aquosa, a fim de avaliar fatores como agregação e constante de ligação, através das técnicas de absorção ótica, fluorescência, RLS e RMN ^1H , observou-se a presença de três espécies diferentes da porfirina ZnTPPS_4 à pH 4,0 em presença de CTAC (cloreto de cetiltrimetilamônio) de caráter catiônico: metaloporfirina livre, metaloporfirina monomérica ou agregada ligada a micelas e na forma de agregado não micelar porfirina/surfactante. A razão $[\text{CTAC}]/[\text{ZnTPPS}_4]$ para a formação do agregado porfirina/surfactante foi de 8, independente do pH. Esses agregados não micelares são formados devido à atração da porfirina com o surfactante e ocorre a concentrações bem menores que a cmc do surfactante, na região de micromolar. Quando a concentração de surfactante aumenta, atinge uma razão crítica surfactante/metaloporfirina que possibilita a desagregação em favor da espécie micela/porfirina (GANDINI; YUSHMANOV; TABAK, 2001).

No caso dos surfactantes HPS (*N*-hexadecil-*N,N*-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato) de caráter zwitteriônico, Brij-35 e Triton X-100, ambos não iônicos, os agregados não micelares não foram observados em pH de 2,0 a 12,0, havendo portanto apenas duas espécies nesses meios: porfirina livre com $\lambda_{\text{max}} = 422$ nm para banda Soret; 555 nm e 595 nm para as bandas Q; e as espécies ligadas a micelas com λ_{max} para banda Soret em 426 nm em HPS e 428 nm para o Brij-35 e Triton X-100; 560 nm e 600 nm para as bandas Q em ambos os surfactantes. Na presença desses surfactantes não há formação de agregados metaloporfirina/surfactante a concentrações menores que a cmc, devido interações insuficientes entre as moléculas dos mesmos. Contudo há valores maiores que a cmc dos detergentes, observou-se a interação da ZnTPPS₄ com HPS devido à interação da carga negativa da porfirina com a carga positiva do surfactante. Já com os surfactantes neutros a interação tem caráter hidrofóbico (GANDINI; YUSHMANOV; TABAK, 2001; KADISH, 1989).

As constantes de ligação para a ZnTPPS₄ e os surfactantes foram determinadas por absorção ótica e são da ordem de 10^4 , valor similar a outros previamente obtidos para a porfirina na forma de base livre. Para os surfactantes Brij-35 e Triton X-100 a constante foi um fator de 3 a 5 menor que aquele para CTAC e HPS a pH 4,0. Ao contrario da porfirina FeTPPS₄, não é observada a formação de agregado “ponte” μ - oxigênio para a ZnTPPS₄, nem mesmo em soluções ácidas (GANDINI; YUSHMANOV; TABAK, 2001).

O fato de ter ocorrido mudanças espectroscópicas com a porfirina ZnTPPS₄, indica que a mesma é afetada pela presença dos surfactantes ocorrendo interação entre essas espécies o que leva a concluir que metaloporfirinas carregadas podem interagir com membranas celulares (GANDINI; YUSHMANOV; TABAK, 2001).

Também a relativa estabilidade dessa porfirina em diferentes pHs deve ser considerada como um fator positivo, visto que sua integridade espectroscópica e por consequência fotodinâmica será mantida.

A porfirina ZnTPPS₄ ligada a ciclodextrina hpβCD, foi testada contra células cancerosas de melanoma G361 in vitro. Nesse estudo foi comprovado o fotodano às células cancerosas na região visível do espectro, utilizando-se uma lâmpada de halogênio (24 V/ 250 W) como fonte de radiação. Após 24 horas de incubação da cultura de células com 10,0 μmol.L⁻¹ de ZnTPPS₄, 1,0 μmol.L⁻¹ de ciclodextrina e uma dose total de irradiação de 12,5 J/cm⁻², foi comprovado o fotodano ao DNA das células através do “ensaio de cometa” e usando microscópio de inversão de fluorescência. Verificou-se ainda que o uso de doses de radiação visível na ausência do FS não induziu danos ao DNA das células doentes (KOLAROVA et al., 2005).

A geração de ¹O₂ pela porfirina ZnTPPS₄ foi estudada por Garcia (2003), onde verificou-se que o rendimento quântico dessa espécie é maior quando utiliza-se soluções dessa porfirina na faixa de 10⁻⁴ mol/L (GARCIA, 2003).

A quitosana (Figura 21) é um polímero natural e adequado para aplicações em biomedicina e na elaboração de formulações farmacêuticas uma vez que apresenta biodegradabilidade, baixa toxicidade e boa biocompatibilidade e por isso muito utilizado como transportadora de fármacos (SOARES; AZZELLINI, 2007).

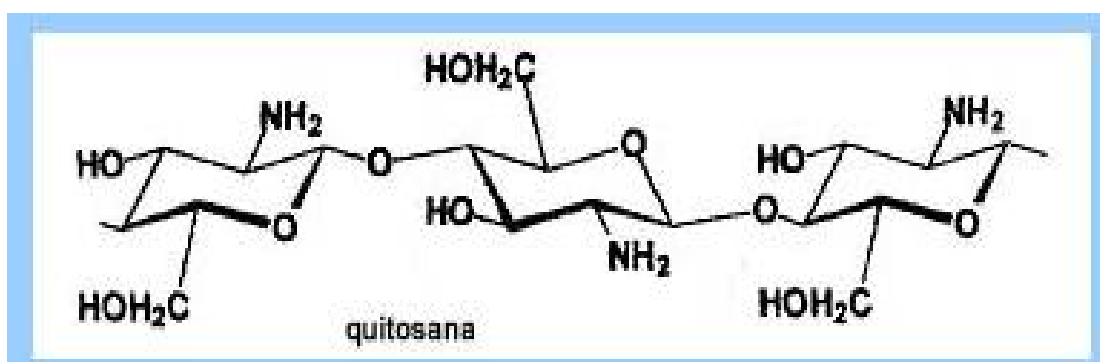


Figura 21 - Estrutura química da quitosana

Soares e Azzellini (2007) conduziram estudos com solução aquosa da porfirina ZnTPPS₄, em pH 4,5, fazendo a adição de quantidades crescentes de quitosana. A interação entre o FS e a quitosana foi acompanhada fazendo o espectro eletrônico de absorção e medidas de fluorescência durante a adição de polímero. Dessa forma observou-se que a cada adição de quitosana a intensidade de absorção diminuiu gradativamente tanto para a banda Soret quanto para as bandas Q, sendo observados pontos isosbéticos bem definidos nas regiões dessas bandas, assim também como a diminuição na emissão de fluorescência das bandas Q, o que indica o estabelecimento de interações entre a ZnTPPS₄ e o polímero de quitosana em solução (SOARES; AZZELLINI, 2007).

Essas interações são de natureza eletrostática visto que a pH 4,5 a quitosana possui uma grande área de contato carregada positivamente, devido a protonação dos grupos amino, favorecendo a interação com a ZnTPPS₄ aniônica. Quando o pH do meio foi elevado para 7,0 observou-se uma recuperação gradual das intensidades de absorção e emissão, indicando a dissociação da ZnTPPS₄ com a quitosana. Assim, verificou-se que a interação entre o FS e o polímero de quitosana pode ser controlado em função do pH do meio, uma vez que o caráter eletrostático da interação é favorecido na condição de pH no qual os grupos amino da quitosana encontram-se protonados. Este sistema parece promissor como estratégia de liberação de FSs aniônicos já que a desprotonação da quitosana ocorre em pHs próximos ao pH fisiológico (SOARES; AZZELLINI, 2007).

Estudos com a ZnTMPyP e o polímero quitosana sob a mesma condição de pH, não mostraram as mesmas variações espectrais visto que nesse caso ambas as substâncias são carregadas positivamente (SOARES; AZZELLINI, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar as porfirinas aquo-solúveis *meso*-tetrakis(4-metilpiridil)porfirina (TMPyP) e zinco-*meso*-tetrakis-(4-sulfonatofenil)porfirina (ZnTPPS₄), investigando sua potencial utilização na terapia fotodinâmica.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar a interação das porfirinas ZnTPPS₄ com modelos biomiméticos, através de medidas espectroscópicas no UV-Vis, das porfirinas em solução dos detergentes dodecil sulfato de sódio, SDS; brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB; e *N*-hexadecil-*N,N*,dimetil-3-amônio-1-propanosulfato, HPS na forma de micelas.
- Analisar a capacidade de agregação dessas porfirinas em meios de água/etanol.
- Avaliar as propriedades foto-físicas e foto-químicas dos compostos, através da ocorrência de reações de foto-branqueamento.
- Avaliar a capacidade de geração de oxigênio singlete das porfirinas.
- Testar a ação fotodinâmica das porfirinas analisadas *in vitro*, frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e com a bactéria *Escherichia coli*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

Para a realização deste trabalho, utilizou-se a porfirina catiônica cloreto de *meso*-tetrakis(*N*-metil-4-piridil), TMPyP da Sigma (Figura 17).

Empregou-se ainda a porfirina zinco-*meso*-tetrakis-(4-sulfonatofenil)porfirina, ZnTPPS₄ (Figura 20), que foi sintetizada pelo grupo de pesquisa da Professora Shirley Nakagaki da Universidade Federal do Paraná, a qual nos disponibilizou a mesma a fim de procedermos os estudos propostos.

As soluções de porfirina foram preparadas para que a concentração ficasse na faixa de 10^{-6} mol/L e absorbância registrada se encontrasse abaixo de 1,0 na banda Soret. Os demais reagentes utilizados, são de qualidade PA e a água utilizada no preparo de soluções foi destilada e deionizada.

As medidas de absorção ótica foram realizadas com espectrofotômetro Cary 100 Varian, utilizando-se cubeta de quartzo com duas faces polidas e caminho ótico de 1,0 cm. As variações de pH foram registradas com pHmetro NovaTec, dotado de um eletrodo de vidro Ag/AgCl.

3.2 Determinação do coeficiente de absortividade molar das porfirinas nos solventes água e etanol

Para a determinação do coeficiente de absortividade molar (ϵ) das porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄, preparou-se soluções dessas porfirinas em etanol ou em água, na concentração de $3,67 \times 10^{-4}$ e $2,98 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ respectivamente, e fez-se a diluição dessas soluções. Obteve-se o espectro de absorção ótica de cada solução na faixa de 300 a 700 nm. Através do tratamento de dados dos valores de

absorbância em função da concentração, foi possível obter o coeficiente de absorvidade molar de cada porfirina em cada um dos solventes.

3.3 Estudo espectrofotométrico da porfirina ZnTPPS₄ sob variação de pH na ausência e na presença de surfactantes.

Inicialmente, dissolveu-se uma pequena quantidade de porfirina ZnTPPS₄ em água destilada e deionizada, cuidando para que a absorbância registrada não ultrapassasse 1,0 na banda Soret e mediu-se o pH da solução. Separou-se a solução em duas alíquotas de 20 mL e iniciou-se a variação do pH. Com uma das alíquotas utilizou-se soluções de HCl em diferentes concentrações para diminuir o pH de 0,5 em 0,5 unidades até próximo de 0,0. A cada mudança de pH foi registrado um espectro na faixa de 350 a 750 nm. Com a outra alíquota, procedeu-se da mesma forma, porém, utilizando soluções de NaOH em diferentes concentrações, sendo que os intervalos de pH foram de cerca de 0,5 em 0,5 unidades até próximo a pH 14,0. Os espectros referentes a cada variação foram registrados na faixa de comprimento de onda anteriormente citada. Os mesmos testes foram realizados em solução acetato/fosfato 20 mmol.L⁻¹, em triplicata.

Para analisar a interação da porfirina ZnTPPS₄ com membranas biológicas foram utilizados modelos biomiméticos constituídos por micelas de detergentes, dentre os quais utilizou-se dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), e *N*-hexadecil - *N,N*, dimetil- 3- amônio-1-propanosulfonato (HPS). Estudo semelhante já havia sido realizado com a porfirina TMPyP pelo grupo de pesquisa SCEOM da UEPG.

Para as medidas em presença das micelas as porfirinas foram preparadas soluções dos surfactantes HPS, SDS e CTAB nas concentrações de 20 mmol/L para

os dois primeiros e 80 mmol/L para o último, em solução acetato/fosfato 20 mmol/L. Separou-se as soluções de surfactantes em duas alíquotas de 20 mL e acrescentou-se a cada delas uma pequena quantidade de porfirina na forma sólida, cuidando para que a absorção da banda Soret não fosse superior a 1,0. Fez-se a medida do pH da solução resultante e obteve-se seu respectivo espectro de absorção da faixa de 350 a 750 nm. A uma das alíquotas acrescentou-se HCl em diferentes concentrações, variando o pH de 0,5 em 0,5 unidades até próximo de pH 0,0, enquanto à outra alíquota adicionou-se solução de NaOH em diferentes concentrações, até próximo de pH 14,0, como descrito no item 3.3.

3.4 Análise da capacidade de agregação

Para analisar a capacidade de agregação das porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ preparou-se misturas de água/etanol variando a porcentagem de água em 0; 20; 30; 40; 50; 60; 80 e 100%. A essas misturas acrescentou-se 20 µL de solução de porfirina TMPyP ou ZnTPPS₄ a $3,67 \times 10^{-4}$ e $2,98 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ respectivamente, e fez-se a leitura espectroscópica para cada uma das misturas, na faixa de 300 nm a 700 nm.

3.5 Reações de foto-branqueamento

Colocou-se 20 µL de solução de porfirina TMPyP ou ZnTPPS₄, nas concentrações acima citadas, em 4 mL de água destilada e deionizada. Após a homogeneização dessa solução, transferiu-se para uma cubeta de quartzo e levou-se ao espectrofotômetro onde fez-se a leitura de 300 a 700 nm. A solução de porfirina foi posteriormente colocada em iluminação com sistema de seis LEDs vermelhos em série (Figura 22), cada um com potência equivalente a 5 mW

totalizando 30 mW. A cada 5 minutos de iluminação, a solução foi levada ao espectrofotômetro para novas leituras na mesma faixa de comprimento de onda, totalizando um período de iluminação de 1 hora (SOARES, 2006).



Figura 22 – Sistema de LEDs, utilizado para iluminação das soluções de porfirina

3.6 Teste do ácido úrico

O teste do ácido úrico foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Prof. Noboru Hioka, da Universidade Estadual de Maringá e descrita por Soares (2006).

Para tanto, preparou-se uma solução de ácido úrico com concentração na ordem de 10^{-4} mol/L e numa alíquota de 5 mL de solução acrescentou-se 20 μ L de solução de porfirina TMPyP ou ZnTPPS₄, para que a concentração destas ficasse na ordem de 10^{-6} mol/L. Transferiu-se esta solução contendo ácido úrico e porfirina para uma cubeta de quartzo e fez-se a leitura espectroscópica na faixa de 200 a 800 nm. O sistema foi transferido para o dispositivo mostrado na figura 23 e iluminado com LEDs vermelhos. A cada 3 minutos de iluminação foi registrado um novo espectro, até totalizar um período de 30 minutos. Através dos espectros de absorção foi possível avaliar a atividade fotodinâmica das substâncias testadas, empregando os valores obtidos na equação 5:

$$AF = \Delta A_{AU} \times 10^5 / W \times t \times A_{Ps\lambda irr} \quad \text{Equação (5)}$$

Onde:

- AF: atividade fotodinâmica;
- ΔA_{AU} : variação da absorbância a 293 nm do ácido úrico após o tempo total de irradiação;
- W: potência da luz (mW);
- t: tempo de irradiação em segundos;
- A_{PsIrr} : valor de absorbância do fotossensibilizador em solução de ácido úrico no comprimento de onda da irradiação.

3.7 Ensaios biológicos *in vitro*

3.7.1 Toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS)

O ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* foi realizado, segundo a metodologia de Meyer com adaptações (MEYER, 1982). Os ovos de microcrustáceo são comercializados como alimento vivo para peixe e foram adquiridos em loja de artigos para aquários.

Os ovos foram colocados para eclodir em solução aquosa de NaCl (3,8 g/L). O recipiente utilizado para esse teste é dividido em dois compartimentos, sendo um deles protegido da luz e o outro iluminado por uma lâmpada fria de 14 W (Figura 23). Os ovos foram depositados no compartimento protegido da luz, sendo que após a eclosão, os microcrustáceos migraram através dos orifícios, em direção a luz.

Após 48 horas foram coletados 20 microcrustáceos a temperatura média de 20 °C e distribuídos em número fixo em tubos de ensaio, acrescentando 1,5 mL das soluções de porfirinas TMPyP ou ZnTPPS₄ nas concentrações de 10, 30 e 50 ppm, respectivamente, e completando com solução salina até 3 mL.

As amostras foram divididas em dois grupos: as submetidas à iluminação com LEDs vermelhos por duas horas e as sem iluminação, incluindo o controle que não possui solução das porfirinas, e ficou isento de luz. Após o tempo de irradiação foi feita a contagem do número de camarões vivos e mortos em cada tubo de ensaio. Os testes foram realizados em triplicata.

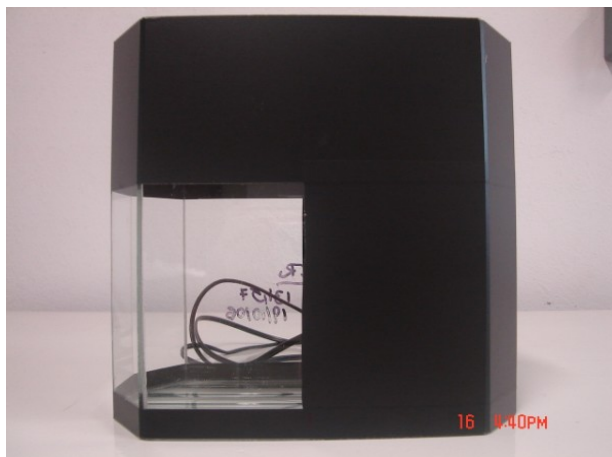


Figura 23 – Recipiente utilizado para eclosão dos ovos de *Artemia salina*

3.7.2 Ensaio *in vitro*: cultura bacteriana

Para realização desse teste utilizou-se a bactéria *Escherichia coli* 25922, fornecidas pelo laboratório de microbiologia da UEPG. Foram preparadas suspensões utilizando solução salina 0,9 % de NaCl (soro fisiológico) com a bactéria, acompanhando-se a absorbância em um colorímetro Micronal a 580 nm até que estas atingissem a absorbância próximo a 0,8, equivalente de cerca de 10^8 bactérias/mL.

Dessa suspensão pipetou-se 10 μ L e depositou-se em tubos contendo 2 mL de meio nutritivo *Trypticase Soy Agar* (TSA) e 40 μ L de porfirina TMPyP, ficando a solução com concentração de 10 ppm desse composto. Os tubos foram separados em dois grupos: os submetidos à iluminação de LEDs vermelhos 30 mW (Figura 22), e aqueles submetidos à iluminação de LEDs azuis de potência 650 mW/cm² e

emissão na faixa de 470 a 500 nm, utilizados em consultórios odontológicos como polimerizador de resina.

Os tempos de iluminação em cada um dos sistemas de LEDs foi de 1; 2; 5 e 30 minutos. Fez-se ainda os seguintes controles: I) somente iluminação e sem porfirina; II) presença de porfirina e sem iluminação e III) ausência de iluminação e porfirina (controle geral). Decorrido o tempo de iluminação, fez-se a homogeneização das soluções agitando-se por cerca de 15 segundos em um vórtex Quimis e coletou-se 10 µL de cada um dos tubos semeando-se em placas de Petri contendo Agar TSA. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C.

Após o tempo de incubação as placas referentes aos testes e aos controles foram fotografadas com câmera digital Sony Cybershot DSC 707, com resolução de 5.0 megapixels e as colônias de bactérias foram contadas através do programa analisador de Image-Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics). O mesmo procedimento foi empregado para avaliar a ação da porfirina ZnTPPS₄ sobre a *E. coli*. Todos os testes foram feitos em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do coeficiente de absorvidade molar das porfirinas nos solventes água e etanol

Os valores de absorvidade molar (ϵ) referentes a cada uma das porfirinas nos diferentes solventes estão mostrados na Tabela 3, abaixo:

Tabela 3 - Coeficientes de absorvidade molar das porfirinas ZnTPPS₄ e TMPyP

Porfirinas	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}}$ (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ_{Etanol} (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)
ZnTPPS ₄ ($\lambda_{\max}^*$)	421	$3,19 \times 10^5$	424	$6,01 \times 10^5$
TMPyP ($\lambda_{\max}^*$)	422	$3,49 \times 10^5$	424	$3,72 \times 10^5$

O coeficiente de absorvidade molar da porfirina ZnTPPS₄ foi calculado considerando o $\lambda_{\max}$ 421 nm em água e 424 nm em etanol, visto que o solvente interfere no máximo de absorção, já que influencia nas transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, deslocando o máximo de absorção para comprimentos de onda maiores (efeito batocrômico) como ocorrido, ou para comprimentos de onda menores (efeito hipsocrômico). Para a porfirina TMPyP, o ϵ foi calculado considerando o $\lambda_{\max}$ de 422 nm no solvente água e 424 nm no solvente etanol, devido aos mesmos motivos apresentados para a porfirina ZnTPPS₄.

De acordo com os dados obtidos, é possível observar que o solvente influenciou não somente os máximos de absorção das porfirinas, assim também como o coeficiente de absorvidade molar ϵ dessas espécies.

4.2 Estudo espectrofotométrico da porfirina ZnTPPS₄ sob variação de pH na presença e na ausência de surfactantes

Foi conduzido o estudo da variação de pH da porfirina ZnTPPS₄ em água e acetato/fosfato, como também na presença de surfactantes. Nesses testes buscou-se empregar uma quantidade de FS suficiente para manter a concentração da porfirina na ordem de 10^{-6} mol/L, onde predomina seu estado monomérico.

Na solução aquosa de ZnTPPS₄ observou-se a modificação dos espectros da porfirina com a diminuição do pH, havendo o deslocamento da banda Soret de 421 nm para 434 nm. Como pode ser observado (Figura 24), a porfirina sofre diminuição de absorbância em 421 nm à medida que o pH decresce. Isso mostra que os íons H⁺ adicionados, gradativamente interagem com a estrutura da porfirina, alterando seu sistema eletrônico e promovendo mudanças espectrais, o que indica a presença de uma espécie diferente da original. No caso da ZnTPPS₄, em água essa mudança só ocorreu a pHs baixos, geralmente menores que pH 2,5.

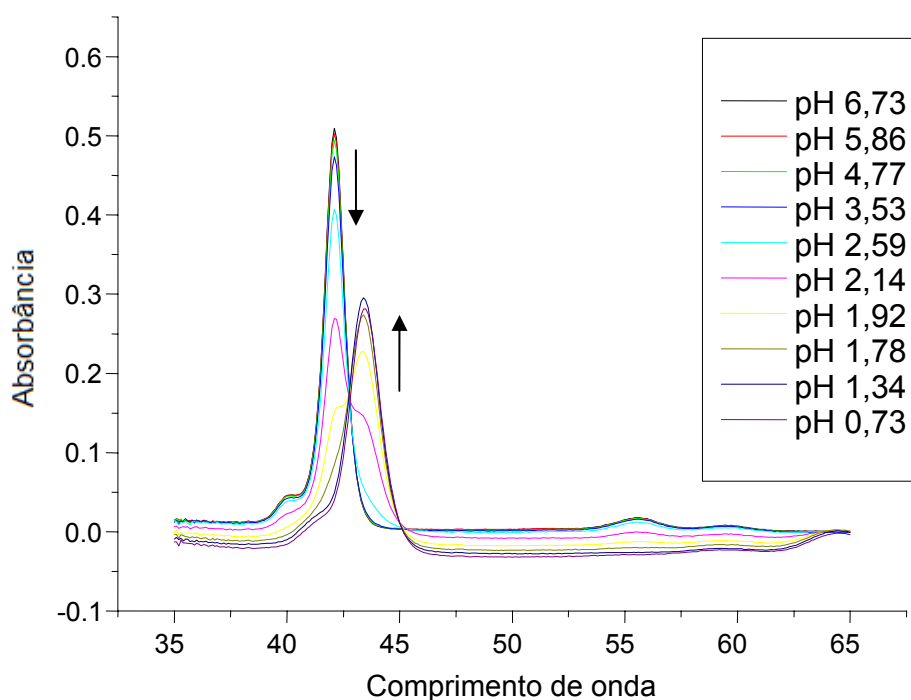


Figura 24 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS₄ em água na faixa de pH de 6,73 a 0,73

Para melhor visualização dos resultados obtidos da acidificação da solução da porfirina meio aquoso, plotou-se o gráfico da absorbância da porfirina ZnTPPS₄ em função da variação de pH a comprimento de onda de 421 e 434 nm (Figura 25), que correspondem aos máximos de absorção para as espécies inicial e aquela presente abaixo de pH 2,5 respectivamente. O ajuste dos dados através de uma função sigmoidal possibilitou a obtenção do valor de pK referente a transição entre a primeira e a segunda espécie.

Neste gráfico é possível notar ainda que, na faixa entre pH 7,0 e pH 2,5, a porfirina mantém-se estável, não havendo mudanças estruturais, o que representa um fator positivo em relação à terapia fotodinâmica.

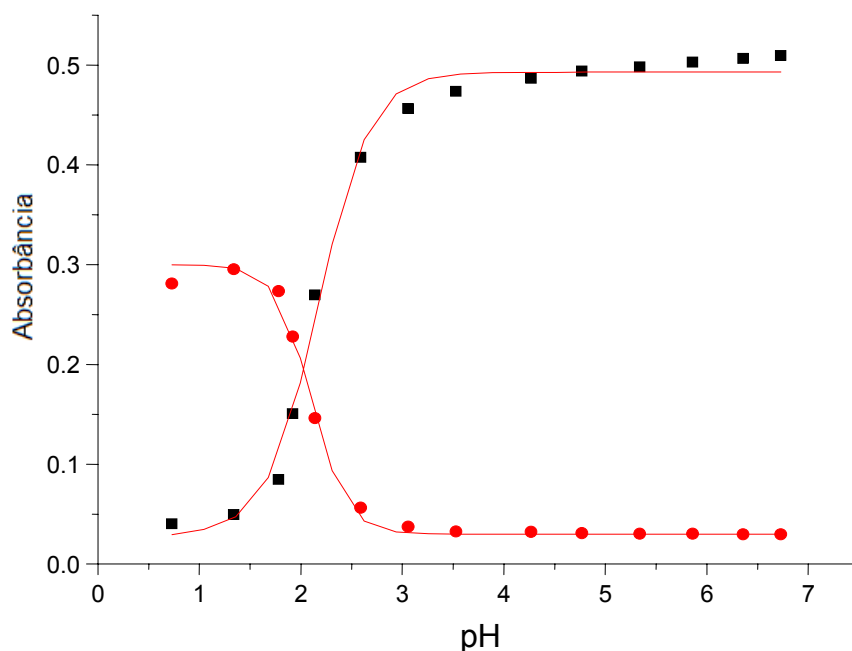


Figura 25 – Gráfico da absorbância da porfirina ZnTPPS₄ em solução aquosa em função do pH em 421 nm (■) e 434 nm (●)

Estudos conduzidos com outros FS mostram que é possível promover a desmetalção do anel porfirínico a pHs muito baixos (PEREIRA, 2004; SOARES, 2006), por isso acredita-se que com a diminuição do pH houve a desmetalção da porfirina ZnTPPS₄ com concomitante protonação ou agregação da porfirina TPPS₄, originada.

A desmetalção do anel porfirínico deveria num primeiro momento originar sua precursora não metalada TPPS₄, a qual apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção da banda Soret em 413 nm (KADISH et al., 1989) e quatro bandas Q características das porfirinas não metaladas. Contudo, o processo de desmetalção deve ter ocorrido a pHs suficientemente baixos, para que a protonação dos nitrogênios pirrólicos se suceda de forma sincronizada a saída do metal. Essa hipótese é reforçada ao observar que o deslocamento da banda Soret dá origem a um novo pico em 434 nm, valor este correspondente ao $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção da espécie protonada da porfirina TPPS₄, como verificado em resultados de estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Figuras 26 (a) e (b)). O valor de pK para essa porfirina em meio aquoso é maior que 4,5, logo, em pH menor que 2,5, esta já se encontrava protonada.

É preciso ainda levar em consideração a possibilidade de formação de agregado a partir da espécie protonada da TPPS₄, visto que muitos dos agregados observados derivam da formação prévia de formas protonadas das porfirinas, já que a inserção de cargas positivas no centro do anel favorecem a atração eletrostática entre os monômeros (PEREIRA, 2004).

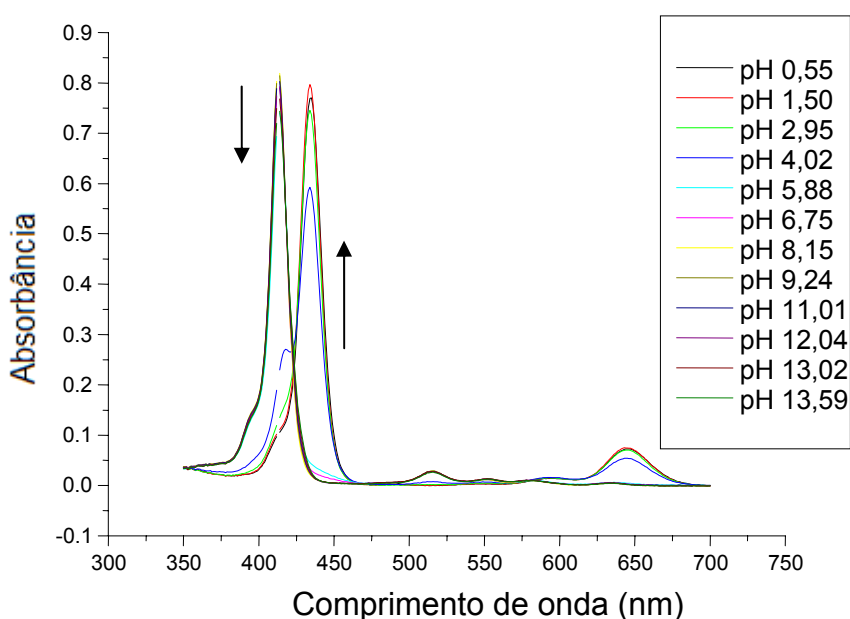


Figura 26 (a) - Espectros de absorção da porfirina TPPS₄ em água na faixa de pH de 0,55 a 13,59 (MOREIRA, 2005)

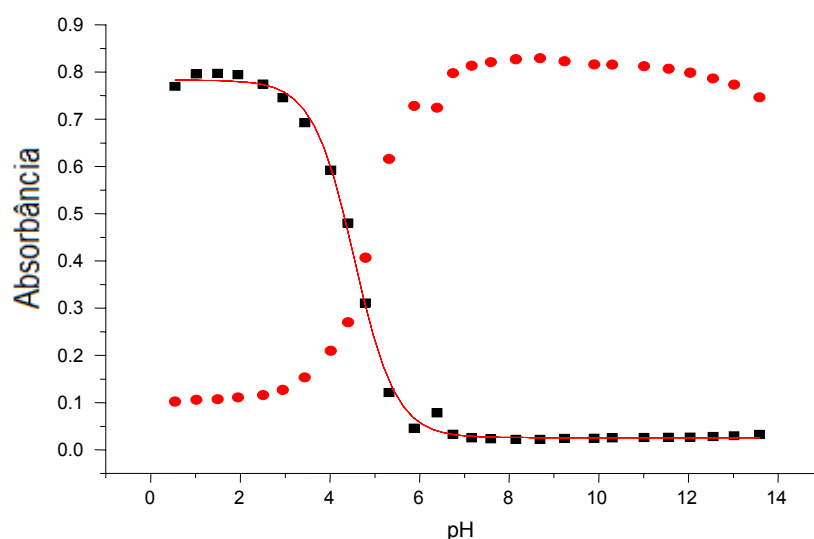


Figura 26 (b) - Gráfico da absorvância da porfirina TPPS₄ em solução aquosa em função do pH em 434 (■) nm e 413 (●) nm após ajuste pela função sigmoidal (MOREIRA, 2005)

Ao analisar o espectro resultante da alcalinização da solução de ZnTPPS₄ em água (Figura 27), não verifica-se a formação de um novo pico, contudo a acentuada redução da absorvância, verificada a partir de pH 9,0, evidencia alterações no sistema eletrônico da porfirina, podendo estar relacionado ao aparecimento de uma nova espécie. A espécie potencialmente presente a partir desse pH deve tratar-se do produto da reação de dessulfonação da porfirina ZnTPPS₄ pela adição de íons OH⁻, a qual tende a ocorrer de forma reversível.

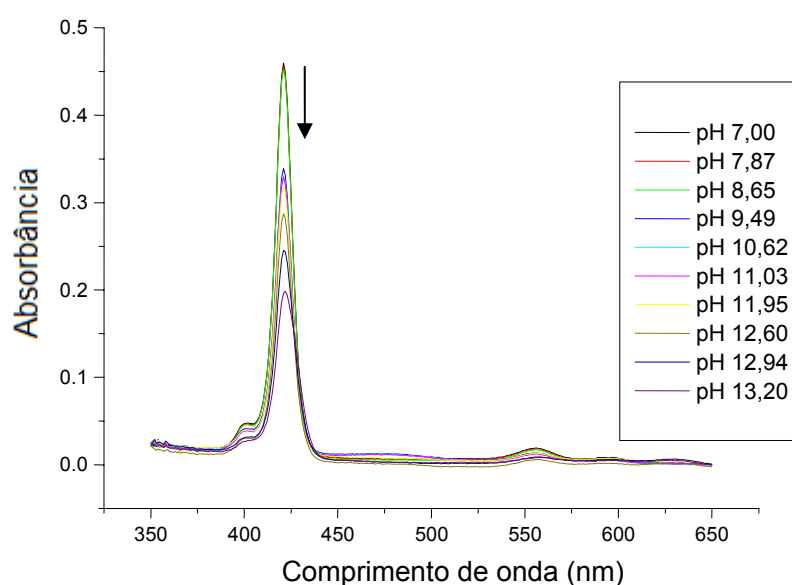


Figura 27 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS₄ em água na faixa de pH de 7,0 a 13,2

Resultados semelhantes foram obtidos para a solução da porfirina ZnTPPS₄ em acetato/fostato 20 mmol/L quando promoveu-se a acidificação do meio (Figura 28 (a)). Com a adição de ácido, a absorvância da banda Soret registrado inicialmente em 421 nm, diminuiu progressivamente, mas de forma moderada, devido a maior força iônica desse meio.

Em pH próximo de 1,9, a absorvância da banda Soret diminuiu significativamente e as bandas Q sofreram deslocamento para comprimentos de onda maiores (Figura 28 (b)) e um novo pico apareceu em 434 nm, mostrando que uma nova espécie esta presente. Abaixo desse pH, somente o pico em 434 nm foi registrado, indicando a permanência dessa nova espécie.

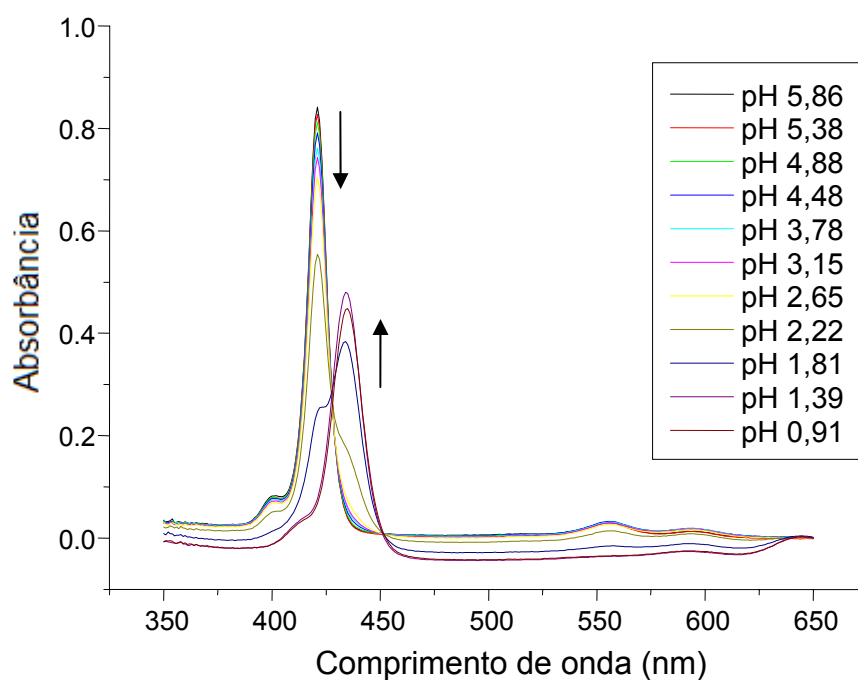


Figura 28 (a) - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS₄ em acetato/fostato na faixa de pH de 5,86 a 0,91

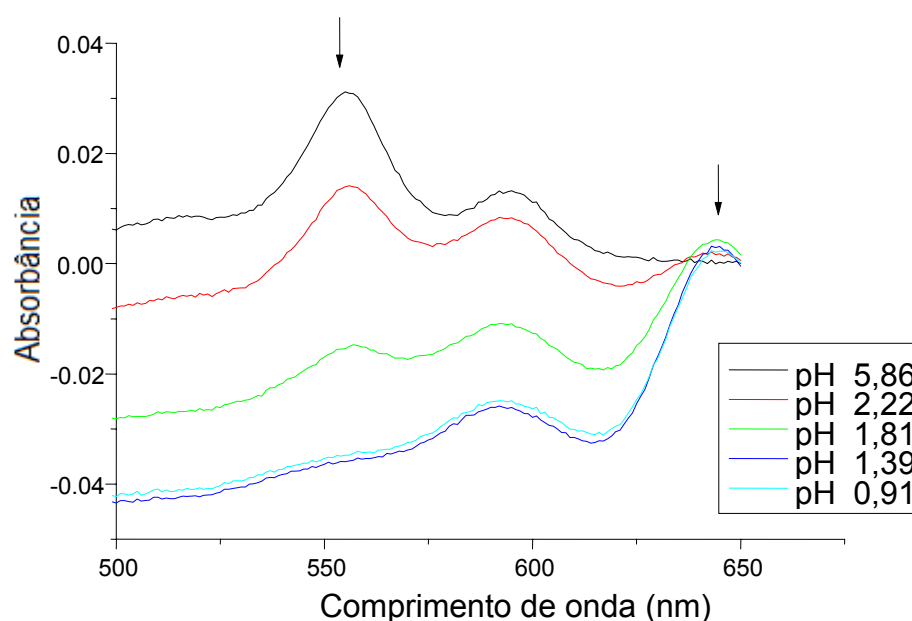


Figura 28 (b) – Deslocamento das bandas Q da porfirina ZnTPPS₄ em acetato/fosfato na faixa de pH de 5,86 a 0,91

Na figura 29 tem-se a absorbância das duas espécies registradas na faixa de pH de 0,86 a 5,91 e mostra-se um valor de pK menor (1,90), que o valor obtido em água (2,10), o que indica que nesse meio a formação da espécie oriunda da acidificação se dá em pHs menores, devido a maior força iônica da solução que abrandava o efeito dos íons H⁺ sobre a porfirina.

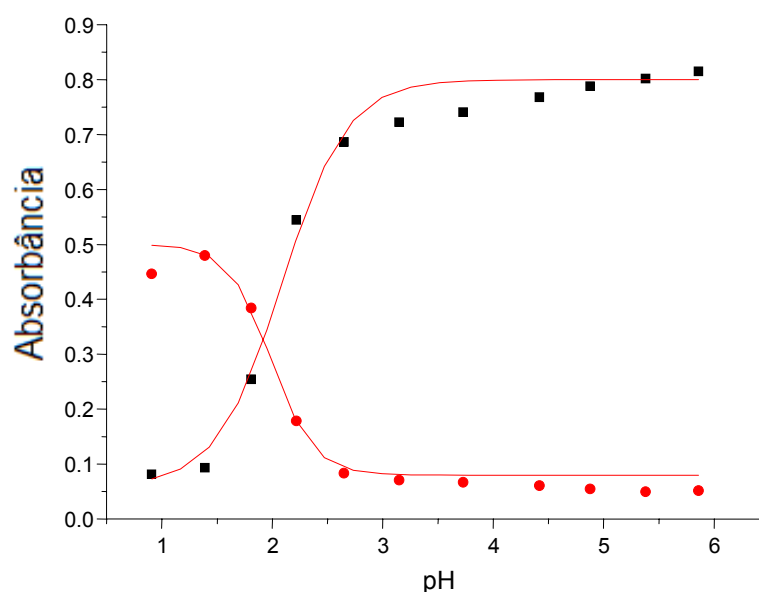


Figura 29 – Gráfico da absorbância da porfirina ZnTPPS₄ em solução de acetato fosfato, em função do pH em 421 nm (■) e 434 nm (●)

Os resultados obtidos para a variação de pH em meio básico, são apresentadas na figura 30, onde verifica-se que a banda Soret manteve-se em 421 nm, até próximo de pH 13,0, quando houve deslocamento para 423 nm e considerável diminuição de absorbância o que indica alterações na estrutura da porfirina acima desse pH. Nas bandas Q, foi observada apenas a diminuição da absorbância.

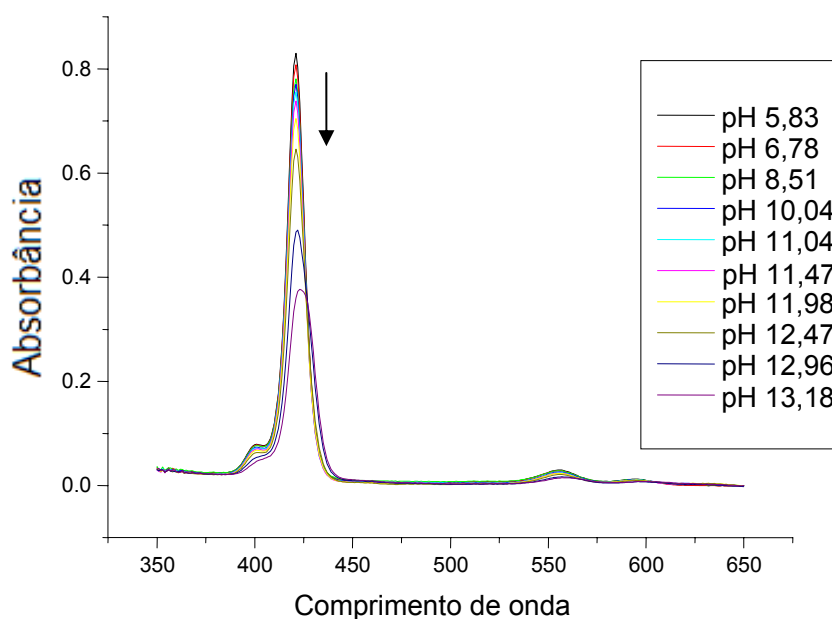


Figura 30 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS₄ em acetato/fosfato na faixa de pH de 5,83 a 13,18

O comportamento espectroscópico da porfirina ZnTPPS₄ também foi avaliado na presença de surfactantes de diferentes naturezas iônicas, a fim de avaliar a capacidade de interação dessa porfirina com modelos biomiméticos na forma de micelas desses surfactantes.

Nesses experimentos, as concentrações de surfactantes utilizadas foram maiores que a concentração micelar crítica (cmc), para garantir a completa interação porfirina-micela. Os valores de cmc's dos surfactantes são apresentados na Tabela 4 (TOMINAGA, 2004).

Tabela 4 – Valores das cmc's dos surfactantes SDS, HPS e CTAB

<i>Surfactante</i>	<i>cmc (mol/L)</i>
SDS	$8,0 \times 10^{-3}$
HPS	$5,0 \times 10^{-5}$
CTAB	$9,2 \times 10^{-4}$

Assim, para o surfactante SDS, de caráter aniônico, o espectro de absorção resultante da acidificação mostrou-se muito semelhante àqueles registrados para a porfirina em meio aquoso ou em acetato/fosfato, sendo que só a pH menor que 2,0 há o surgimento de um novo pico, resultante da nova espécie. O comportamento descrito está mostrado na figura 31.

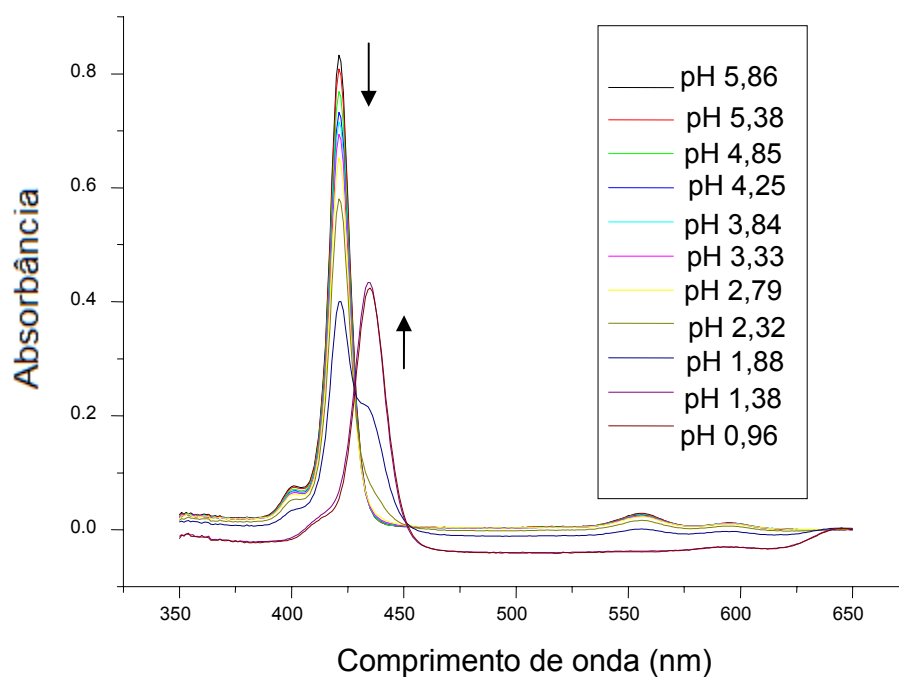


Figura 31 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS₄ em acetato fosfato na presença de SDS em função do pH na faixa de pH de 5,86 a 0,96

Na determinação do pK nesse meio (Figura 32), constatou-se um abaixamento significativo desse valor quando comparado com a água, mas semelhante ao valor de pK para acetato/fosfato, 1,79. Isso mostra que não houve

interação efetiva da porfirina ZnTPPS₄ com as micelas de SDS, visto que a mesma sofreu as mesmas alterações ocorridas quando na ausência desse surfactante. Isso pode ser justificado pela mesma natureza iônica da porfirina e das micelas, sendo ambas aniônicas havendo, portanto, repulsão das cargas dessas espécies, diminuindo a interação entre elas.

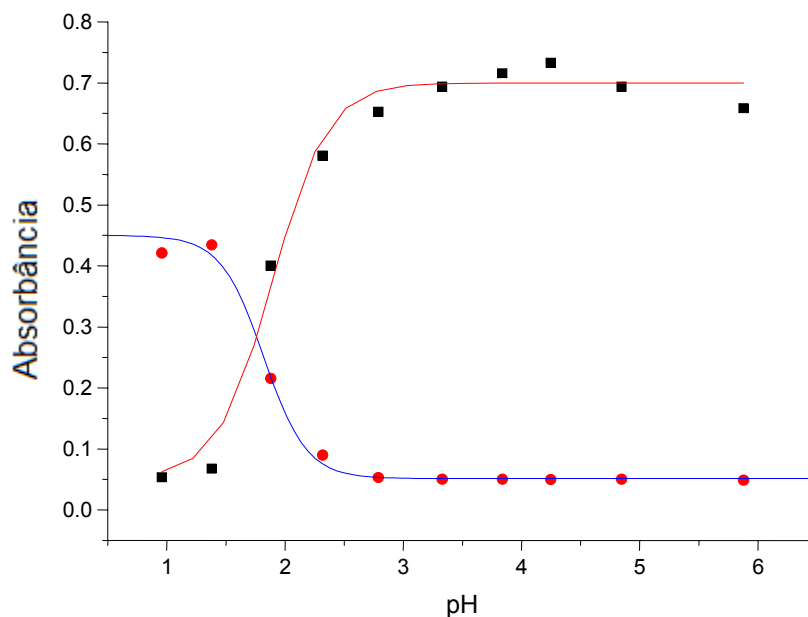


Figura 32 – Gráfico da Absorbância da Porfirina ZnTPPS₄ em solução de acetato fosfato, na presença de SDS em função do pH em 421 nm (■) e 434 nm (●)

Para o meio básico (Figura 33), o espectro se mostrou semelhante ao observado em acetato/fosfato. Em pH maior que 13,0, percebe-se um deslocamento de cerca de 3,0 nm para comprimentos de onda maiores, tanto para a banda Soret, quanto para as bandas Q, indicando que alguma alteração estrutural e espectral da porfirina deve ocorrer em pHs superiores ao máximo atingido nos experimentos. Devido a isso, fez-se o espectro de diferença da absorbância para menor e maior pH atingido e através do ajuste dos dados experimentais utilizando-se uma função sigmoideal, foi possível calcular os valor de pK_2 da ZnTPPS₄ nesse meio, valor mostrado na Tabela 5.

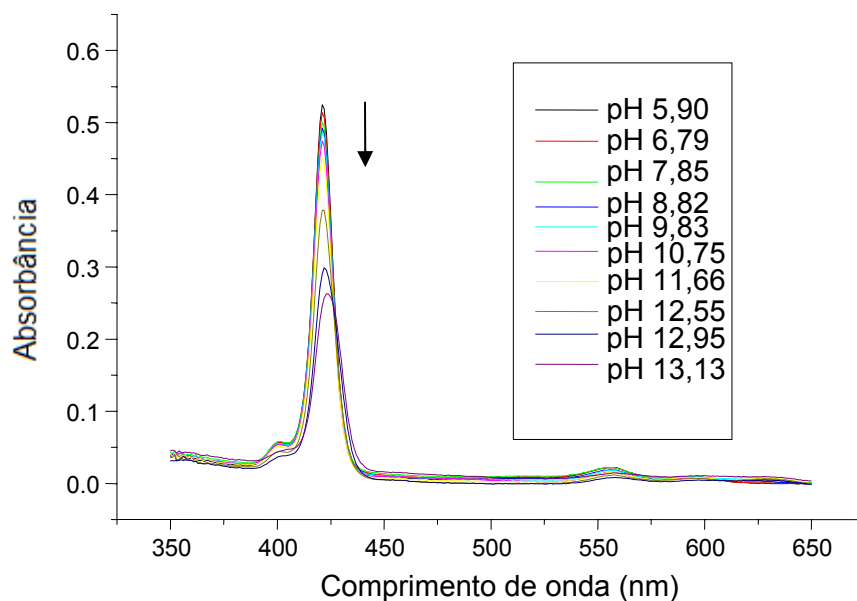


Figura 33 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS₄ em acetato fosfato na presença de SDS na faixa de pH de 5,90 a 13,13

Na presença de CTAB, as mudanças de pH foram realizadas e acompanhadas da mesma forma que para os outros meios (Figura 34). No entanto, ao promover as variações no pH, notou-se que o espectro resultante, mostrou-se praticamente inalterado mesmo a pHs muito baixos, perto de 1,0, o que indica que a interação entre porfirina e micela, foi efetiva o suficiente para proteger as moléculas de porfirina das alterações.

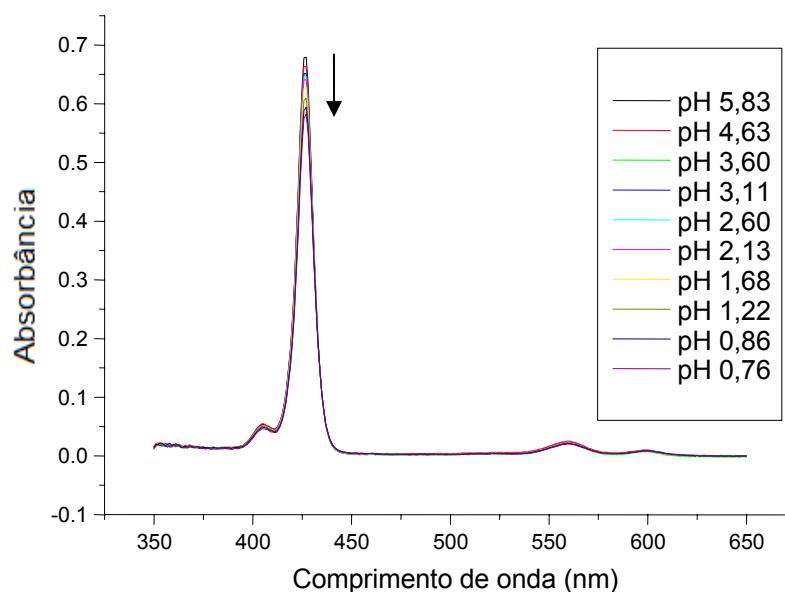


Figura 34 - Espectro de absorção da porfirina ZnTPPS₄ em acetato/fosfato na presença de CTAB na faixa de pH de 5,83 a 0,76

Em pHs básicos, houve a diminuição da intensidade de absorbância e o deslocamento do λ_{max} da banda Soret para 432 nm, demonstrando o surgimento da espécie diferente a pHs acima de 13,09 (Figura 35).

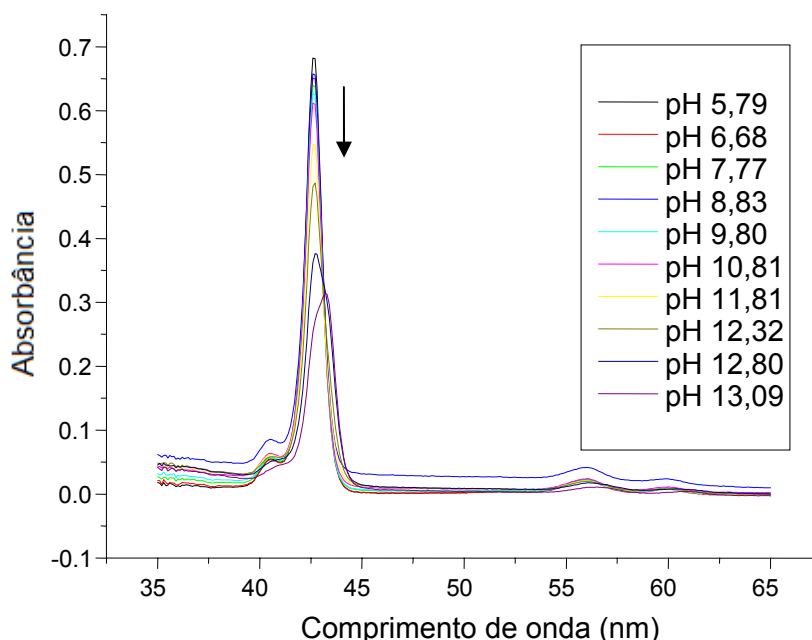


Figura 35 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS₄ em acetato/fosfato na presença de CTAB na faixa de pH de 5,79 a 13,09

Como a porfirina tem natureza aniônica e o detergente CTAB é catiônico, é possível afirmar que o fator mais relevante para a interação entre essas espécies é de caráter eletrostático, como já demonstrado em outros trabalhos semelhantes, em que analisou-se a interação da ZnTPPS₄ na presença de CTAC, um detergente também catiônico (GANDINI; YUSHMANOV; TABAK, 2001; KADISH et al., 1989).

Na análise espectroscópica foi possível observar que na presença desse surfactante a porfirina manteve-se estável por uma ampla faixa de pH, entre 0,0 e 11,0, o que confirma a interação entre essas espécies e confere a porfirina uma vantagem adicional, já que a não alteração espectral dessa substância influencia fortemente no êxito da TFD.

Comportamento semelhante foi observado para a ZnTPPS_4 na presença do surfactante HPS, zwitteriônico, meio no qual o λ_{max} da banda Soret foi registrado em 427 nm. Os espectros registrados para a porfirina em presença de HPS em meio ácido e meio básico estão mostrados nas figuras 36 e 37.

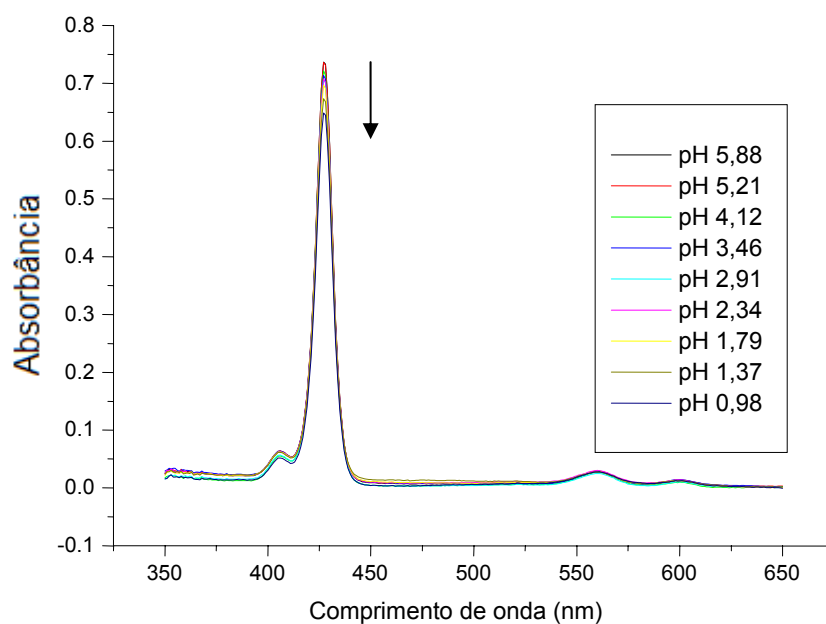


Figura 36 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS_4 em acetato/fosfato na presença de HPS na faixa de pH de 5,88 a 0,98

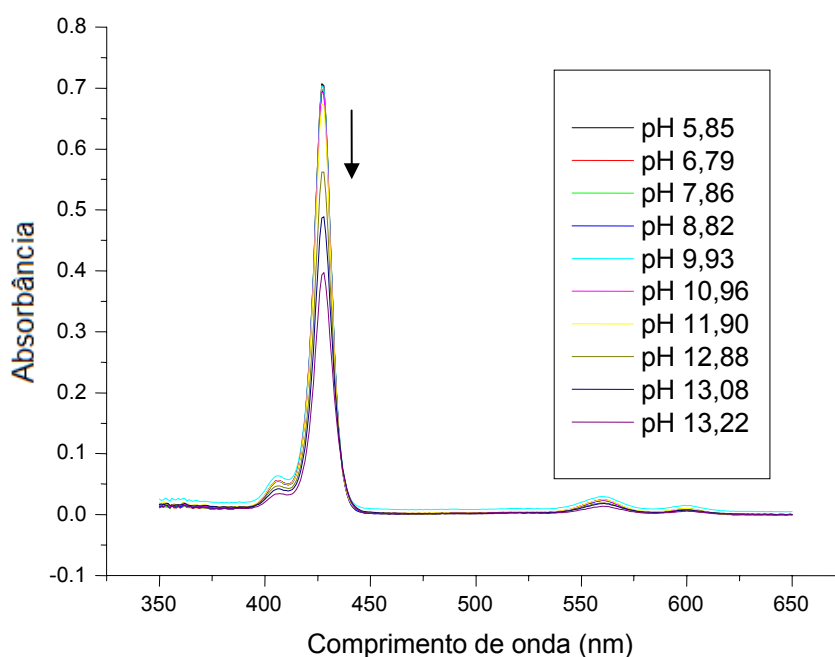


Figura 37 - Espectros de absorção da porfirina ZnTPPS_4 em acetato/fosfato na presença de HPS na faixa de pH de 5,85 a 13,22

Não é notado o aparecimento de novos picos de absorção referentes a novas espécies, nem a pHs muito baixos, nem a pHs muito altos, havendo apenas diminuição na intensidade de absorção a medida que o pH se distancia de 5,8 - região de pH em que se encontra a solução inicial da porfirina.

Assim como na presença de CTAB, a porfirina mostrou-se protegida também em presença de HPS, quando exposta a diferentes pHs, confirmando a interação porfirina/micela. Nesse caso a porfirina mostra-se estável e sem mudanças espectrais e estruturais significativas na faixa de 0,0 a 12,5, intervalo durante o qual apresenta absorbância relevante na banda Soret.

As forças de atração responsáveis pela interação entre a porfirina aniônica ZnTPPS₄ e as micelas do detergente HPS, zwitteriônico são eletrostáticas devido a presença de cargas positivas na molécula de HPS, que atraem as cargas negativas da porfirina (GANDINI et al., 2005).

As influências sofridas pela porfirina nos diferentes meios ficam melhor ilustradas quando observamos os valores de pK₁ da ZnTPPS₄ nos diferentes meios, mostrados na Tabela 5.

Tabela 5- pK₁ da porfirina ZnTPPS₄ em diferentes meios a 421 e 434 nm

<i>Água</i>	<i>Acetato/fosfato</i>	<i>SDS</i>	<i>CTAB</i>	<i>HPS</i>
2,10	1,90	1,79	-----	-----

Como é possível verificar, o valor de pK₁ é maior em água, como podia se esperar já que nesse meio a força iônica é menor e, portanto, a porfirina é mais perturbada a cada adição de ácido, ocorrendo mudanças estruturais e espectrais a pHs mais altos que em acetato/fosfato.

Em acetato/fosfato e na presença de SDS, embora não haja interação porfirina/surfactante suficiente para proteger a porfirina das mudanças provocadas pela adição de ácido, devido à incompatibilidade eletrostática entre surfactante/porfirina, as mudanças ocorrem mais tardiamente que em meio aquoso, já que além dos íons da solução de acetato/fosfato há também os íons provenientes do próprio surfactante, atenuando o efeito da adição dos íons H^+ .

Para os surfactantes CTAB e HPS que mostraram interagir de forma a proteger a porfirina das alterações do meio, através de interações de natureza eletrostática, não foi possível encontrar o valor de pK_1 , o que sugere que o mesmo ocorre a pHs extremamente baixos, próximos ou abaixo de 0,0.

Em meio básico, embora tenha havido um deslocamento batocrômico na maioria das análises da $ZnTPPS_4$ a pH acima de 13,0, não foi possível verificar a formação de um segundo pico em nenhum dos testes, visto que não foi possível obter pHs maiores que 13,4 nos experimentos realizados. Assim, buscou-se determinar o pK_2 em todos os meios, através do ajuste dos dados experimentais pela função sigmoideal, para os testes em realizados em meio básico, de onde se obteve os seguintes valores de pK_2 para os respectivos meios:

Tabela 6- pK_2 da porfirina $ZnTPPS_4$ em diferentes meios a 421 e 430 nm

<i>Água</i>	<i>Acetato/fosfato</i>	<i>SDS</i>	<i>CTAB</i>	<i>HPS</i>
13,71	13,47	13,48	13,52	-----

Como é possível verificar pelos dados acima, a mudança de estrutura da porfirina em meio básico só ocorre a pHs próximos de 13,5 ou acima deste, mesmo na ausência de surfactantes, o que demonstra que a porfirina $ZnTPPS_4$ tem grande

estabilidade em meios básicos. Esse retardamento na modificação da estrutura da ZnTPPS₄ em meio básico, deve-se ao fato de que diferentemente do que ocorre na acidificação, provavelmente não há a retirada do metal.

O fato de o comportamento espectral da porfirina ZnTPPS₄, na presença dos surfactantes HPS e CTAB ter sido diferente que o observado na ausência destes ou na presença do SDS, indica que a mesma é afetada pela presença destes, ocorrendo interação entre essas espécies, o que leva a concluir que metaloporfirinas carregadas podem interagir com membranas celulares (GANDINI; YUSHMANOV; TABAK, 2001). Também a relativa estabilidade dessa porfirina em diferentes pHs, mantendo sua estrutura monomérica em uma ampla faixa de pH, deve ser considerada como um fator positivo, visto que sua integridade espectroscópica e por consequência fotodinâmica será mantida.

Em suma, foi possível verificar que a atração eletrostática foi determinante para propiciar a interação micela/porfirina e por esse motivo os surfactantes que apresentaram carga oposta a da porfirina mostraram-se mais eficientes na proteção da porfirina frente a ambientes ácidos ou básicos. O efeito eletrostático ganha importância quando pensamos na possibilidade de encapsulamento de porfirinas, uma vez que a atração eletrostática pode facilitar a interação entre fármaco fotossensível e sistemas liberadores de fármacos (SOARES E AZZELINI 2007). O encapsulamento de fármacos fotossensíveis em nanopartículas ou polímeros tem ganhado a atenção de muitos pesquisadores porque permite melhorar as propriedades fotofísicas e fotoquímicas do FS, bem como, sua distribuição nos tecidos doentes e a redução de eventuais efeitos colaterais (ROSSI et al., 2007).

4.3 Análise da capacidade de agregação

Os testes de agregação foram feitos com as porfirinas ZnTPPS₄ e TMPyP em diferentes misturas água/etanol e mostram que houve mudanças no espectro de ambas as porfirinas a medida que a porcentagem de água/etanol foi alterada, como mostra os espectros ilustrados nas figuras 38 e 39:

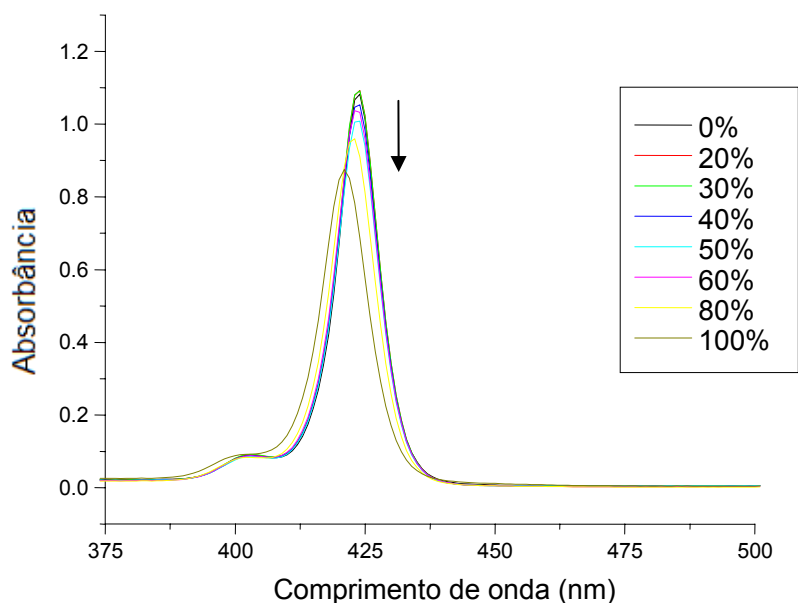


Figura 38 - Espectros de absorção da porfina ZnTPPS₄ a $2,98 \times 10^{-4} \text{ mol. L}^{-1}$ em diferentes misturas água/etanol

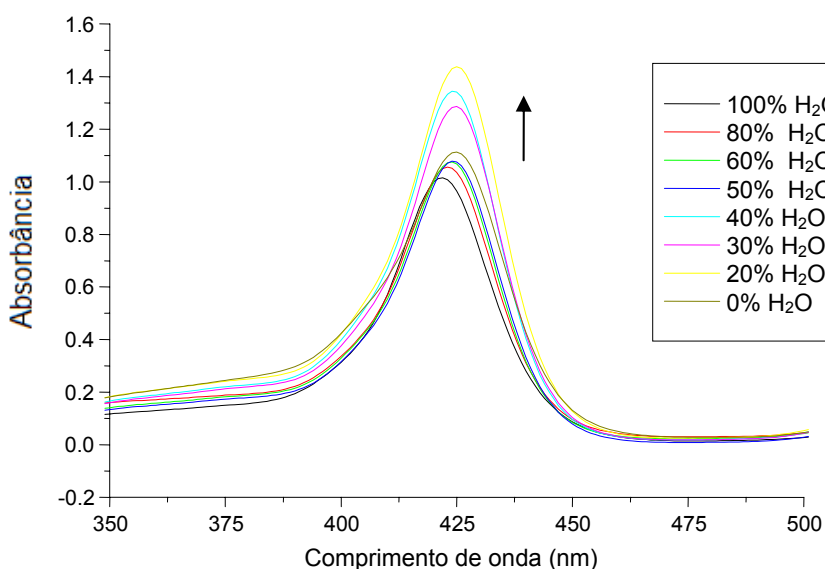


Figura 39- Espectros de absorção da porfina TMPyP a $3,67 \times 10^{-4} \text{ mol. L}^{-1}$ em diferentes misturas água/etanol

Para ambas as porfirinas o menor pico corresponde à condição de 100% de água, contudo os picos maiores não correspondem a 100% etanol e sim a misturas com teor de etanol na faixa de 70 e 80%.

Para ambas as porfirinas, observa-se que houve decréscimo da absorção, evidenciada pela diminuição da intensidade da banda Soret, principalmente em condições em que a presença de água era elevada. Também houve deslocamento do máximo de absorção na banda Soret, para comprimentos de onda menores – deslocamento hipsocrômico, o que pode sugerir a formação de agregados do tipo H, diferentes dos observados em meio ácidos.

Para nenhuma das porfirinas foi observado o aparecimento de novos picos, o que a princípio seria o principal indicador da presença de uma nova espécie, decorrente de agregação. No entanto, a ausência de picos não quer dizer necessariamente que o fenômeno de agregação não tenha ocorrido, uma vez que a ausência ou a presença de picos correspondente às espécies agregadas nos diversos sistemas é regida, segundo a teoria do Exciton Molecular, pela orientação relativa dos momentos dipolares de transição individual de cada monômero quando este compõe o agregado (SOARES, 2006; TESSARO, 2005).

Este fenômeno está relacionado com as diferentes orientações de momentos dipolares de transição de cada monômero constituinte do agregado. Assim, como o momento dipolar de transição é uma propriedade vetorial, em alguns casos a resultante vetorial ao compor o agregado se anula e o pico do agregado não é observado; no caso de sobreposição positiva há o surgimento de bandas adicionais (SOARES, 2006).

Apesar de esta ser uma possibilidade a ser considerada, o deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda menores observado quando as

porfirinas encontram-se apenas na presença de água (100% de H₂O) em relação aos meios com maior porcentagem de etanol, pode ser atribuída ao comportamento natural da mesmas em cada um desses solventes, como demonstrado na determinação do coeficiente de absortividade molar, onde registrou-se um λ_{max} de 422 nm em água e 424 nm em etanol para a porfirina TMPyP.

Quanto à porfirina ZnTPPS₄, um deslocamento mais acentuado do máximo de absorção pode ser visualizado quando o meio é constituído apenas de água. Contudo, os mesmos argumentos empregados para a porfirina TMPyP podem ser atribuídos a ZnTPPS₄, visto que a mesma tem λ_{max} de 421 nm em água e 424 em etanol, justificando um deslocamento mais acentuado, bem como, a diminuição de absorção pode ser explicada pela diferença nos coeficientes de absortividade molar da porfirina nos diferentes solventes ($3,19 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para a água e $6,01 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Dessa forma, através da técnica utilizada não é possível afirmar que houve a formação de agregados das espécies ZnTPPS₄ e TMPyP através da variação da composição do meio, com diferentes porcentagens água/etanol, uma vez que os dados levam a crer que as mudanças espectrais devem-se apenas a diferentes comportamentos e características físicas intrínsecas a cada porfirina em cada meio e não ao surgimento de uma nova espécie.

É provável que o emprego de técnicas mais sensíveis a presença dos agregados, tal como a análise da fluorescência molecular e RLS, pudesse oferecer dados que possibilitassem conclusões mais precisas, uma vez que as espécies agregadas são praticamente não-fluorescentes, porque a energia do composto neste estado, que deveria ser liberada na forma de luz, é suprimida por vibrações e

dispersões que ocorrem entre as próprias unidades monoméricas desse agregado (SOARES, 2006).

4.4 Teste de foto-branqueamento

Dentro dos critérios necessários para que uma substância tenha aplicabilidade em TFD está o de que a mesma deve ser estável na presença da luz, ou seja, não sofrer ou sofrer em pequena proporção reações de foto-branqueamento. Dessa forma, julgou-se importante o estudo do foto-branqueamento para as porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄, principalmente em água, onde verificou-se maior formação de oxigênio singlete, espécie que pode ser promotora desse tipo de reação. Os espectros referentes a esse estudo estão mostrados nas figuras 40 a 43, onde observa-se que os espectros obtidos nos vários tempos de iluminação estão sobrepostos

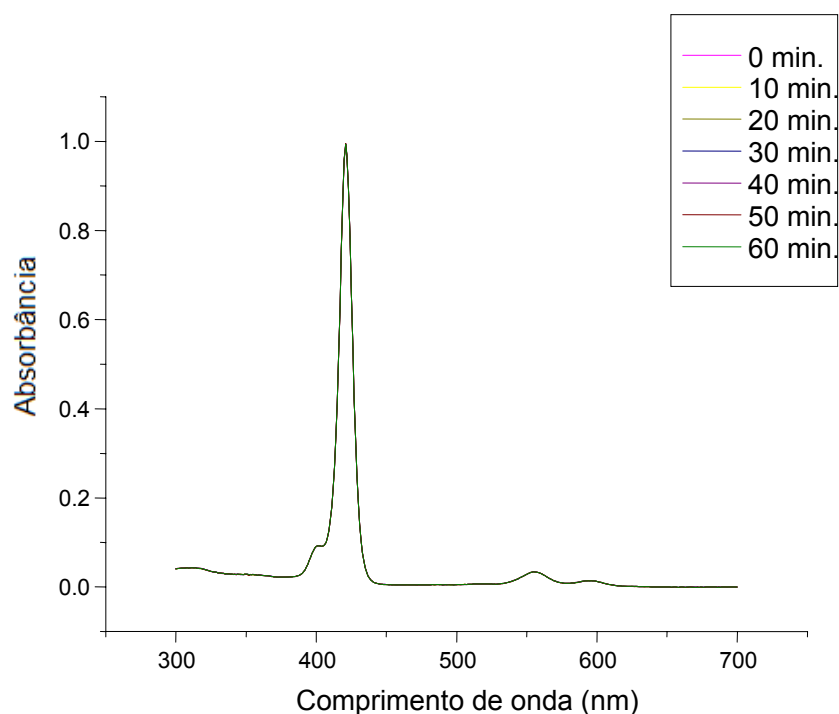


Figura 40 – Espectros da porfirina ZnTPPS₄ durante o teste de foto-branqueamento em água, durante um período total de iluminação de 60 minutos

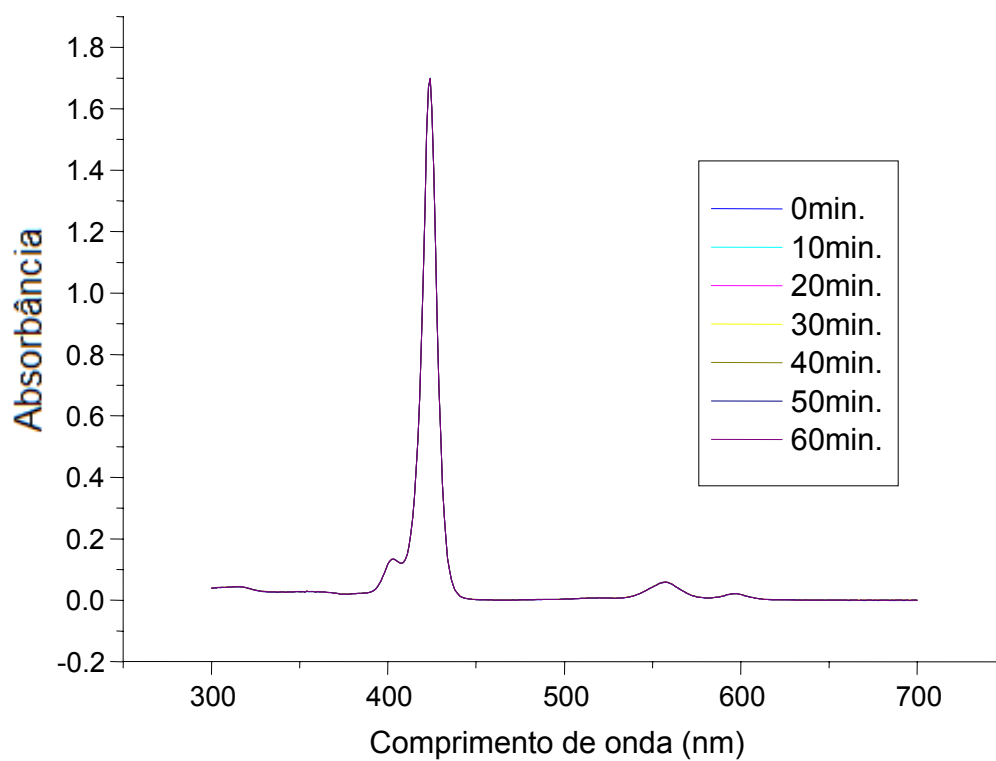


Figura 41 – Espectros da porfirina ZnTPPS₄ durante o teste de foto-branqueamento em etanol, durante um período total de iluminação de 60 minutos

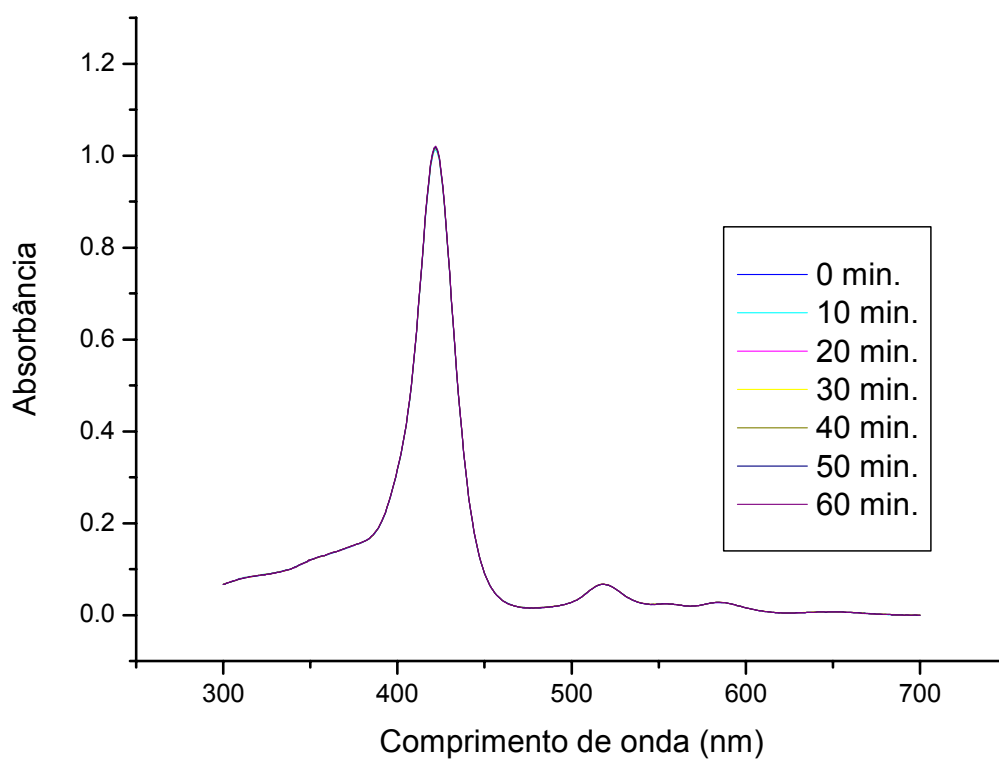


Figura 42 – Espectros da porfirina TMPyP durante o teste de foto-branqueamento em água, durante um período total de iluminação de 60 minutos

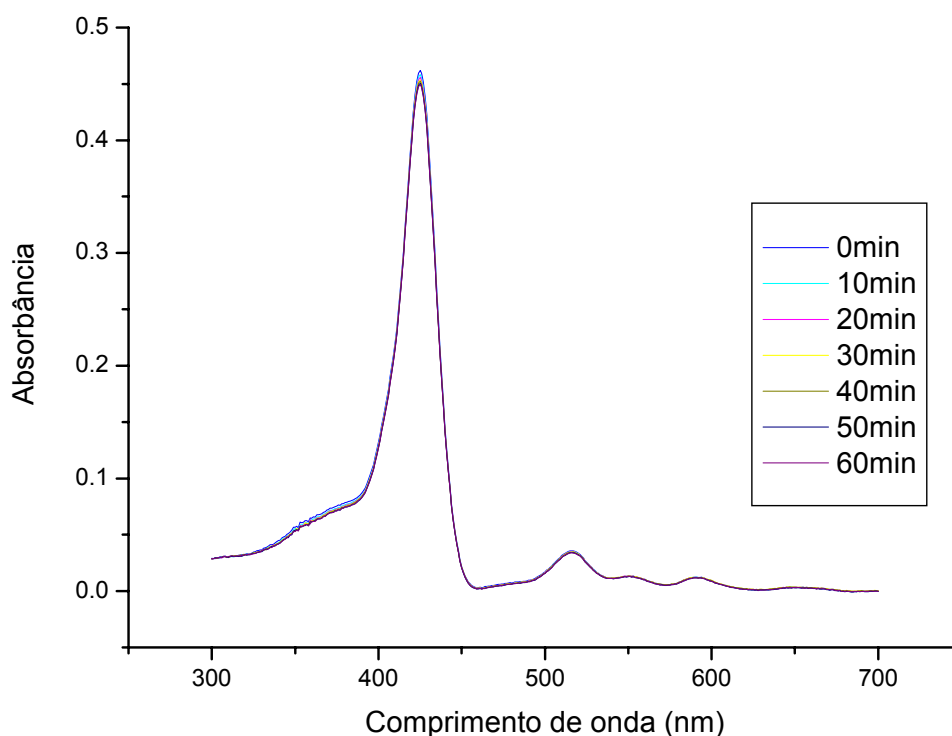


Figura 43 – Espectros da porfirina TMPyP durante o teste de foto-branqueamento em etanol, durante um período total de iluminação de 60 minutos

A porfirina TMPyP apresentou um decaimento de cerca de 2% do máximo de absorção na banda Soret tanto em água como em etanol, enquanto para a ZnTPPS₄ nenhum decaimento mensurável foi observado. Essa pequena diferença de comportamento entre as duas porfirinas está relacionada com suas diferentes capacidades de geração de oxigênio singlete mostradas no teste do ácido úrico, adiante. Assim, como a TMPyP tem maior capacidade de geração de oxigênio singlete, é natural que também sofra mais os efeitos de foto-branqueamento por ele causado.

No entanto, como é possível observar nos espectros de ambas as porfirinas, nenhuma mudança espectral significativa ocorreu mesmo após uma hora de iluminação, o que sugere que o processo de foto-branqueamento das mesmas não é

significativo, visto que essas reações costumam causar diminuição acentuada na absorbância e na fluorescência.

Foram conduzidos ainda estudos com maior tempo de exposição das porfirinas a luz, chegando a tempos de 180 minutos e mesmo assim não foram evidenciadas variações espectrais acentuadas, levando a conclusão de que ambas se mostram bastante estáveis sob as condições de luz a que foram expostas. Também é possível concluir que o oxigênio singlete gerado durante o processo – evidenciado no teste do ácido úrico - adiante discutido - não tem como alvo preferencial as moléculas de porfirina, fator que seria desfavorável à aplicação destes em TFD.

Esse fato corrobora a estabilidade dessas porfirinas em condições de iluminação e na presença de espécies reativas como oxigênio singlete, podendo este ser um indicativo positivo da aplicabilidade dessas substâncias na terapia fotodinâmica.

4.5 Teste do ácido úrico

O teste do ácido úrico permite identificar a geração de oxigênio singlete - espécie essencial à terapia fotodinâmica – e correlacionar com o potencial fotodinâmico da substância geradora dessa espécie. O ácido úrico é uma substância muito útil nesse tipo de avaliação por ser um aceptor de oxigênio singlete, o qual afeta notavelmente sua banda de absorção característica, situada na faixa de 290 nm. Portanto, este teste não mede diretamente a geração de oxigênio singlete, mas sim a atividade fotodinâmica do FS relacionada ao fato desta gerar o oxigênio reativo. Para a terapia fotodinâmica esta mensuração é importante, pois quanto maior for a atividade fotodinâmica do FS, maior poderá vir a ser sua eficiência para

aplicação em TFD. O método também oferece a vantagem de ser de simples execução e não ser oneroso.

Para a porfirina ZnTPPS₄ em etanol, não foi observado o decaimento apreciável da banda característica do ácido úrico, situada em 293 nm (Figura 44), mesmo depois de 30 minutos de iluminação, o que indica que nesse solvente não houve geração de oxigênio singlete por parte do FS.

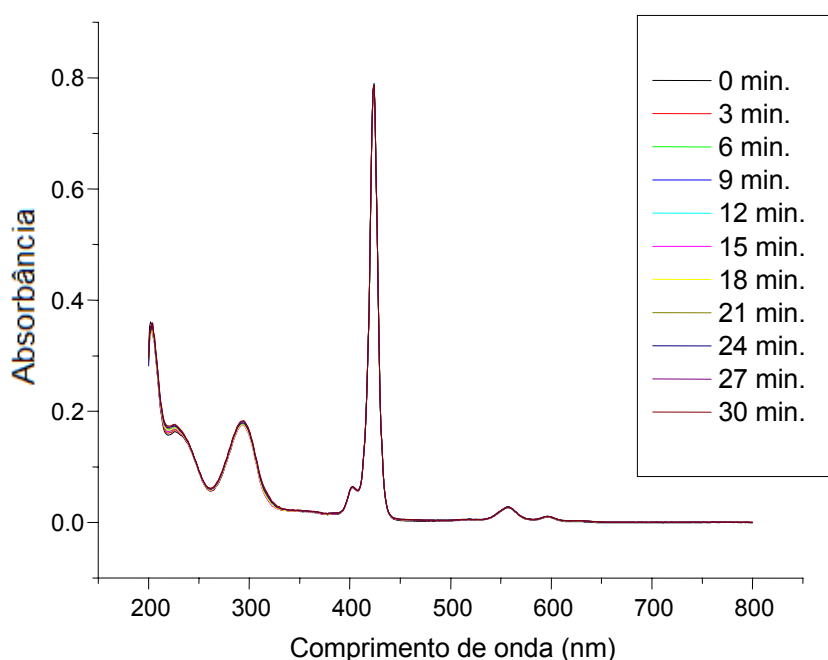


Figura 44 - Espectros de absorção da solução de porfirina ZnTPPS₄ a 10^{-6} mol.L⁻¹ em etanol, na presença de ácido úrico a 10^{-4} mol.L⁻¹ e sob iluminação com LEDs vermelhos por um período total de 30 minutos

Dois fatores podem ter contribuído para a geração não efetiva de oxigênio singlete: o primeiro refere-se à fonte de luz utilizada e o segundo, a ausência de oxigênio molecular. Levando-se em consideração a primeira hipótese, devemos observar que as bandas Q da porfirina ZnTPPS₄, encontram-se ambas abaixo de 600 nm, tendo seus máximos de absorbância em 557 e 597 nm, respectivamente.

Ao avaliar o espectro de emissão (Figura 45), da fonte de iluminação utilizada, verifica-se que os máximos de absorção da porfirina estão fora da região máxima de emissão da fonte, o que desfavorece a promoção da porfirina ao estado

excitado e impossibilita a transferência de energia as moléculas de oxigênio que eventualmente podem estar presentes no meio, levando ao oxigênio singlete.

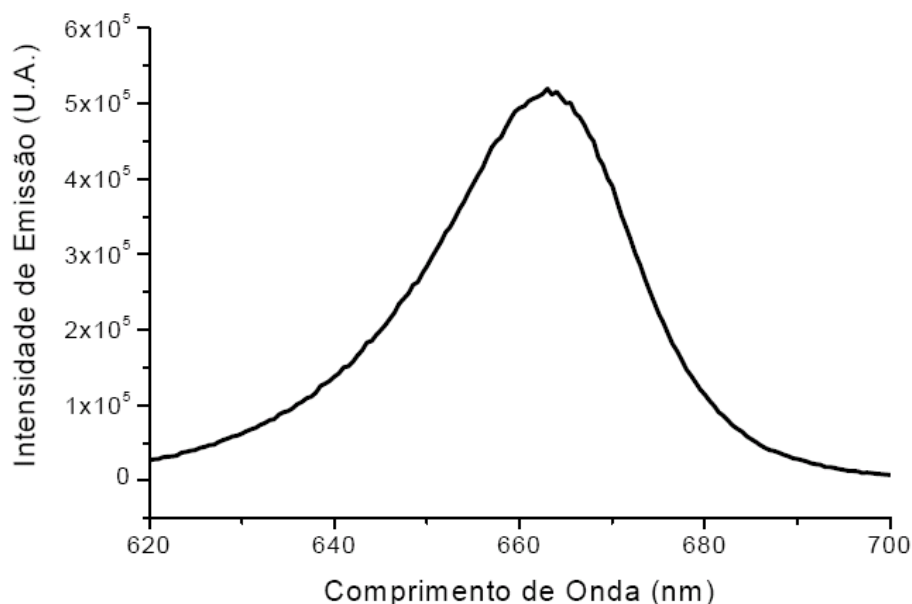


Figura 45 – Espectro de emissão da fonte a base de LEDs (SOARES, 2006)

No entanto, ao observar a segunda banda do ácido úrico, presente em 202 nm, nota-se redução da absorbância o que leva a concluir que as moléculas de ácido úrico sofreram alguma alteração durante o período de iluminação. Essa mudança pode estar relacionada com a ação do oxigênio singlete.

Em meio aquoso, o espectro se mostrou muito diferenciado, comparado com o do etanol, como verifica-se na figura 46. Aparentemente, parece não ter ocorrido nenhuma mudança considerável, mas ao analisar os valores de absorbância no máximo de absorção da banda característica do ácido úrico, registrada em 291 nm em água, foi notado um decaimento consideravelmente maior que aquele observado em etanol, o que acabou refletindo na possibilidade de cálculo da atividade fotodinâmica (AF) para esse meio, mostrado na Tabela 7.

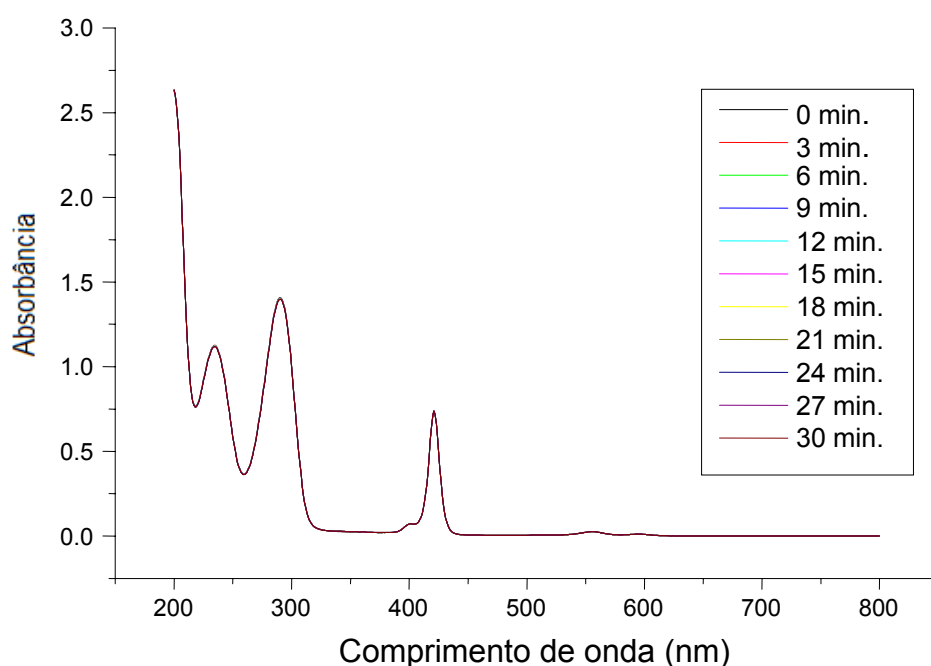


Figura 46 - Espectros de absorção da solução de porfirina ZnTPPS₄ a 10^{-6} mol.L⁻¹ em água, na presença de ácido úrico a 10^{-4} mol.L⁻¹ e sob iluminação com LEDs vermelhos por um período total de 30 minutos

Ao comparar os resultados obtidos para a porfirina ZnTPPS₄ e TMPyP, através dos dados mostrados na Tabela 6 e dos espectros que se seguem percebe-se que a segunda porfirina tem maior eficiência na geração da espécie reativa oxigênio singlete, considerando o mesmo tempo de iluminação. Esse fato pode ser atribuído a excitação mais efetiva dessa porfirina por parte da fonte, que como mostrado na Figura 45, tem sua faixa de emissão entre 640 e 680 nm, região dentro da qual encontra-se o máximo de absorção de pelo menos uma das bandas Q da TMPyP (Figura 47). Logo, se a excitação do FS se dá de forma mais eficiente, também a geração de oxigênio singlete será favorecida.

Tabela 7 – Valores médios de algumas grandezas, obtidas através dos espectros do teste do ácido úrico para as porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄

<i>Porfirina</i>	$\Delta A_{A.U}$ <i>H₂O</i>	$\Delta A_{A.U}$ <i>Etanol</i>	<i>t(s)</i>	<i>AF</i> <i>H₂O</i>	<i>AF</i> <i>Etanol</i>
TMPyP	0,046	0,025	1800	3,09	0,53
ZnTPPS₄	0,016	-----	1800	0,27	-----

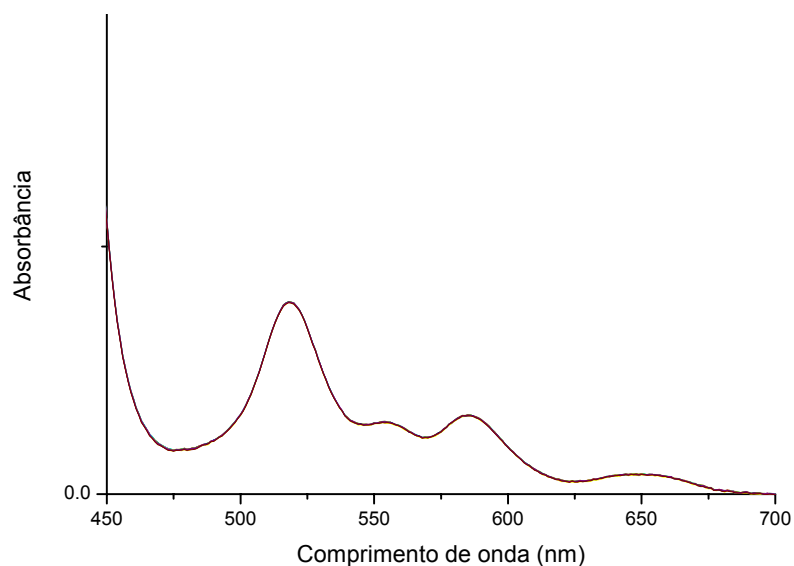


Figura 47 - Espectro de absorção das bandas Q da porfirina TMPyP em água

Em etanol, a porfirina TMPyP demonstrou decaimento em suas bandas de absorção em especial na banda Soret (Figuras 48 e 49), de forma mais pronunciada que para a banda de ácido úrico. Isso demonstra que nesse meio, é possível que parte do oxigênio singlete gerado tenha sido consumido no foto - branqueamento da porfirina, em vez de ter sido capturado pelo ácido úrico, resultando num valor de AF menor que o obtido para o meio aquoso.

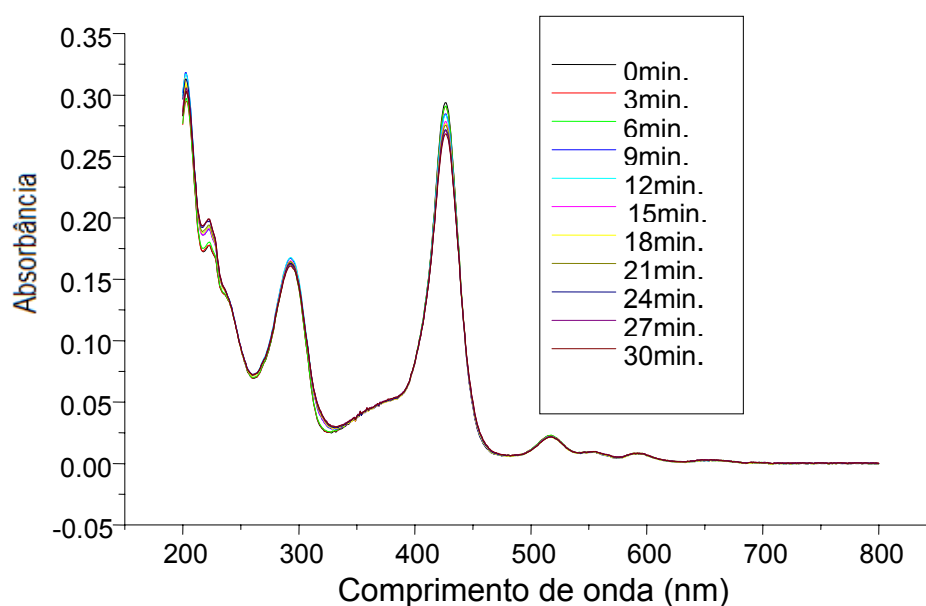


Figura 48 - Espectros de absorção da solução de porfirina TMPyP a 10^{-6} mol.L $^{-1}$ em etanol, na presença de ácido úrico a 10^{-4} mol.L $^{-1}$ e sob iluminação com LEDs vermelhos por um período total de 30 minutos

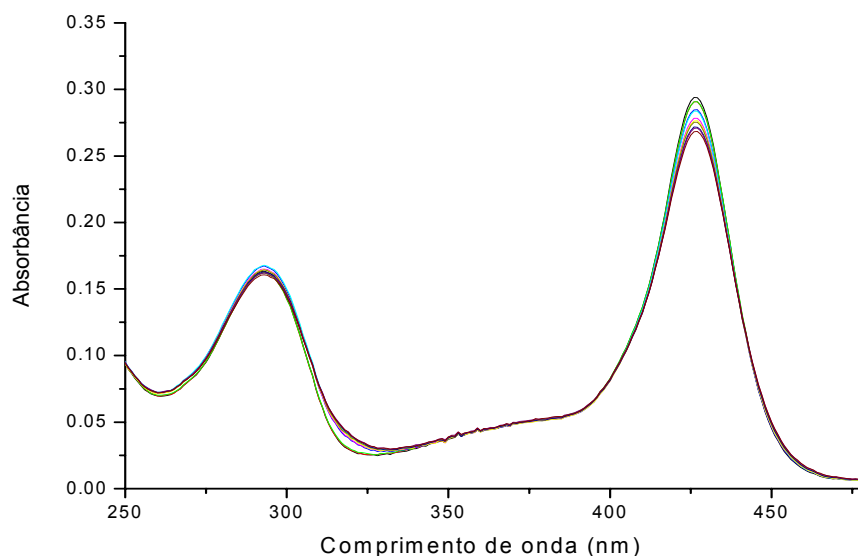


Figura 49 – Espectros de absorção referentes às bandas do ácido úrico com $\lambda_{\max}$ em 293 nm, e da banda Soret da porfirina TMPyP durante o período de iluminação com LEDs vermelhos

Os espectros registrados em água (Figuras 50 e 51), para a TMPyP, demonstram claramente o decaimento da banda do ácido úrico, registrada em 287 nm durante o período de iluminação e reafirmam os valores obtidos para a atividade fotodinâmica (AF) da substância, Tabela 6.

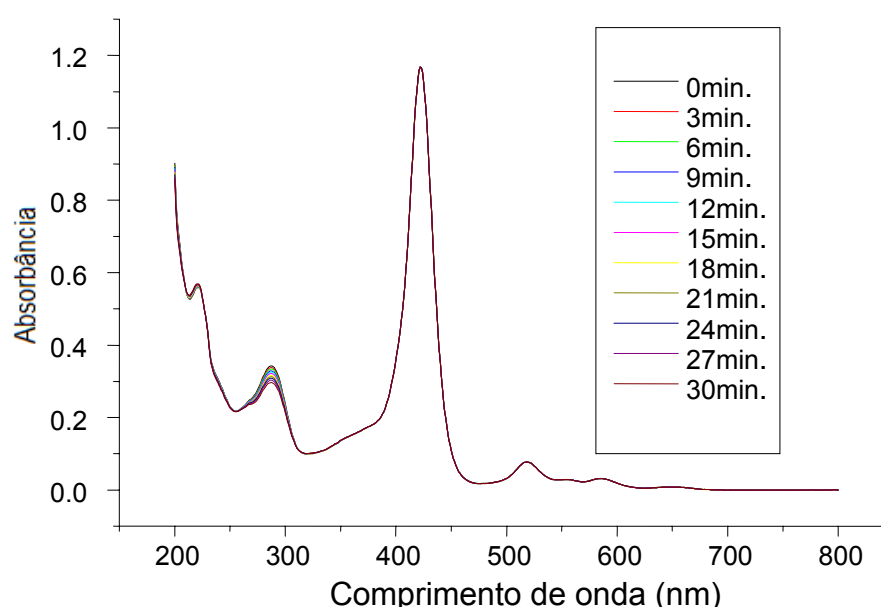


Figura 50 – Espectros de absorção da solução de porfirina TMPyP a 10^{-6} mol.L $^{-1}$ em água, na presença de ácido úrico a 10^{-4} mol.L $^{-1}$ e sob iluminação com LEDs vermelhos por um período total de 30 minutos

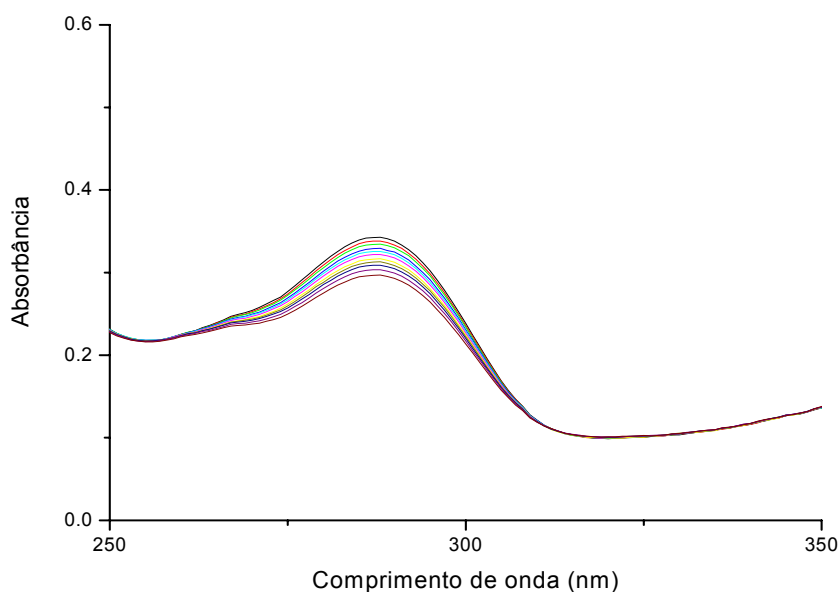


Figura 51 – Espectros de absorção referentes à banda do ácido úrico com λ_{max} em 287 nm, durante o período de iluminação com LEDs vermelhos na presença da porfirina TMPyP

É importante notar que durante todo o período de iluminação não houve decaimento nas bandas de absorção da porfirina, caracterizadas pela banda Soret em 421 nm e pelas bandas Q na região entre 500 e 700 nm. Essa estabilidade é importante, porque mostra que a porfirina não sofreu foto-branqueamento durante a iluminação, mesmo na presença de oxigênio singlete, principal causador desse fenômeno. Assim, é possível afirmar que todo o oxigênio singlete gerado foi capturado pelo ácido úrico, possibilitando um resultado fiel da AF dessa porfirina nessas condições.

Com todos os dados obtidos foi possível verificar que a geração de oxigênio singlete é favorecida em água, para ambas as porfirinas, estando esse fato relacionado à maior concentração de oxigênio molecular nesse meio, comparado ao solvente etanol. Dentre as duas porfirinas e considerando o mesmo meio, pode-se verificar que a TMPyP demonstrou maior capacidade de geração de oxigênio

singlete, provavelmente porque o máximo de absorção de suas bandas Q, encontram-se na faixa de emissão da fonte utilizada.

Estudos semelhantes de geração de oxigênio singlete através do método do ácido úrico em etanol, já foram realizados para a porfirina TMPyP, porém, sob iluminação de laser de diodo com λ_{max} de emissão igual a 661 nm e resultou numa AF de $23,0 \text{ m}^2.\text{J}^{-1}$ (PAVANI et al., 2004). Este valor mostra-se maior que a AF de alguns fotossensibilizadores atualmente empregados na TFD, que foram também foram submetidos ao teste do ácido úrico em tampão fosfato e sob fonte de LEDs com λ_{max} de emissão igual a 630 nm, como mostrado na Tabela 8 (SILVA, 2007).

Tabela 8 – Valores de Atividade Fotodinâmica (AF) determinado pelo teste do ácido úrico, de alguns fotossensibilizadores comerciais (SILVA, 2007)

<i>Fotossensibilizador</i>	<i>AF ($\text{m}^2.\text{J}^{-1}$)</i>
Photodithazine [®]	64 ± 14
Photogem [®]	37 ± 9
Photofrin [®]	9 ± 2
Photosan [®]	4 ± 1

No entanto, embora tenha sido constatado que ambas as porfirinas testadas resultaram em geração de oxigênio singlete de forma razoavelmente significativa, verificou-se que os valores de AF encontrados distanciam-se bastante da AF do azul de metileno, igual a 3,715 em etanol e sob igual condição de iluminação empregada para as porfirinas estudadas (SOARES, 2006). Dessa forma, conclui-se que a fonte de luz utilizada não foi adequada para promover a efetiva excitação das porfirinas e conseqüente geração de oxigênio singlete, importante para a TFD.

4.6 Testes de toxicidade

4.6.1 Teste de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS)

A avaliação da bioatividade de compostos orgânicos, sejam eles provenientes de plantas ou de síntese, são de difícil execução em laboratórios tradicionais de química, devido à ausência de equipamentos adequados para bioensaios. A necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos, levou à busca de novos testes que envolvessem poucos materiais (CAVALCANTE, 2000).

O ensaio de letalidade, onde apenas um parâmetro está envolvido: vida ou morte permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Um dos animais que tem sido utilizado nestes bioensaios é a espécie de crustáceo marinho, *Artemia salina* (CAVALCANTE, 2000; MEYER, 1982).

Os resultados dos testes com a *Artemia salina* em que foram empregadas as porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄, estão mostrados nos gráficos ilustrados nas figuras 52 e 53, que expressam a média dos valores obtidos dos testes em triplicata. As concentrações empregadas de ambas as porfirinas foi de 10, 30 e 50 ppm, implicando em diferentes valores de concentrações em mol.L⁻¹, como mostrado na legenda de cada um dos gráficos. O controle possui apenas *A. salina* em solução salina, sem porfirina e sem exposição à iluminação.

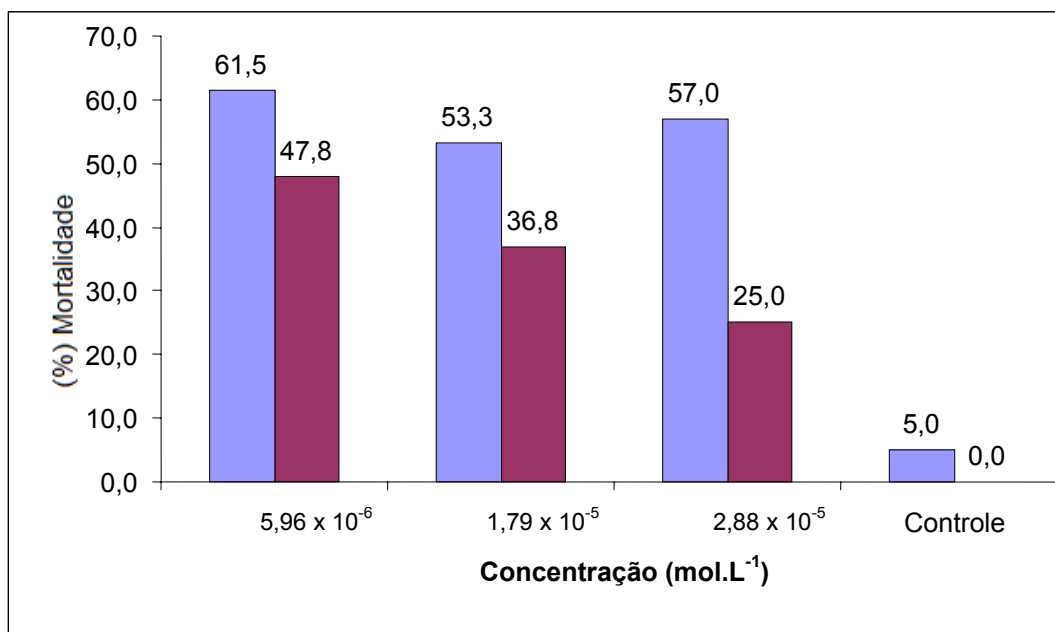


Figura 52 – Toxicidade da porfirim ZnTPPS₄ frente a *Artemia salina* sem iluminação (■) e sob iluminação (■)

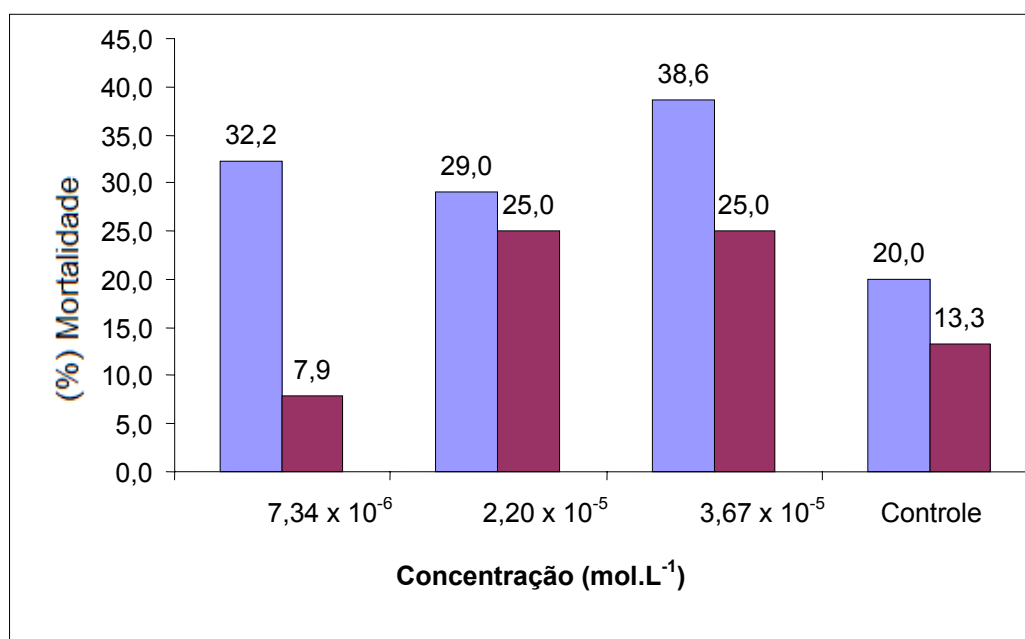


Figura 53 - Toxicidade da porfirim TMPyP frente à *Artemia salina* sem iluminação (■) e sob iluminação (■)

Como mostram os gráficos, ambas as porfirinas mostraram-se capazes de causar a morte dos micro-crustáceos de *Artemia salina*. Embora, os dados não tenham mostrado uma correlação linear com a concentração de porfirim, é notável que a mortalidade foi sempre maior sob iluminação que sem iluminação, o que

sugere que sob a iluminação dos LEDs vermelhos, as porfirinas foram capazes de gerar oxigênio singlete ou outras espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela morte dos microcrustáceos.

Embora a porfirina ZnTPPS₄ tenha mostrado percentuais elevados de mortalidade sobre *A. salina* sob iluminação, em todas as concentrações, essa mortalidade também ocorreu na ausência de luz, em valores superiores aos obtidos para a porfirina TMPyP em todas as concentrações.

Assim, comparando-se as porfirinas sob iluminação e na ausência de iluminação, verifica-se que o melhor resultado obtido nos testes de toxicidade sobre *A. salina*, se deu com a concentração de 10 ppm de TMPyP, onde a mortalidade sob iluminação foi 4,0 vezes maior que sem iluminação, mostrando sua baixa toxicidade no escuro. Os melhores resultados para a TMPyP estão de acordo com a maior capacidade de geração de oxigênio singlete pela mesma, verificado no teste do ácido úrico.

Embora os dados tenham se mostrado positivos quanto a ação citotóxica das porfirinas sobre a *Artemia salina* e indicarem possível atividade antitumoral dessas substâncias, também sugerem que trabalhou-se acima da concentração ideal, uma vez que ao aumentar a concentração os efeitos citotóxicos foram menos expressivos. Dessa forma, os resultados obtidos mostram que deverão ser testadas concentrações menores que 10 ppm em estudos futuros dessas porfirinas.

4.6.2 Ensaio *in vitro*: cultura bacteriana

A importância dos testes microbiológicos na TFD reside no fato de que resultados positivos podem representar uma inovação no tratamento de doenças ocasionadas por organismos patogênicos. Tendo-se em vista que os medicamentos

e as técnicas atualmente empregadas mostram-se ineficientes ou pouco efetivas no combate desses microrganismos, torna-se importante buscar alternativas que apresentem melhores resultados. A capacidade de um FS em causar a morte de microrganismos também pode significar uma potencial atividade antitumoral, devido a algumas semelhanças entre esses organismos e as células tumorais, tal como a rápida proliferação celular.

Sendo a *E. coli* uma bactéria Gram negativa julgou-se interessante conduzir estudos com essa cepa bacteriana a fim de avaliar a atividade fotodinâmica das porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ em fotoinativar microrganismos.

Ao testar a ação inibitória do crescimento de bactérias *E. coli*, pelas porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ escolheu-se a concentração de porfirina referente a 10 ppm, equivalente a $7,34 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $5,96 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ das referidas porfirinas, respectivamente, devido ao fato de os melhores resultados de toxicidade sobre a *Artemia salina* terem se dado sob essa concentração. Assim, a concentração de porfirina foi a mesma em todos os testes conduzidos com a *E. coli*, sendo feita a variação apenas do tempo e do tipo de iluminação empregada (azul e vermelha). Os tempos de iluminação de 1, 2 e 5 minutos foram escolhidos com vistas na aplicabilidade em procedimentos restauradores de tratamentos dentários, já o tempo de 30 minutos foi escolhido por ter sido o tempo total empregado nos testes de geração de oxigênio singlete.

A metodologia utilizada foi adaptada da técnica convencional, de modo a tornar viável a avaliação fotodinâmica das referidas porfirinas utilizando poucos equipamentos. Os resultados confirmaram a ação antimicrobiana de ambas as porfirinas em todos os períodos de iluminação em comparação aos seguintes controles: I) na ausência de porfirina e sob iluminação; II) na presença de porfirina

10 ppm e sem iluminação e III) na ausência de porfirina e de iluminação (controle geral).

Tabela 9 - Número de UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônias - E. coli na presença e na ausência de porfirinas, sob diferentes tempos de iluminação vermelha e azul

	ZnTPPS ₄		TMPyP		Sem porfirina (Controle I)	
	Luz		Luz		Luz	
TEMPO / ILUMINAÇÃO	vermelha	Luz Azul	vermelha	Luz Azul	vermelha	Luz Azul
1	1167 x 10 ³	1627 x 10 ³	1057 x 10 ³	1199 x 10 ³	1435 x 10 ³	1244 x 10 ³
2	1153 x 10 ³	1615 x 10 ³	1572 x 10 ³	714 x 10 ³	1940 x 10 ³	1025 x 10 ³
5	1664 x 10 ³	1700 x 10 ³	1571 x 10 ³	1686 x 10 ³	1832 x 10 ³	888 x 10 ³
30	825 x 10 ³	1725 x 10 ³	803 x 10 ³	1185 x 10 ³	2532 x 10 ³	1698 x 10 ³
Controle II	Incontável (Coalescência)		Incontável (Coalescência)		-----	
Controle III	Incontável (Coalescência)		Incontável (Coalescência)		-----	

Ao submeter os dados mostrados na Tabela 9, ao teste Kruskal-Wallis, verificou-se que na presença de ambas as porfirinas e sob iluminação houve maior inibição no crescimento de bactérias, quando comparado com os controles, demonstrando que o efeito inibitório depende da associação entre porfirina e luz e não a cada fator isoladamente.

Quanto a porfirina ZnTPPS₄, embora esta não apresente os máximos de suas bandas Q na faixa de emissão dos LEDs vermelhos, os melhores resultados atribuídos a ela foram obtidos sob essa fonte de iluminação (Figura 54), e não sob

os LEDs azuis, como poderia se esperar devido a forte absorção da banda Soret, localizada na região do azul.

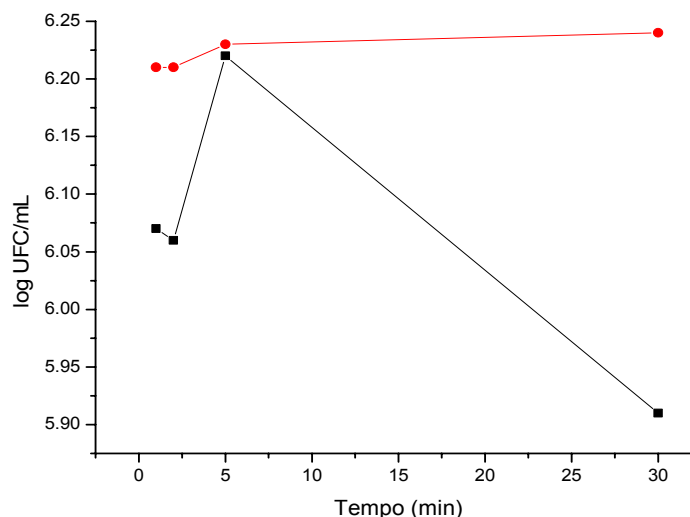


Figura 54 – Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, na presença da porfirina ZnTPPS₄ sob iluminação azul (●) e iluminação vermelha (■)

Assim, ao observar o gráfico, verifica-se que o efeito inibitório foi consideravelmente maior quando as bactérias foram submetidas a luz vermelha em todos os tempos analisados, sendo que o melhor resultado foi observado para o tempo de 30 minutos. Isso indica que sob iluminação de luz vermelha a porfirina gerou uma quantidade maior de espécies reativas, através de mecanismo no tipo I e II, capazes de inviabilizar parte das bactérias presentes no momento da iluminação, tornando menor o número de bactérias aptas a proliferação durante o período de incubação, acarretando num menor número de unidades formadoras de colônias observadas no momento da contagem, como mostrado nas figuras 55 (a) e (b), comparativamente aos controles com porfirina e sem iluminação e com iluminação e sem porfirina, mostrados nas figuras 56 (a) e (b) respectivamente.

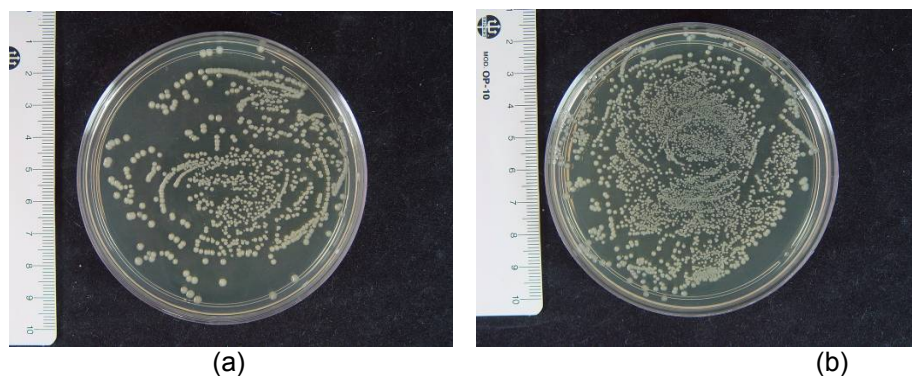


Figura 55 – Unidades formadoras de colônias de *E. coli* na presença da porfirina ZnTPPS₄ (a) sob iluminação de luz vermelha e (b) sob iluminação de luz azul por 30 minutos

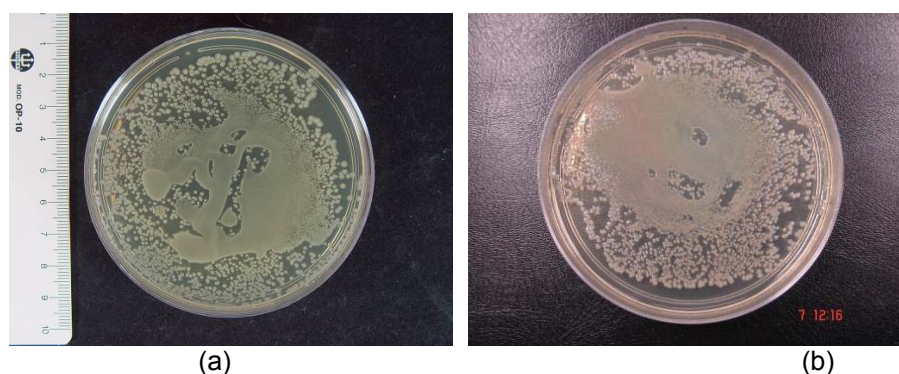


Figura 56 – Unidades formadoras de colônias de *E. coli* (a) na presença da porfirina ZnTPPS₄ sem iluminação (b) sob iluminação de luz vermelha por 30 minutos e sem porfirina

A porfirina TMPyP apresentou melhores resultados frente as bactérias que a porfirina ZnTPPS₄, como já era possível prever, devido sua maior capacidade de geração de oxigênio singlete sob a iluminação dos LEDs vermelhos e em meio aquoso, como verificado no teste do ácido úrico. É provável que o mecanismo do tipo I, também tenha contribuído para a ação inibitória dessa porfirina sobre as bactérias, já que esse mecanismo tem considerável atividade em sistemas biológicos.

Embora tenha havido discrepância nos valores de UFC/mL observados nos diferentes tempos (Figura 57), é possível notar que a maior inibição do crescimento bacteriano também ocorreu sob iluminação vermelha e no tempo de 30 minutos, embora a diferença entre o efeito da iluminação tenha sido menos acentuado que o

verificado para a porfirina ZnTPPS₄. Dessa forma observou-se que as melhores condições de tempo e iluminação ocorrem em 30 minutos e sob luz vermelha.

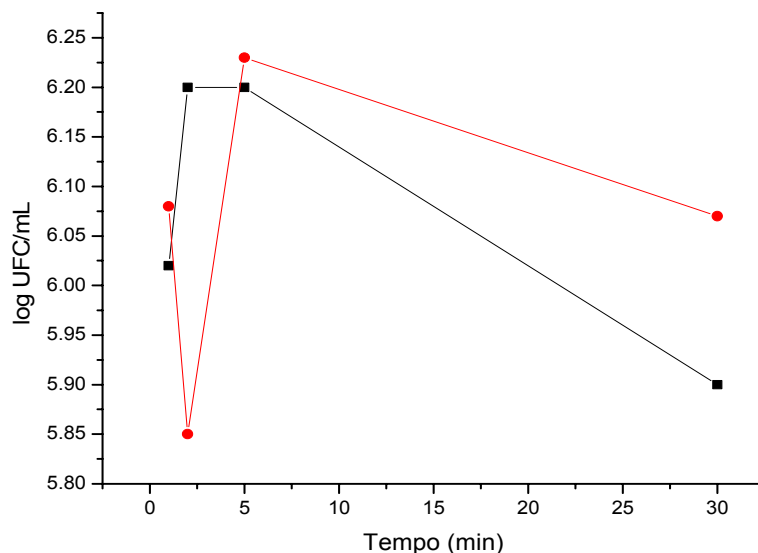


Figura 57 – Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, na presença da porfirina TMPyP sob iluminação azul (●) e iluminação vermelha (■)

O efeito inibitório da porfirina TMPyP sob iluminação pode ser confirmado ao analisar as imagens mostradas nas figuras 58 (a) e (b), observando-se que o efeito das diferentes iluminações é semelhante. Observa-se também que nos controles, onde as bactérias foram submetidas separadamente a porfirina e a iluminação, figuras 59 (a) e (b) respectivamente, houve grande proliferação desses microrganismos, o que indica que a inviabilização bacteriana só acontece quando há a associação porfirina e luz, atendendo ao princípio da TFD.

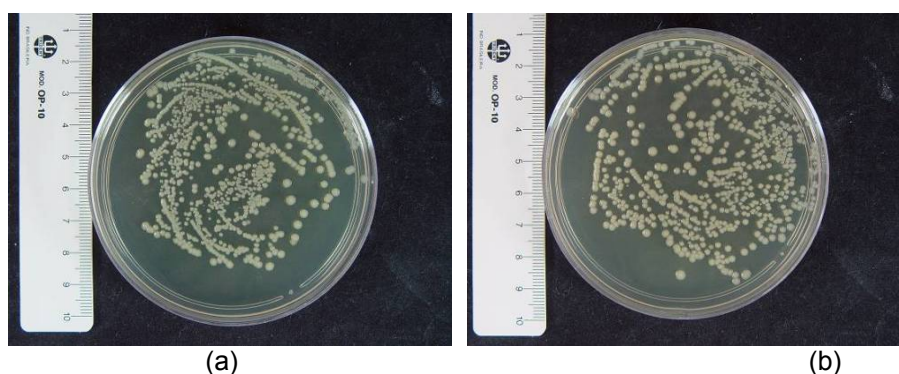


Figura 58 – Unidades formadoras de colônias de *E. coli* na presença da porfirina TMPyP (a) sob iluminação de luz vermelha e (b) sob iluminação de luz azul por 30 minutos

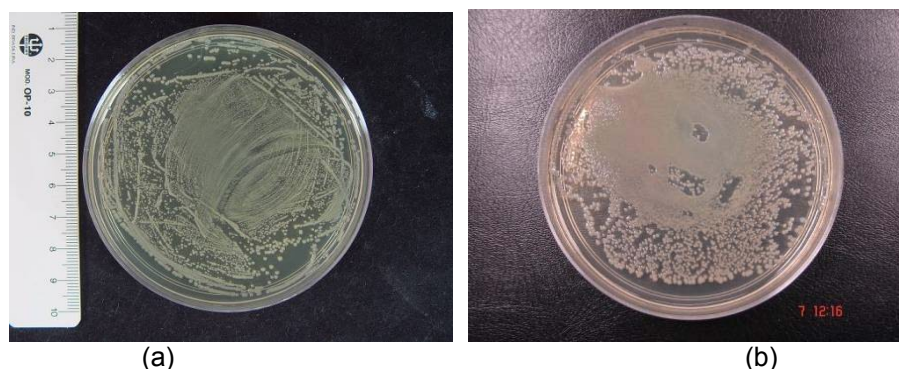


Figura 59 – Unidades formadoras de colônias de *E. coli* (a) na presença da porfirina TMPyP sem iluminação (b) sob iluminação de luz vermelha por 30 minutos e sem porfirina

Ao analisar os dados referentes ao controle I (Figura 60), experimento realizado sem porfirina e com iluminação, verifica-se resultados diferentes dos observados na presença das porfirinas, tendo ocorrido maior inibição de crescimento ao submeter as bactérias a iluminação azul.

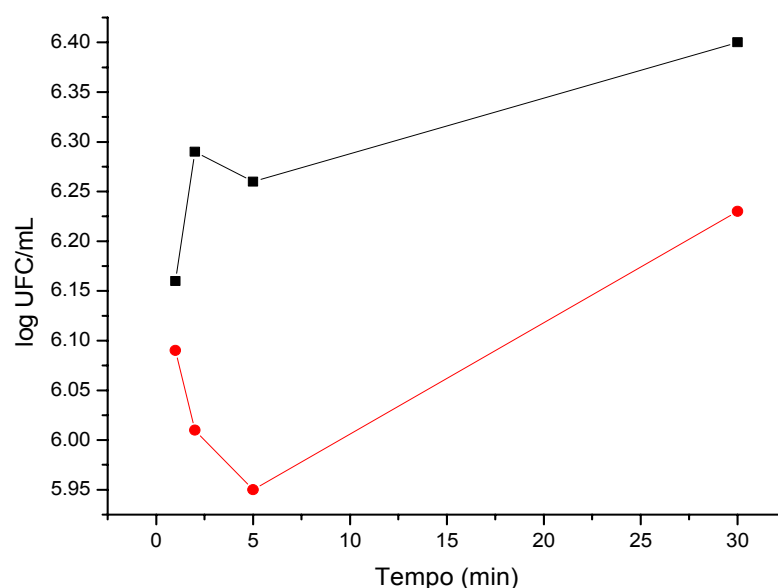


Figura 60 – Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, sem porfirina sob iluminação azul (●) e iluminação vermelha (■)

No controle III, sem porfirina e sem iluminação (Figura 61), assim como no controle II, na presença apenas de porfirinas e sem iluminação, não foi possível

fazer contagem devido a grande proliferação de unidades formadoras de colônias, tendo sido classificadas como incontáveis.

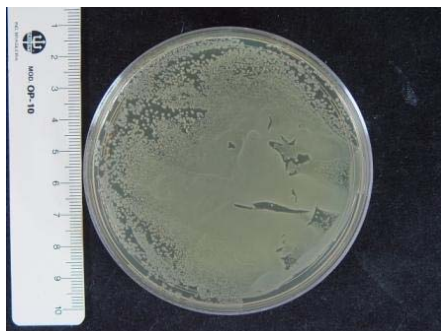


Figura 61 – Unidades formadoras de colônias de *E. coli* sem porfirina e sem iluminação

Assim, pode-se verificar que ambas as porfirinas apresentam capacidade de inibir a proliferação de unidades formadoras de colônias de *E. coli*, mostrando-se promissoras na aplicação fotodinâmica contra doenças infecciosas superficiais – onde a incidência de luz é facilitada – causadas por microrganismos.

Como as bactérias apresentam rápida proliferação assemelhando-se aos tecidos neoplásicos, é possível sugerir que substâncias que demonstram atividade de letalidade sobre esses microrganismos, podem ter atividade similar sobre células do tecido canceroso, o que leva a propor que as porfirinas ZnTPPS₄ e TMPyP são potenciais fotossensibilizadores a serem empregados na TFD.

5 CONCLUSÕES

No estudo do comportamento espectral da porfirina ZnTPPS₄ sob variação de pH, verificou-se a formação de uma nova espécie a pHs próximos de 2,0 em água, acetato/fosfato e na presença de SDS, evidenciada por um novo pico em 434 nm. A força iônica das soluções influenciou nos valores de pK. A nova espécie formada deve tratar-se da porfirina original desmetalada e posteriormente protonada.

Na presença dos surfactantes CTAB e HPS não foram observadas as mesmas modificações espectrais, o que mostra que a porfirina foi protegida das alterações de pH, pelas micelas dos surfactantes, devido a interações de natureza eletrostática e/ou hidrofóbicas entre porfirina/micela. Isso mostra que os efeitos eletrostáticos podem favorecer o encapsulamento das porfirinas, bem como, indica que as mesmas são capazes de interagir com membranas celulares.

O fenômeno de agregação das porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ foi avaliado em misturas H₂O/etanol e não mostrou-se conclusivo, visto que os deslocamentos hipsocrômicos e a diminuição de absorbância registrados em 100% H₂O pode estar relacionado apenas a diferença entre os valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) das porfirinas nos referidos solventes.

A geração de oxigênio singlete pelas porfirinas ZnTPPS₄ e TMPyP foi avaliada através do teste do ácido úrico, onde pode-se verificar que em água a geração dessa espécie é maior que em etanol. Observou-se ainda que sob a iluminação dos LEDs vermelhos empregados a porfirina TMPyP mostrou melhores resultados de geração da espécie reativa ¹O₂ que a porfirina ZnTPPS₄, isto pode estar relacionado com os máximos de absorção das bandas Q, que para a ZnTPPS₄ estão fora da faixa de emissão dos LEDs (640 a 680 nm).

Quanto ao foto-branqueamento analisado em água e etanol, observou-se que as porfirinas são bastante estáveis sob a iluminação dos LEDs vermelhos por períodos relativamente longos em ambos os solventes. Porém, a porfirina TMPyP mostrou uma pequena diminuição de absorbância em ambos os solventes, o que indica que parte do $^1\text{O}_2$ por ela gerado, leva a reações de decomposição da porfirina.

Nos estudos de toxicidade frente a *A. salina*, ambas as porfirinas mostraram letalidade, sendo que notavelmente o maior índice de mortalidade desses microcrustáceos ocorreu na presença de luz. Os resultados não tiveram relação linear com a concentração e o melhor resultado foi obtido com a porfirina TMPyP a $7,34 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ onde a mortalidade sob iluminação foi 4,0 vezes maior que na ausência de luz.

Em relação ao testes *in vitro* feitos com a bactéria *Escherichia coli*, verificou-se que ao associar porfirina e luz há maior inibição do crescimento bacteriano, quando comparado com o controle geral sem iluminação e sem porfirina e com os controles em que as bactérias foram submetidas à luz e a porfirinas separadamente. Os melhores resultados foram obtidos sob iluminação de LEDs vermelhos, principalmente na presença da porfirina TMPyP com 30 minutos de iluminação e há possibilidade da inibição do crescimento bacteriano ter sido ocasionada por mecanismo fotodinâmicos do tipo I e do tipo II.

6 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Tendo-se em vista futuras publicações e o aperfeiçoamento do trabalho realizado com as porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄, pretende-se dar continuidade aos estudos com essas porfirinas da seguinte forma:

- Analisando suas capacidades de agregação sob diferentes concentrações;
- Repetindo o ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina*, com concentrações inferiores a $7,34 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, buscando assim determinar a concentração mais eficiente capaz de causar letalidade sobre esse microcrustáceo.
- Testando a ação fotodinâmica das porfirinas com outros microrganismos.

Estudos espectroscópicos e testes de toxicidade vêm sendo desenvolvidos com a porfirina base livre catiônica TBzPyP, e deverão ter continuidade a fim de comparar a potencialidade fotodinâmica desta porfirina em relação as demais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHKENAZI, H; PECHATNIKOV, I; NITZAN, Y. Low-intensity Photosensitization May Enhance RecA production. **Current Microbiology**, v.52, n.4, p. 317-323, 2006.

ALI,H; VAN LIER, J.E. Metal Complexes as Photo and Radiosensitizers. **Chemical Reviews**, v.99, n.9, p.2379 – 2444, 1999.

BARBOSA, T.P; JÚNIOR, C.G.L; SILVA, F.P.L; SOUSA, S.C.R; VASCONCELOS, M.L.A.A. Síntese e Avaliação da Atividade Tóxica em *Artemia salina* Leach de Adutos de Morita-Baylis Hillman. In: SBQ 2006 – Química é Energia – Transforme a Vida e Preserve o Ambiente. Águas de Lindóia. **Anais do 29º SBQ**. Águas de Lindóia, 2006.

BECHARA, E.J.H. **Sobre Química, Fototerapia e Vampiros**. Informativo CRQ- IV. Edição nov/dez. 2004.

BEGA, P.C. **Síntese e Caracterização da Nova Porfirina meso- Tetrakis (4-butóxi-3 metóxfenil) Porfirina e seus Derivados Metalados**. 2007, 75 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BONACIN. J. A. et. al. Utilização de Extrato de Beterraba e um Conjunto de LEDs para Medir Rendimento Quântico de Oxigênio Singlete em Água. In: PDT 2007 – Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos, Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde. São Pedro. **Anais do II Workshop PDT 2007**. São Pedro: 2007. p. 200-201.

BORGES, C. P. F. **Estudos Espectroscópicos da Interação de Derivados de Dipiridamol com Sistemas Biofísicos**. 1994. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos – USP, São Carlos, 1994.

BORISSEVITCH, I. SCHABERLE. **Fotoquimioterapia – Um Método de Tratamento de Doenças Graves**. Princípios Básicos. Disponível em: <http://www.dfm.ffc.bp.usp.br> Acesso em 20 abr. 2006.

BORISSEVITCH, I.E.; GANDINI, S.C.M. Photophysical Studies of Excited State Characteristics of meso- tetrakis (4- N- methyl- pyridiniumyl porphyrin bound to DNA. **Journal Photochemistry and Photobiology**. v.43, n.2, p. 112- 120, 1998.

BRADY, C. et al. Novel porphyrin-incorporated hydrogels for photoactive intraocular lens biomaterials. **The Journal of Physical Chemistry**, v.111, n. 3, p.527- 534, 2007.

CALZAVARA-PINTON, P.G; VENTURINI, M; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Photochemistry and photobiology. **Journal European academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, p. 293 - 302, 2007a.

CALZAVARA-PINTON, P.G; VENTURINI, M; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results. **Journal European academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, p. 439-451, 2007b.

CANELLAKIS, E.S.; COHEN, P.P. A Comparative Study of the Products of Uric Acid Oxidation for Peroxidades. **Journal Biology and Chemistry**, v. 213, n.1, p. 379, 1955.

CAVALCANTE, M.F. et al. Síntese de 1,3,5 triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 20 – 22, 2000.

CHARLESWORTH, P.; TRUSCOTT, T.G.; KESSEL, D.; MEDFORTH, C.J.; SMITH, K.M. Photophysical Properties of Substituted Porphyrins. **J. Chem. Soc. Faraday Trans**, v.90, n.8, p.1073.1994.

CHAVANTES, M. C. Aplicações Médicas. In: PDT 2007 – Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde. São Pedro. **Anais do II Workshop PDT 2007**. São Pedro: 2007. p. 12-13.

DAL SANTOS, M.A; BORGES, C.P.F. Estudo Espectroscópico por Absorção Ótica de Porfirinas Áquo-solúveis. In: VII Semana de Química da UEPG, 1999, Ponta Grossa. **Resumos dos Trabalhos de Iniciação Científica apresentados na VII Semana de Química**. p. 19.

DIVON, M.S; NITZAN, Y; MALIK, Z. Mechanistic Aspects of Escherichia coli Photodynamic Inactivation by Cationic tetra-meso(N-methylpyridyl)porphine. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.3, p. 423-429, 2004.

DOU, K; SUN, X; WANG, X; PARKILL, R; GUO, Y; KNOBBE, E.T. Optical Limiting and Nonlinear Absorption of Excited States in Metalloporphyrin Doped Sol Gels. **Journal of Quantum Electronics**, v.35, n.7, p. 1004-1014, 1999.

DOUGHERTY, T.J. Photodynamic Therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.58; n. 6, p. 895, 1993.

GABRIELLI, D. S. TARDIVO, J.P; SEVERINO, D; BAPTISTA, M.S. Morte Celular Fotoinduzida. In: PDT 2007 – Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde. São Pedro. **Anais do II Workshop PDT 2007**. São Pedro: 2007. p. 10-11.

GANDINI, S.C.M; YUSHMANOV, V.E; TABAK.M. Interaction of Fe(III)- and Zn(II)-tetra- (4-sulfonatophenyl)porphyrins with Ionic and Nonionic Surfactants: Aggregation and Binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 85, p. 263-277, 2001.

GANDINI. S.C.M; ITRI, R; NETO, D.S; TABAK, M. Porphyrin Effects on Zwitterionic HPS Micelles as Investigated by Small – Angle X – ray Scattering (SAXS) and Electron Paramagnetic Ressonance (EPR). **Journal of Physical Chemistry**, v. 109, n. 47, p. 264-272. 2005.

GARCIA, H.O. **Porfirinas solubles em água: síntesis, homoasociación y propiedades fotofísicas de porfirinas sulfonadas 5,15 difenilsubstituídas**. 2003. 238 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universitat de Barcelona, Barcelona, 2003

HALMA, M. **Síntese e Caracterização de Ferroporfirinas Imobilizadas em Hidróxidos Duplos Lamelares: Estudo de Diferentes Estratégias de Imobilização e Investigação da Atividade Catalítica**. 2004. 75p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HALMA, M; CASTRO, K.A.D.F; GUEHO, C.T; PRÉVOT, V; FORANO,C; WYPYCH,F; NAKAGAKI, S. Synthesis, Characterization and Catalytic Activity of Anionic Iron (III) Porphyrins Intercalated into Layered Double Hydroxides. **Journal of Catalysis**, v. 257, n.2, p. 233-243, 2008.

HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica no Combate a Microorganismo. In: PDT 2007 – Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde. São Pedro. **Anais do II Workshop PDT 2007**. São Pedro: 2007. p. 20-21.

HOPPER, C. Photodynamic Therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. **Lancet Oncology**. v.1, p. 212-215, 2000.

HUNTER, C.A. SANDERS, K. M. Dabco- metalloporphyrin Binding: Ternary Complexes, host-guest Chemistry and the Measurement of pi-pi interactions. **J. American Chemical Society**, v. 112, n.15, 5773-5780. 1990.

JEFFERY, G.H. et.al. **Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis**. 5ª ed. Tradução de Horácio Macedo. Rio de Janeiro: LTC, 1989. p. 523-526.

KADISH, K.M. MAIYA, G.B; ARAULLO, C; GUILARD, R. Micellar Effects on the Aggregation of Tetraanionic Porphyrins. Spectroscopic Characterization of Free-Base meso- Tetrakis- (4-sulfonatophenyl) Porphyrin (TPPS)H₂ and (TPPS)M (M= Zn(II); Cu(II), VO₂⁺) in Aqueous Micellar Media. **J. Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 14, p. 2725-2731, 1989.

KEIKO, K. TAMAGAKE, K; KATSU, T. The Influence of Aggregation of Porphyrins on the Efficiency of Photogeneration of Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution. **Journal Chemistry Pharmaceutics**, v. 54, n.7, p.1004-1009, 2006.

KOLAROVA, H. MACECEK, J; Nevrelva, P; Huf, M; Tomecka M; Bajgar, R; Mosinger, J; Strnad, M. Photodynamic Therapy with Zinc-tetra(p-sulfonatophenyl)porphyrin bound cyclodextrin induces single strand breaks of cellular DNA in G361 melanoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 19, n.7, p. 971- 974, 2005.

KOWALSKI, L.P. I Seminário –**Aspectos Técnicos e éticos da Incorporação de Novas Tecnologias em Câncer de Cabeça e Pescoço**. Terapia Fotodinâmica. Disponível em: <http://www.sbccc.org.br> Acesso em 08. jun. 2008.

LEHNINGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução de Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 2. ed. São Paulo. Sarvier. 2000. p. 529.

LHULLIER, C. HORTA, P.A; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.2, p.158 – 163. 2006.

MACHADO, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p.236-243. 2000.

MACHADO, G.S; CASTRO, K.A.D.F, WYPYCH, P; NAKAGAKI, S. Immobilization on of Metalloporphyrins into Nanotubes of Natural Halloysite toward Selective Catalysts for Oxidation Reactions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 283, n.12, p. 99-107, 2008.

MAESTRIN, A.P.J; TEDESCO, A.C; NERI, C.R; GANDINI, M.E.F; SERRA, O.A; IAMAMOTO, Y. Synthesis, Spectroscopy and Photosensitizing Properties of Hydroxynitrophenylporphyrins. **J. Braz. Chem. Soc.**,v.15, n.5, p. 708-713. 2004.

MARZZOCO, A; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. 2.ed. Rio de Janeiro. Guanabara. 1999. p.138.

MENEZES, P. F. C. **Estudos Espectroscópicos e Citotóxicos do Photogem® Fotodegradado e dos Fotoprodutos Formados pela Irradiação com Laser**. 2006, 182 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos – USP, São Carlos, 2006.

MENDES, F.M. **Avaliação do uso de Corantes Fluorescentes Associados ao DIAGNOdent para Detecção de Perda Mineral Decorrente da Cárie Dentária**. 2005, 156 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia da USP – USP, São Paulo, 2005.

MERCK. **Tabela Periódica Interativa**. Disponível em <[http:// www.merck.com.br](http://www.merck.com.br)> . Acesso em 08 set. 2007.

MEYER, B.N. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MITA, H; OHYAMA,T; TANAKA, Y; YAMAMOTO, Y. Formation of a complex of 5,10,15, 20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-quadruplex DNA. **Biochemistry**, v.45, n.22, p.6765-6772, 2006.

MOREIRA, G.M.L. **Estudo Espectroscópico da Interação da Porfirina MnTPPS₄ com Sistemas Biofísicos Modelo**. 2005. 18 p. Relatório final de pesquisa. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2005.

MOSINGER, J. JANOSKOVA, M; LANG,K; KUBAT,P. Light-induced Aggregation of Cationic Porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 181, n. 2, p. 283-289, 2006.

MUSSI, L. **Eficiência Fotodinâmica das Protoporfirinas IX de Magnésio e Zinco**. 2003, 90 f. **Dissertação** (Mestrado em Química) – Instituto de Química UNICAMP, Campinas, 2003.

NELSON, D.L, COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Tradução de Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 3. ed. São Paulo. Sarvier. 2002. p. 160.

NEVRELOVA, P; KOLAROVA, H; BAJGAR,R; MACECEK, J; TOMECKA,M; TOMANKOVA, K; STRNAD,M. Measurement of Reactive Oxygen Species After Photodynamic Therapy in Vitro. **Scripta Médica**, v. 78, n. 5, p. 281-290, 2005.

NIERO, R. BENASSI, J.C; FILHO, V.C; PEDROSA, R.C; YUNES, R.A. **Estudos da cito toxicidade em diferentes extratos de *Rubus imperialis* (Rosaceae), biomonitorado sobre *Artemia salina***. Disponível em: < <http://www.s bq.org.br>> Acesso em 03 out. 2006.

NITZAN, Y; ASHKENAZI, H. Photoinactivation of Acinetobacter baumannii and Escherichia coli B by a Cationic Hydrophilic Porphyrin a Various Light. **Journal Current Microbiology**, v.42, n.6, p.408 – 414, 2001

NUÑEZ, S. C. et. al. PDT Antimicrobiana em Odontologia: Mecanismos e Aplicações. In: PDT 2007 – Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde. São Pedro. **Anais do II Workshop PDT 2007**. São Pedro: 2007. p. 17-18.

PAVANI, C; LUZ, O.O; NERI, C.R; MAESTRIN, A.P.J; IAMAMOTO Y; SERRA, O.A. Determinação da Atividade Fotodinâmica de Porfirinas: Avaliação Indireta da Formação de Oxigênio Singlete. In: 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química. Salvador. **Anais da 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química**. Salvador: 2004. p. 8.

PELEZAR Jr., J. M. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p.

PEREIRA, M.R.C. **Fotofísica de Porfirinas e Ftalocianinas em Matrizes de TiO₂, preparadas pelo método Sol-Gel**. 2004, 217 f. Tese (Doutoramento em Ciências) – Universidade do Minho, Braga, 2004.

PERUSSI, J.R. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n.4, p.988-994, 2007.

PHOTOFRIN **Porfimer Sodium for Injection**. Disponível em <[http:// www.photofrin.com](http://www.photofrin.com)>. Acesso em 02 out. 2008.

RIBEIRO, J. N. **Avaliação da Atividade Fotodinâmica de Porfirinas para Uso em Terapia Fotodinâmica**. 2005, 108 f. Tese (Doutorado em Química) – UNICAMP, Campinas, 2005.

RONSEIN, G.E. et al. Oxidação de Proteínas por Oxigênio Singlete: Mecanismos de Dano, Estratégias para Detecção e Implicações Biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

SETÚBAL, C. A. **Procura por Novos Fotossensibilizadores para Terapia Fotodinâmica**. 2007, 111 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SILVA, A.R. **Análise das Propriedades Fotossensibilizantes do In (III)-mesotetrafenilporfirina para Uso em Terapia Fotodinâmica**. 2003, 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

SILVA, R.C. **Avaliação da Eficiência Fotodinâmica de Fotossensibilizadores com Aplicação e Terapia Fotodinâmica**. 2007, 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SIMPLÍCIO, F.I.;MAIONCHI,F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológico e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n.5, p. 801-807. 2002.

SIQUEIRA, J.M. et al. Estudo Fitoquímico de *Unoposis lindmani* – Annonaceae-biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* LEACH. **Química Nova**, v. 21, n.5, p. 557-559. 1998.

SOARES, D.; AZZELLINI, G. C. Estudo de um Sistema pH Dependente de Liberação de Fotossensibilizadores: Interação da Porphirina ZnTPPS₄ com Quitosana em Solução Aquosa. In: PDT 2007 – Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos,

Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde. São Pedro. **Anais do II Workshop PDT 2007**. São Pedro: 2007. p. 37-38.

SOARES, D. **Estudo da Interação entre Porfirina e Eumelanina Sintética**. 2005. 120p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Paulo, 2005.

SOARES, R.R.S. **Estudo de Propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando Terapia Fotodinâmica**. 2006. 78p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SOLIS, P.N. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Planta Med**, v. 59, p. 250-252, 1993.

STERNBERG, E.D; DOLPHIN, D. Porphyrin – based Photosensitizers for use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, v.54, n.17, p.4151-4202. 1998.

TESSARO, A.L. **O Efeito de pH na Estabilidade de Derivados Benzoporfirínicos de Anel B em meio água/etanol**. 2005, 57 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

TOMINAGA, T.T. **Estudos Espectroscópicos de Porfirinas Áquo-solúveis em Função do pH e da Interação com albumina de Soro Bovino**. Tese Doutorado em Química) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

TOMINAGA, T.T; SILVA, SOARES, D; SILVA, J.C.Z; DAL SANTOS, M.A; BORGES, C.P.F. Estudos Espectroscópicos da Porfirina Catiônica Meso-tetrakis- (N-metil-4-piridil) (TMPyP) em presença de Micelas Iônicas de CTAB, SDS e HPS. **Publicatio UEPP**, Ciências Exatas e da Terra. v. 10, n.2, p.7-14. 2004.

TRABULSI, L.R; ALTHERNUM, F. **Microbiologia**. 4ª ed. Atheneu. São Paulo, 2005. p. 277- 306.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98. 2006.

WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E.L. **Principles of Biochemistry**. New York. Academic Press, 1968.

ZANCANELA, D. C. Atividade Fotobactericida do Azul de Metileno e Ftalocianina de Zinco Frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. In: PDT 2007 – Terapia Fotodinâmica: Integração dos aspectos, Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde. São Pedro. **Anais do II Workshop PDT 2007**. São Pedro: 2007. p. 176-177.

ZEBGER, I. et al. Direct Optical Detection of Singlet Oxygen from a Single Cell. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n.5, p. 319-322, 2004.