

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

JEANINE DOMARESKI DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E ENSAIOS QUÍMICO – BIOLÓGICOS
DE $H_2(TNBPyP)$ E $Zn(TPPS_4)$ VISANDO UTILIZAÇÃO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA

PONTA GROSSA
2009

JEANINE DOMARESKI DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E ENSAIOS QUÍMICO – BIOLÓGICOS
DE $H_2(TNBPpP)$ E $Zn(TPPS_4)$ VISANDO UTILIZAÇÃO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Química Aplicada na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Área de concentração
Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Christiane P. F. Borges

Ponta Grossa
2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

S586c Silva, Jeanine Domareski da
Caracterização espectroscópica e ensaios químico-biológicos de H₂TNBP₄P e ZnTPPS₄, visando utilização em terapia fotodinâmica / Jeanine Domareski da Silva. Ponta Grossa, 2009 122f.
Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa .
Orientadora: Profa. Dra. Christiane P. F. Borges

1. Terapia fotodinâmica. 2. H₂TNBP₄P. 3. ZnTPPS₄.
4. LED. 5. *Artemia salina*. 6. *Staphylococcus aureus*.
I. Borges, Christiane P. F. II. T

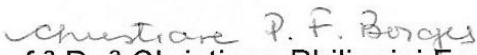
CDD: 535.84

TERMO DE APROVAÇÃO

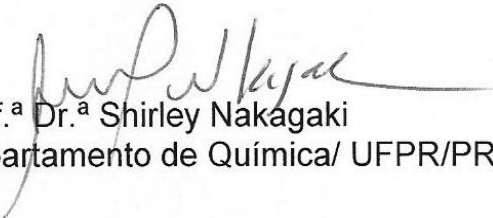
JEANINE DOMARESKI DA SILVA

“CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E ENSAIOS QUÍMICO-BIOLÓGICOS DE H_2 TNBP y P E ZnTPPS $_4$ VISANDO UTILIZAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação 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.^a Dr.^a Mariza Boscacci Marques
Departamento de Química/UEPG/PR


Prof.^a Dr.^a Shirley Nakagaki
Departamento de Química/ UFPR/PR

Ponta Grossa, 18 de dezembro de 2009.

Dedico à Deus,
é dele a vitória alcançada em minha vida.
Ao meu marido, Ademir, pela ajuda e apoio.
À minha mãe, pelo amor, e meu pai, Argemiro, (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela força, pela infinita misericórdia, pois sei, que tudo posso naquele que me fortalece.

À você Ademir, meu marido, que é tudo para mim, eu agradeço pelo amor, pela força, ajuda e paciência.

À minha orientadora, Dr^a. Christiane P. F. Borges, exemplo de dedicação, seriedade e paciência. Sei quanto foi compreensiva em vários momentos, obrigada.

À minha família que, sempre esteve presente me apoiando, especialmente minha mãe, Estefânia, pelas orações e bênçãos, e também meus irmãos e sobrinhas. Enfim, agradeço a toda família.

As amigas, Ariana Rodrigues Antonangelo, Marilei Mendes e Juliane Nadal imprescindíveis nas etapas de realização de experimentos, obrigada de coração.

À Professora Elisabete Brasil, pela ajuda muito valiosa e disponibilização do laboratório.

Ao Professor Fábio André Santos, pela ajuda e auxílio na realização do trabalho.

A Professora Shirley Nakagaki por ter fornecido a porfirina Zn(TPPS₄).

RESUMO

A investigação de propriedades de porfirinas e derivados é de grande importância, visto que estes possuem inúmeras aplicações, sendo uma delas o uso como fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica (TFD). Neste trabalho estudou-se a porfirina base livre, catiônica, brometo de 5, 10, 15, 20 – tetrakis (*N*-4-nitrobenzil-4-piridil) porfirina, $H_2(TNBPYP)$, e a metaloporfirina, sal de sódio de 5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-sulfonatofenil) porfirina zinco(II), $Zn(TPPS_4)$, para de avaliar a possível aplicação em TFD. Através da análise da absorção molecular UV-Vis, foram investigadas a interação com surfactantes, as reações de fotobranqueamento, a geração de oxigênio singlete e a capacidade de agregação em diferentes proporções água/etanol. A ação fotodinâmica dos compostos estudados foi analisada através de ensaios *in vitro* com microorganismos, foram realizados testes com *Artemia salina* e com a bactéria *Staphylococcus aureus*. Foi utilizado sistema de LEDs de diferentes faixas de emissão (vermelho, laranja e verde) para iluminação das amostras nos testes para avaliação da ação fotodinâmica. Primeiramente, analisou-se o comportamento espectral da porfirina $H_2(TNBPYP)$, com a variação do pH em meio aquoso e em acetato/fosfato e na presença dos surfactantes HPS (zwitteriônico), SDS (aniônico) e CTAB (catiônico). Observou-se que a porfirina é estável numa ampla faixa de pH nos vários sistemas estudados. O comportamento espectral da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em misturas água/etanol de diferentes proporções indicou que não houve a formação de agregados na faixa de concentração analisada. A análise de fotobranqueamento foi realizada para as duas porfirinas sob iluminação de sistemas de LEDs durante um período total de 1 hora, foi observado que ambas as porfirinas são foto-estáveis nas condições analisadas. Quanto a geração de oxigênio singlete, observada através do teste do ácido úrico, verificou-se que a $H_2(TNBPYP)$ apresentou maior atividade fotodinâmica (AF) que a $Zn(TPPS_4)$. Os resultados dos testes microbiológicos mostraram que o maior índice de mortalidade sobre *A. salina* ocorre na presença da porfirina $H_2(TNBPYP)$ e sob iluminação com LED vermelho, indicando ação fotodinâmica da porfirina. Nos testes com a bactéria *Staphylococcus aureus*, observou-se ação fotodinâmica para as duas porfirinas analisadas e com os dois tipos de LEDs testados, sendo que os melhores resultados de fotoinativação foram obtidos para o tempo de iluminação de 30 min. Assim, os resultados demonstram que as porfirinas testadas tem potencial para serem utilizadas em Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

The investigation of properties of porphyrin derivatives is of great importance, since they have many applications, one being the use as photo sensitizers in photodynamic therapy (PDT). We studied the free base porphyrin, cationic, bromide of 5, 10, 15, 20 - tetrakis (N-4-nitrobenzyl-4-pyridyl) porphyrin, $H_2(TNBPYP)$ and metaporphyrin, sodium salt of 5, 10, 15, 20 - tetrakis (4-sulfonatophenyl) zinc porphyrin (II), $Zn(TPPS_4)$, to evaluate the possible application in PDT. Through analysis of molecular absorption UV-Vis, we investigated the interaction with surfactants, the reactions of photo bleaching, the generation of singlet oxygen and the ability to aggregate in different proportions water/ethanol. The photodynamic action of these compounds was analyzed by *in vitro* tests with microorganisms; tests were carried out with *Artemia saline* and the *Staphylococcus aureus*. The System used was of LEDs of different emission bands (red, orange and green) for illumination of the samples in the tests for the evaluation of the photodynamic action. First, we analyzed the spectral behavior of porphyrin $H_2(TNBPYP)$, with the variation of pH in water and ethyl acetate/phosphate and in the presence of surfactant HPS (Zwitterionic), SDS (anionic) and CTAB (cationic). It was observed that porphyrin is stable in a wide range of pH in the various systems studied. The spectral behavior of porphyrin mixtures $H_2(TNBPYP)$ in water/ethanol in different proportions indicated that there was no clustering in the concentration range examined. Analysis of photo bleaching was performed for the two porphyrins in light of LED systems for the total of 1 hour; it was observed that both porphyrins are photo-stable under the conditions studied. As the generation of singlet oxygen, observed through the test of uric acid, it was found that the $H_2(TNBPYP)$ showed a higher photodynamic activity (PA) than $Zn(TPPS_4)$. The results of microbiological tests showed that the highest mortality rate of *A. saline* occurs in the presence of porphyrin $H_2(TNBPYP)$ and under illumination with red LED, indicating photodynamic action of porphyrin. In tests with the bacterium *Staphylococcus aureus*, we observed the effects of photodynamic action for the two porphyrins examined and the two types of LEDs tested, and the best results were obtained by photo inactivation under lighting time of 30 minutes. Thus, the results show that the porphyrins tested have potential for the use in Photodynamic Therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 —	Estrutura do macrociclo da porfirina de base livre.....	15
Figura 1.2 —	Estruturas básicas das porfirinas (a), das clorinas (b) e bacterioclorinas (c).....	18
Figura 1.3 —	Exemplos de ferroporfirinas de 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a geração.....	19
Figura 1.4 —	Espectro de absorção da porfirina base livre H ₂ (TNBPyP).....	22
Figura 1.5 —	Estrutura da protoporfirina IX de ferro.....	23
Figura 1.6 —	Estrutura molecular da HpD (<i>Photogem</i> ®), FS sistêmico.....	26
Figura 1.7 —	Região do espectro eletromagnético correspondente à janela terapêutica (de 600 a 800 nm).....	27
Figura 1.8 —	Mecanismos (Tipo I e II) de geração de ROS pela combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio no estado fundamental(³ O ₂).....	30
Figura 1.9 —	Fontes, reações e alvos do ¹ O ₂	33
Figura 1.10 —	Fotobranqueamento de um composto porfirínico metalado, na presença de oxigênio singlete.....	41
Figura 1.11 —	Estrutura de uma micela (a) e de uma bicamada lipídica (b).....	45
Figura 1.12 —	Ciclo de vida da <i>Artemia salina</i>	47
Figura 1.13 —	Estrutura do íon 5, 10, 15, 20 – tetrakis (<i>N</i> -4-nitrobenzil-4-piridil)porfirina.....	49
Figura 1.14 —	Estrutura do íon 5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-sulfonatofenil) porfirina zinco (II).....	51
Figura 1.15 —	Absorção e emissão de Zn(TPPS ₄) em matrizes de sol-gel de TiO ₂	52
Figura 3.1 —	Sistema de LEDs utilizado para iluminação das soluções de porfirinas.....	60
Figura 3.2 —	Recipiente utilizado para eclosão dos ovos de <i>Artemia salina</i> ...	63
Figura 4.1 —	Espectro de absorção da porfirina H ₂ (TNBPyP) 6,2x10 ⁻⁵ mol/L em água e espectro expandido da faixa das bandas Q.....	65

Figura 4.2 —	Espectro de absorção da porfirina $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$ $9,2 \times 10^{-5}$ mol/L em água e espectro expandido da faixa das bandas Q.....	66
Figura 4.3 —	Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em água, em função do pH entre 7,0 a 0,5.....	70
Figura 4.4 —	Gráfico de absorbância de porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em solução aquosa em função do pH em (■) 426 nm e (●) 452 nm.....	72
Figura 4.5 —	Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato, em pH's entre 6,0 a 0,5.....	73
Figura 4.6 —	Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato na presença de HPS (20 mmol/L), em pH's entre 6,0 a 0,5.....	75
Figura 4.7 —	Gráfico da absorbância da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato na presença de HPS (20 mmol/L), em função do pH em (■) 430 nm e (●) 450 nm.....	75
Figura 4.8 —	Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato na presença de CTAB (20 mmol/L), em pH's entre 5,81 a 0,5.....	76
Figura 4.9 —	Gráfico da absorbância da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato na presença de CTAB (20 mmol/L), em função do pH em (■) 428 nm e (●) 450 nm.....	77
Figura 4.10—	Espectros de absorção de solução da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato 20 mmol/L na presença de SDS (40 mmol/L), em pH's entre 6,0 a 0,5.....	78
Figura 4. 11—	Gráfico da absorbância da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato na presença de SDS (40 mmol/L), em função do pH em ■ 428 nm e ● 458 nm.....	79
Figura 4.12—	Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em água, em pH's entre 7,0 a 13,5.....	81
Figura 4.13—	Gráfico de absorbância da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em solução aquosa em função do pH nos comprimentos de onda (■) 427 nm e (●) 472 nm.....	82
Figura 4.14—	Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato (20 mmol/L), em pH's entre 6,0 a 13,5.....	83
Figura 4.15—	Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ em acetato-fosfato, na presença de HPS (20 mmol/L) em pH's entre 6,0 a 13,5.....	84

Figura 4.16 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em acetato-fosfato na presença de CTAB (20 mmol/L), em pH's entre 6,0 a 13,5.....	85
Figura 4.17 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em acetato-fosfato na presença de SDS (40 mmol/L), em pH's entre 6,0 a 13,5.....	86
Figura 4.18 – Geometria de agregados.....	89
Figura 4.19 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em diferentes misturas de água e etanol.....	90
Figura 4.20 – Espectro de emissão de LEDs vermelhos.....	92
Figura 4.21 – Espectro de emissão de LEDs laranjas.....	92
Figura 4.22 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ à 10^{-6} mol/L durante o teste de fotobranqueamento em água, num período total de iluminação de 60 min com LEDs vermelhos.....	93
Figura 4.23 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ à 10^{-6} mol/L durante o teste de fotobranqueamento em água, num período total de iluminação de 60 min com LEDs laranjas.....	93
Figura 4.24 – Espectros de absorção da porfirina $Zn(TPPS_4)$ à 10^{-6} mol/L durante o teste de fotobranqueamento em água, num período total de iluminação de 60 min com LEDs laranjas.....	94
Figura 4.25 – Espectros de absorção da porfirina $Zn(TPPS_4)$ à 10^{-6} mol/L durante o teste de fotobranqueamento em água, num período total de iluminação de 60 min com LEDs verdes.....	95
Figura 4.26 – Fotoxidação do ácido úrico via oxigênio singlete.....	96
Figura 4.27 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ à 10^{-6} mol/L em água durante o teste de ácido úrico (10^{-4} mol/L), num período total de iluminação de 30 min com LEDs vermelhos.....	97
Figura 4.28 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ à 10^{-6} mol/L em água durante o teste de ácido úrico (10^{-4} mol/L), num período total de iluminação de 30 min com LEDs verdes.....	97
Figura 4.29 – Espectros de absorção da porfirina $Zn(TPPS_4)$ à 10^{-6} mol/L em água durante o teste de ácido úrico (10^{-4} mol/L), num período total de iluminação de 30 min com LEDs laranjas.....	98
Figura 4.30 – Espectros de absorção da porfirina $Zn(TPPS_4)$ à 10^{-4} mol/L em água durante o teste de ácido úrico (10^{-4} mol/L), num período total de iluminação de 30 min com LEDs verdes	99

Figura 4.31 – Gráfico da mortalidade percentual média de <i>Artemia salina</i> em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina $H_2(TNBP_yP)$ utilizando-se LEDs vermelhos.....	102
Figura 4.32 – Gráfico da mortalidade percentual média de <i>Artemia salina</i> em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina $H_2(TNBP_yP)$ utilizando-se LEDs laranjas.....	102
Figura 4.33 – Gráfico da mortalidade percentual média de <i>Artemia salina</i> em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina $Zn(TPPS_4)$ utilizando-se LEDs vermelhos.....	103
Figura 4.34 – Gráfico da mortalidade percentual média de <i>Artemia salina</i> em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina $Zn(TPPS_4)$ utilizando-se LEDs laranjas.....	104
Figura 4.35 – Gráfico da mortalidade percentual média de <i>Artemia salina</i> em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina $Zn(TPPS_4)$ utilizando-se LEDs verdes.....	104
Figura 4.36 – Unidades formadoras de colônia de <i>S. aureus</i> (a) na presença de porfirina $H_2(TNBP_yP)$ (5×10^{-6} mol/L) e sem iluminação - controle II (b) sob iluminação de luz vermelha por 30 minutos e sem porfirina (controle I).....	107
Figura 4.37 – Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, na presença da porfirina $H_2(TNBP_yP)$ sob (●) iluminação laranja e (■) iluminação vermelha.....	109
Figura 4.38 – Unidades formadoras de colônia de <i>S. aureus</i> na presença de porfirina $H_2(TNBP_yP)$ (5×10^{-6} mol/L) (a) sob iluminação de luz vermelha e (b) sob iluminação de luz laranja por 30 minutos.....	109
Figura 4.39 – Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, na presença da porfirina $Zn(TPPS_4)$ (5×10^{-6} mol/L) sob (●) iluminação laranja e (■) iluminação vermelha.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Mecanismo de atuação dos fotossensibilizadores.....	32
Tabela 2	– Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado excitado singlete ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental triplete $^3\Sigma_g^-$	34
Tabela 3	– Características de um fotossensibilizador ideal.....	37
Tabela 4	– Coeficientes de absortividade molar (ϵ) e máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) das porfirinas Zn(TPPS ₄) e H ₂ (TNBPyP) em água.....	67
Tabela 5	– Valores de pK ₁ da porfirina H ₂ (TNBPyP) nos diferentes meios analisados	79
Tabela 6	– Valores de pK ₂ da porfirina H ₂ (TNBPyP) nos diferentes meios analisados.....	86
Tabela 7	– Valores médios de algumas grandezas, obtidas através dos espectros do teste do AU para as porfirinas H ₂ (TNBPyP) e Zn(TPPS ₄).....	100
Tabela 8	– Número de UFC/mL – Unidades formadoras de colônias – <i>Staphylococcus aureus</i> ($\times 10^2$). Na presença e na ausência de porfirina H ₂ (TNBPyP), sob diferentes tempos de iluminação vermelha e laranja.....	108
Tabela 9	– Número de UFC/mL – Unidades formadoras de colônias – <i>Staphylococcus aureus</i> ($\times 10^2$). Na presença e na ausência de porfirina Zn(TPPS ₄), sob diferentes tempos de iluminação vermelha e laranja.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	infusão de cérebro e coração (do inglês <i>brain heart infusion</i>)
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
CTAC	cloreto de cetiltrimetilamônio
CMC	concentração micelar crítica
DNA	ácido desoxi ribonucléico
EROs	espécies reativas de oxigênio
FS	fotossensibilizador
Fe(TDCPP)Cl	cloreto de 5,10,15, 20 – tetrakis (2,6 – diclorofenil)porfirina ferro (III)
Fe(TPP)Cl	cloreto de 5, 10, 15, 20 – tetrafenilporfirina ferro (III)
Fe(TDCPCl ₈ P)Cl	cloreto de β-octacloro-5,10,15, 20 – tetrakis (2,6 – diclorofenil)porfirina ferro (III)
HDL	lipoproteínas de alta densidade
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HpD	hematoporfirina
HPS	<i>n</i> -hexadecil- <i>N,N</i> , dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LED	díodo emissor de luz (do termo em inglês: <i>light emitting diode</i>)
Log	logaritmo
mL	mililitro
mW	miliwatts
PDI	inativação fotodinâmica (do inglês <i>Photodynamic Inactivation</i>)
pH	potencial hidrogeniônico
PpIX	protoporfirina IX
SDS	dodecil sulfato de sódio
SiO ₂	dióxido de silício
TAS	toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>
TFD	terapia fotodinâmica
TiO ₂	dióxido de titânio
H ₂ (TMPyP)	5, 10, 15, 20-tetrakis(<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina
H ₂ (TNBPYP)	brometo de 5, 10, 15, 20 – tetrakis (<i>N</i> -4-nitrobenzil-4-piridil)porfirina, Br ₄ [H ₂ (TNBPYP)]
UFC	unidade formadora de colônia
UV-Vis	ultravioleta – visível
ZnP	zinco porfirina
Zn(TPPS ₄)	sal de sódio de 5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirina zinco(II), Na ₄ [Zn(TPPS ₄)]

Obs: As cargas das porfirinas e metaloporfirinas serão omitidas no texto para fins de simplificação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Porfirinas.....	16
1.1.1	Classificação.....	18
1.1.2	Características físico-químicas.....	20
1.1.2.1	Estabilidade.....	20
1.1.2.2	Solubilidade.....	21
1.1.2.3	Espectro de absorção.....	21
1.1.3	Aplicações.....	22
1.2	Terapia Fotodinâmica (TFD).....	24
1.2.1	Princípios da técnica de Terapia Fotodinâmica (TFD).....	29
1.2.2	Propriedades do oxigênio singlete.....	33
1.2.3	Administração da Terapia Fotodinâmica (TFD).....	35
1.2.4	Propriedades do Fotossensibilizador (FS).....	36
1.2.5	Limitações da TFD.....	37
1.2.5.1	Agregação dos compostos porfirínicos.....	38
1.2.5.2	Reações de fotobranqueamento.....	40
1.2.6	Inativação Fotodinâmica (PDI) de microorganismos.....	41
1.3	Biomoléculas e micelas.....	44
1.4	Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	47
1.5	Porfirinas H ₂ (TNBPyP) e Zn(TPPS ₄).....	48
1.5.1	H ₂ (TNBPyP).....	48
1.5.2	Zn(TPPS ₄).....	50
2	OBJETIVOS	55
2.1	Objetivo geral.....	55

2.2	Objetivos específicos.....	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	Materiais e equipamentos.....	56
3.2	Determinação do coeficiente de absorvidade molar das porfirinas em água.....	57
3.3	Estudo espectrofotométrico da porfirina H ₂ (TNBPyP) com variação de pH e com a presença de agentes tensoativos.....	57
3.3.1	Análise espectrofotométrica com alteração de pH em água.....	57
3.3.2	Análise espectrofotométrica com alteração de pH em acetato/fosfato..	58
3.3.3	Análise espectrofotométrica com alteração de pH com surfactantes HPS, CTAB e SDS.....	58
3.4	Análise da agregação da porfirina H ₂ (TNBPyP) em misturas de água/etanol.....	59
3.5	Reações de fotobranqueamento.....	59
3.6	Teste do ácido úrico.....	60
3.7	Ensaio biológico <i>in vitro</i>	62
3.7.1	Toxicidade sobre a <i>Artemia salina</i>	62
3.7.2	Ensaio <i>in vitro</i> : cultura bacteriana.....	63
4	RESULTADOS	65
4.1	Determinação do coeficiente de absorvidade molar das porfirinas em água.....	65
4.2	Estudo espectrofotométrico da porfirina H ₂ (TNBPyP) sob variação de pH na ausência e na presença de surfactantes.....	68
4.2.1	Estudo espectrofotométrico em meio ácido.....	69
4.2.2	Estudo espectrofotométrico em meio básico.....	80
4.3	Análise da capacidade de agregação.....	88
4.4	Teste de fotobranqueamento.....	91
4.5	Teste do ácido úrico.....	95

4.6	Testes de toxicidade.....	100
4.6.1	Testes de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> (TAS).....	100
4.6.2	Ensaio <i>in vitro</i> com culturas de microorganismos.....	106
5	CONCLUSÕES	113
6	REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

Moléculas de porfirina vêm sendo estudadas já há algumas décadas, devido principalmente ao grande potencial de aplicação de suas propriedades ópticas. Em especial, a possibilidade de serem aplicadas como limitadores ópticos e a relativa facilidade de manipulação de sua estrutura, fazem com que um grande esforço de engenharia molecular seja empregado no sentido de aperfeiçoar suas propriedades de absorção de fluorescência ótica.¹

Devido a sua capacidade de se ligar aos gases e de atuar como centro ativo em reações catalíticas, filmes baseados em porfirinas e metaloporfirinas depositados em superfícies de metais ou semicondutores têm sido empregados como sensores químicos, de gás e em materiais catalíticos. As porfirinas são compostos extremamente promissores para diversas técnicas biológicas e médicas, consequentemente as pesquisas se estendem a diversas áreas do conhecimento.²

Em se tratando de técnicas médicas, e com relação ao registro crescente de inúmeros casos de câncer, é constante a busca por tratamentos mais eficientes e menos agressivos que as terapias atualmente utilizadas, nesse caso surge a terapia fotodinâmica (TFD), que é uma técnica que utiliza luz com comprimento de onda adequado e uma substância fotossensível, como as porfirinas, as quais após excitadas podem gerar espécies reativas capazes de destruição celular. Além disso, é crescente a utilização de compostos fotossensíveis associados a uma fonte de luz para matar microorganismos patogênicos, ou seja, através da inativação fotodinâmica surge uma terapia auxiliar ao tratamento odontológico capaz de reduzir a população bacteriana. No entanto, para aplicações efetivas, é importante conhecer

as características fotofísicas das porfirinas, para que seu potencial seja melhor explorado.³

1.1 PORFIRINAS

Porfirina é o nome dado à grande classe de compostos intensamente coloridos, vermelhas ou púrpuras, pigmentos cristalinos fluorescentes, de origem natural ou sintética que têm em comum um macrociclo aromático consistindo de quatro anéis pirróis (A, B, C e D) ligados entre si por grupos metino. A estrutura do macrociclo das porfirinas base livre aparece na Figura 1.1, esse arranjo suporta uma configuração altamente estável de ligações simples e duplas (um sistema conjugado π aromático). Os carbonos nas posições 5,10,15 e 20 são denominados “carbonos em posições *meso*”. Os átomos das posições 2, 3, 7, 8,12, 13, 17 e 18 são conhecidos como “carbonos β -pirrólicos”.⁴

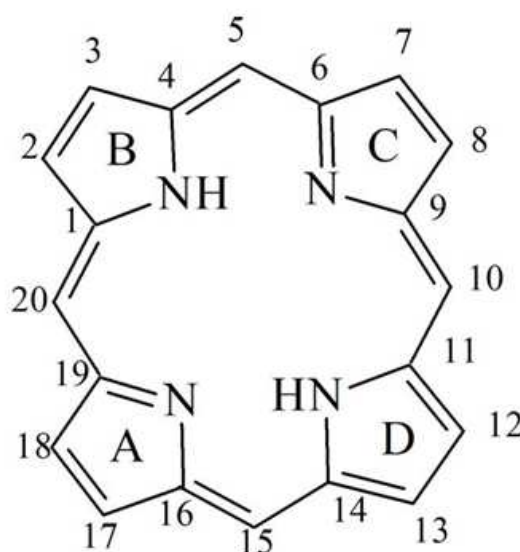


Figura 1.1 – Estrutura do macrociclo da porfirina base livre.

As porfirinas base livre não possuem metais ligados no centro do macrociclo, onde existem dois átomos de hidrogênio ligados a nitrogênios. O espectro de absorção eletrônica das porfirinas é caracterizado pela presença de uma banda de grande absorvidade molar (banda Soret), referente à transição $S_0 \rightarrow S_2$ e por bandas menos intensas na região de 500 a 650 nm (bandas Q), pertencentes a transição $S_0 \rightarrow S_1$.⁵

O centro do macrociclo tetrapirrólico possui um espaço apropriado para acomodar um íon metálico, que coordena-se a quatro átomos de nitrogênio presentes. As porfirinas se associam a íons metálicos recebendo a denominação de metaloporfirinas. Essas ocorrem quando existe a troca dos dois átomos de hidrogênio centrais do anel da porfirina base livre por um cátion metálico. O tamanho do cátion influencia a conformação do anel e, conseqüentemente, a estabilidade da porfirina. As modificações no anel da porfirina provocam alterações que se refletem na simetria da molécula, fazendo com que haja uma re-orientação dos orbitais moleculares, e, conseqüentemente, nos seus espectros de absorção e de emissão. As porfirinas não metaladas apresentam quatro bandas Q, enquanto as metaladas possuem apenas duas, pois com a quebra da simetria do anel porfirínico, faz com que os derivados porfirínicos, possuam alta absorção de luz na região de 600nm, região de banda proibida por simetria nas porfirinas, e, pelo processo de metalação torna duas das bandas Q proibidas, que deixam de ser observadas.^{6,7}

Os derivados metálicos da porfirina comportam-se freqüentemente como compostos de coordenação, em que o íon metálico ligado aos nitrogênios pode ter capacidade de ligar um ou dois grupos químicos no eixo perpendicular ao anel da porfirina. É sob esta forma, que os pigmentos pirrólicos exercem as suas funções mais importantes nos organismos vivos. Praticamente, todos os metais têm

possibilidade de se combinarem *in vitro*, com os átomos de nitrogênio centrais das porfirinas. Alguns representantes desta classe de compostos são: o grupo heme, que contém ferro, a clorofila, que contém magnésio, e os pigmentos biliares.⁸

1.1.1 Classificação

Os trabalhos realizados na primeira metade do século passado, por alguns autores como Rothmund, Ziele, e em particular por R. Willstätter e H. Fischer fundamentaram as bases da química orgânica das porfirinas que permitiram, após 1945, o esclarecimento da sua síntese.^{9,10}

As diferenças estruturais dos derivados de porfirinas decorrem do grau de insaturação dos anéis, da composição das cadeias laterais ligadas aos anéis pirrólicos e das posições axiais do macrociclo.⁶

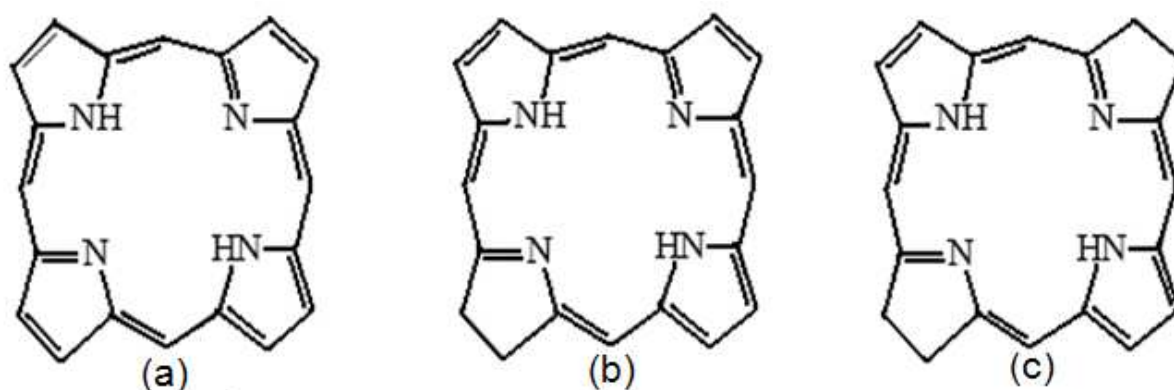


Figura 1.2 – Estruturas básicas das porfirinas (a), das clorinas (b) e bacterioclórin (c).⁶

As porfirinas sintéticas são classificadas de acordo com a sua atividade catalítica. As de primeira geração incluem as *meso-tetrakis*-fenilporfirinas. Tais porfirinas não apresentam grupos volumosos que representem impedimento estérico para a formação de dímeros, assim como apresentam baixa atividade catalítica em

reações de oxidação, pois grupos fenílicos promovem fraca ativação do anel, também é rápida a degradação oxidativa do anel porfirínico.¹¹

Porfirinas de segunda geração apresentam substituintes elétrons-aceptores nas posições *meso*-aril. A presença destes substituintes elétrons-aceptores confere às correspondentes espécies ativas metal-oxo uma maior eletrofilicidade e reatividade, elevando a atividade catalítica. Um exemplo deste tipo de porfirinas é a Fe(TDCPP)Cl (Figura 1.3). Os grupos volumosos podem impedir interações bimoleculares, prevenindo a rápida destruição auto-oxidativa da porfirina.^{12, 13, 14}

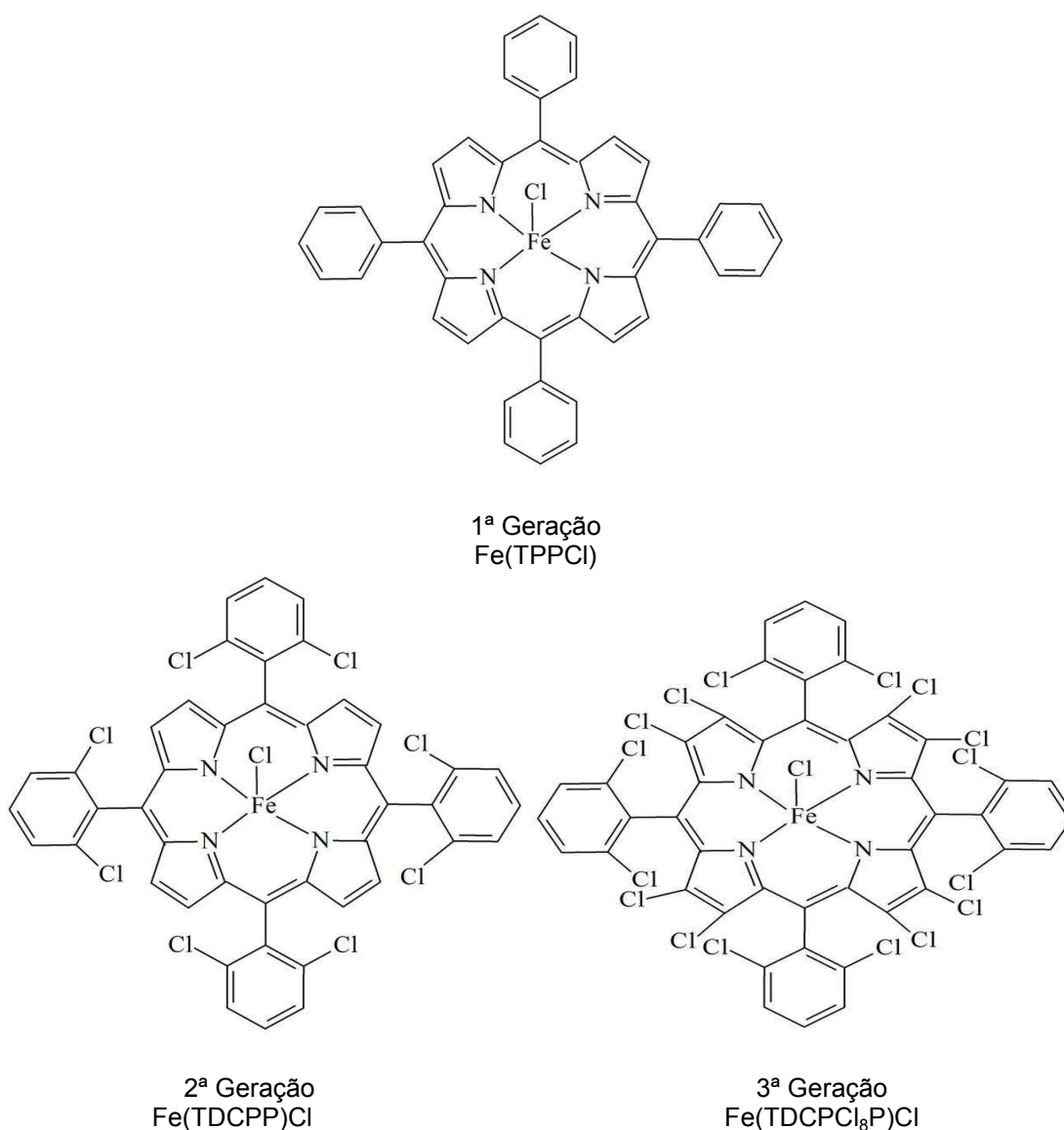


Figura 1.3 - Exemplos de estruturas ferroporfirinas de 1ª, 2ª e 3ª geração.

Metaloporfirinas poli-halogenadas, contendo substituintes elétrons-aceptores e/ou grupos volumosos (F, Cl, Br ou SO₃H) nas posições β -pirrólicas, constituem a terceira geração de porfirinas. A presença destes grupos nas posições β confere a estas porfirinas maior proteção à destruição oxidativa e impede ou minimiza a formação de espécies diméricas, ou seja, maior estabilidade.¹⁵

1.1.2 Características Físico-Químicas

A atividade específica dos diversos pigmentos tetrapirrólicos pode ser considerada estreitamente relacionada aos respectivos comportamentos físico-químicos, entre eles podemos citar.

1.1.2.1 Estabilidade

A estabilidade e a atividade catalítica do complexo porfirínico têm sido amplamente estudadas, visto que podem ser melhoradas pela utilização de metaloporfirinas altamente impedidas.¹⁵

Quanto à fotoestabilidade, compostos porfirínicos comportam-se de maneiras diferentes um do outro, apresentando-se estáveis ou instáveis (pela maior ou menor resistência à fotodegradação) frente à iluminação, contudo a alta taxa de fotodegradação pode ser corrigida pela diminuição da dose de luz.¹⁶

1.1.2.2 Solubilidade

As porfirinas possuem baixa solubilidade em água e solventes orgânicos, a insolubilidade relativa é atribuída à ampla nuvem π . A solubilidade em solventes orgânicos pode ser elevada, inserindo-se grupos alquila, e em água pode ser elevada, inserindo-se grupos polares. A interação de forças de solvatação e a auto-interação entre as nuvens π podem levar a auto-agregação.¹⁷

1.1.2.3 Espectro de Absorção

As porfirinas base livre apresentam em seu espectro eletrônico uma banda característica, referente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ na região de 380 e 430 nm, a qual é conhecida como banda Soret ou banda B, sendo ($\epsilon \sim 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), ainda possuem quatro bandas na região do visível, entre 500 e 700 nm, denominadas de bandas Q, essas apresentam ($\epsilon \sim 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).⁴ Um espectro de absorção característico de porfirinas base livre é mostrado na Figura 1.4.

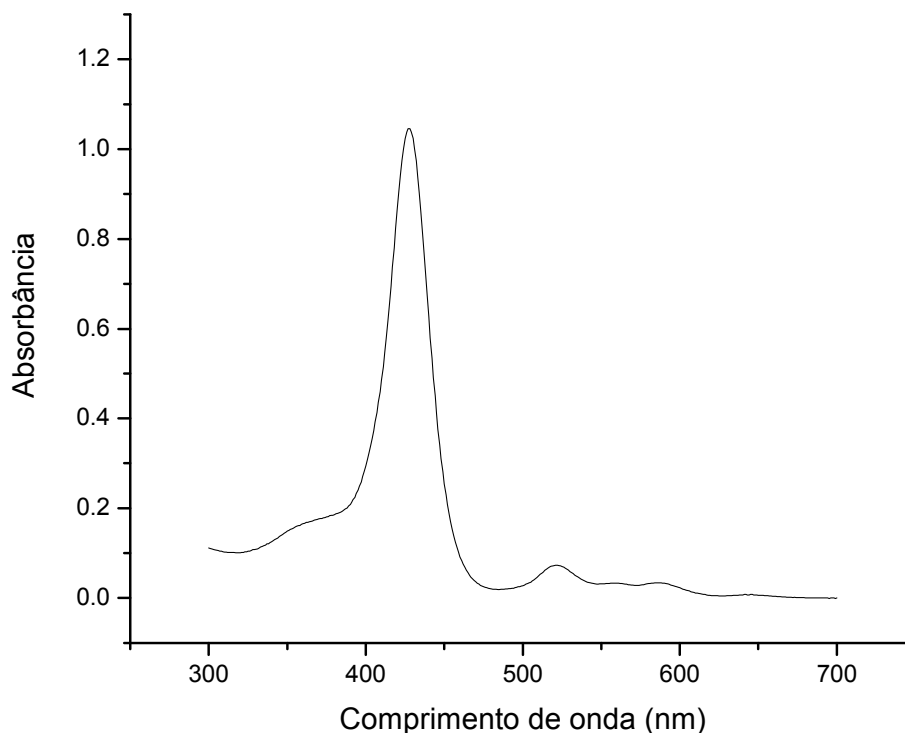


Figura 1.4 – Espectro de absorção da porfirina base livre H₂(TNBPYP).

1.1.3 Aplicações

Metalocompostos apresentam atividade catalítica em diferentes sistemas biológicos, atuando em reações de oxidação e redução. O macrociclo altamente conjugado da porfirina e muitos de seus derivados metálicos estão presentes em diversas proteínas.¹¹

O grupo heme (protoporfirina IX de ferro) (Figura 1.5) encontra-se em proteínas, denominadas, por esta razão, hemoproteínas, como a hemoglobina, a mioglobina, a catalase e os citocromos. Na hemoglobina, assim como na mioglobina, o ferro tem a função de ligar uma molécula de oxigênio, possibilitando o seu transporte na corrente sanguínea para todo o organismo. Na catalase, o ferro tem uma função

catalítica, aliada à sua capacidade de mudar o estado de oxidação, neste caso, o ferro catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio. Em proteínas como os citocromos, o grupo heme serve de meio de transporte eletrônico entre proteínas, recebendo um ou dois elétrons de uma proteína e transferindo-os para outra. Proteínas contendo um ou mais grupos heme têm uma cor entre o cor-de-rosa e o vermelho.^{14,18}

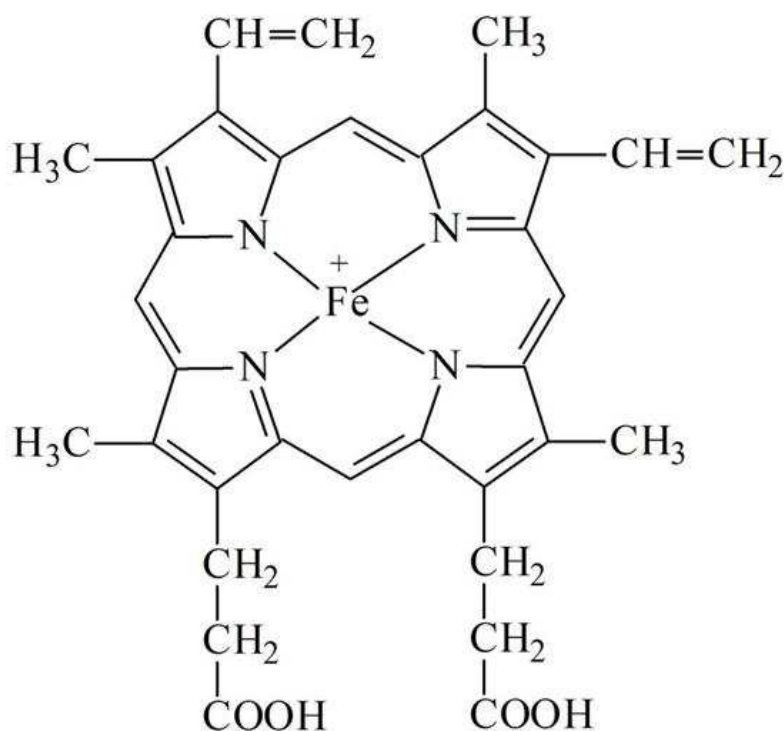


Figura 1.5 - Estrutura da protoporfirina IX de ferro.¹⁹

Devido às características que possuem, as porfirinas têm sido usadas em diversos componentes orgânicos, fios moleculares e outros dispositivos.^{14,18} Enzimas como as ligninases são capazes de oxidar poluentes organoclorados como o 2,6-diclorobenzoquinona, principal poluente produzido pelas indústrias de papel e celulose. Metaloporfirinas de segunda ou terceira geração contendo grupos sulfonados nos anéis meso-fenis têm sido bons modelos para a ligninase e apresentam um futuro bastante promissor na oxidação de poluentes e tratamento de água.²⁰

Porfirinas sintéticas têm apresentado um importante papel no desenvolvimento de sistemas fotoquímicos para a conversão de energia solar. Zinco porfirinas solúveis em água têm sido utilizadas para fotossensibilizar a oxidação e redução da água, exibindo efeito fotogalvânico. A incidência de luz em uma solução contendo ZnP e dois eletrodos conectados à uma bateria, geram uma pequena corrente.²⁰

Sistemas supramoleculares contendo metaloporfirinas podem ser ainda utilizados como materiais ativos de sensores para diversas substâncias químicas de grande interesse comercial e ambiental.²¹

Filmes finos com porfirinas incorporadas possuem propriedades eletroquímicas, eletrocatalíticas, foto-eletroquímicas e condutoras. Quando incorporados compostos orgânicos em filmes finos de SnO_2 proporcionam o aumento da faixa de absorção de energia luminosa no UV-Vis dos filmes de SnO_2 , que pode ser realizada por meio da imersão dos filmes em soluções porfirínicas.²²

Na medicina, as porfirinas são utilizadas como compostos fotossensíveis, na TFD para o tratamento de câncer e muitas outras doenças, constituindo uma modalidade terapêutica que tem apresentado bons resultados, além de algumas vantagens em relação às técnicas usualmente empregadas.

1.2 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma nova modalidade terapêutica para o tratamento de câncer e outras doenças onde há crescimento anormal de células.

Esse tratamento apresenta efeitos colaterais minimizados quando comparado aos tratamentos tradicionais como cirurgia, radio e quimioterapia.²³

O uso de compostos fotossensíveis é a base da TFD, pois estes se acumulam preferencialmente no tecido doente devido a fatores que ainda estão sendo estudados e quando ativados por luz (região do visível no espectro eletromagnético) levam a processos fotofísicos e fotoquímicos que geram espécies reativas que são tóxicas para estas células. A iluminação seletiva da área alvo aumenta a seletividade da terapia, uma vez que somente na área irradiada acontece o processo fotodinâmico.^{23,24,25,26}

Propriedades terapêuticas com fonte de luz são conhecidas por milhares de anos, mas somente neste último século que a TFD foi desenvolvida.^{23,24,25,26} Mais de cem anos atrás, pesquisadores observaram que a combinação de fonte de luz e certos compostos químicos induziram a morte de células. Em 1900, Oscar Raab relatou que certos comprimentos de onda foram letais com a infusão sobre *Paramecium caudatum* na presença de corantes acridina.²⁴ Em 1950, Schwartz enriqueceu a mistura de oligômeros e essa preparação foi chamada derivado da hematoporfirina (HpD), contendo além de monômeros, oligômeros com duas a nove unidades de porfirina.⁶

A primeira geração de fotossensibilizadores é composta por derivados da hematoporfirina e seus análogos comerciais como *Photoheme®*, *Photocarcinorin®*, *Photosan®*, *Photofrin®* e *Photogem®*. A estrutura química do Photogem está apresentada na Figura 1.6. Novas gerações de fármacos (segunda e terceira geração) estão sob avaliação e alguns deles têm se destacado no tratamento de muitas doenças oncológicas e não oncológicas. Na tentativa de encontrar novos compostos, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando encontrar

melhores propriedades fotofísica, fotoquímica e que possa maximizar a ação fotodinâmica em meio biológico (ambiente fisiológico).^{23,25,27}

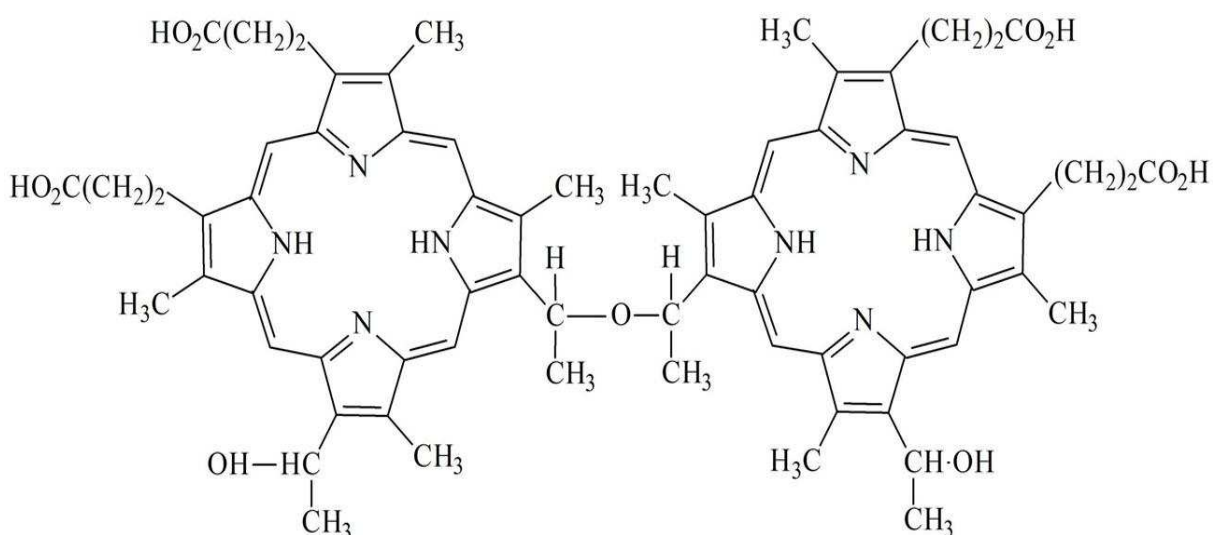


Figura 1.6 - Estrutura molecular do fotossensibilizador HpD (Photogem®), sistêmico.²⁵

A eficácia da TFD no tratamento de câncer depende de vários fatores como o tipo do fotossensibilizador, concentração da droga, localização intracelular, distribuição e disponibilidade de oxigênio. A morte das células pelo agente citotóxico (oxigênio singlete ou EROs) pode se dar pela indução de apoptose e necrose, reações inflamatórias, reações imunes além da ocorrência de danos à vascularização dos vasos do tumor e da vizinhança saudável, resultando na morte indireta do tumor via indução da hipóxia ou inanição.^{26,28}

A TFD tem sido aplicada em cânceres no estágio inicial como lesões externas na face e orelha, nas lesões superficiais nos pulmões, esôfago e bexiga, na recanalização de traquéia, brônquios e cárdia do estômago ou mesmo para conter rápido avanço de alguns casos de tumor de pele. Também tem sido empregada no tratamento da degeneração macular da retina relacionada à idade. Estudos sobre

possível aplicação no controle do crescimento de fungos estão sendo realizados, e ainda aplicação em artrite reumatóide e doenças coronarianas; podendo ser utilizada em combinação com técnicas convencionais.²⁹

A luz empregada para excitar os fotossensibilizadores atuais pode provocar necrose fotoquimicamente induzida em até um máximo de 10 mm. Isso significa que, para iluminações superficiais, a indicação de TFD como tratamento primário deve ser limitada a tumores pequenos.^{25,26,28}

Tendo-se em vista a aplicação clínica da TFD, deve-se optar por radiação na faixa que se estende desde cerca de 600 nm (vermelho) até aproximadamente 800 nm (infravermelho) – região conhecida pelo nome de janela terapêutica (Figura 1.7). Abaixo desta faixa de comprimentos de onda tem-se absorção da luz por parte da hemoglobina e de demais proteínas do organismo (sem mencionar a maior influência do espalhamento da luz), acima do valor máximo, os fótons podem não ter energia suficiente para participar de reações fotoquímicas, bem como passa a se tornar substancial a absorção da radiação por moléculas de água.^{3,25}

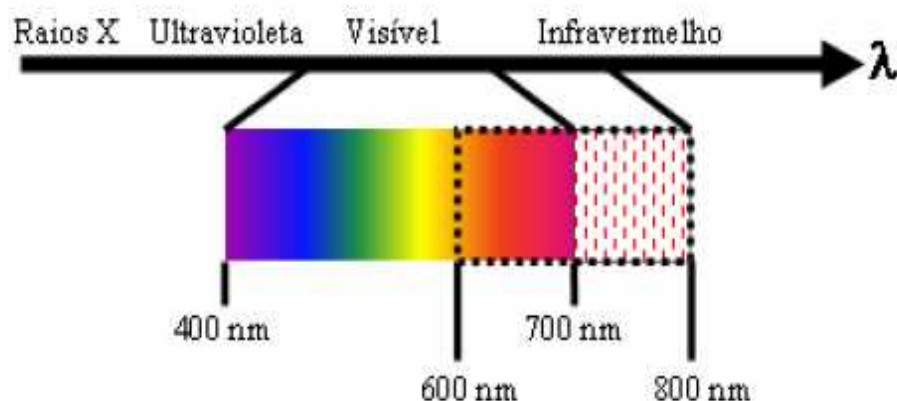


Figura 1.7 - Região do espectro eletromagnético correspondente à janela terapêutica (de 600 a 800 nm).

TFD requer administração tópica ou sistêmica do fármaco seguida, após uma janela de tempo para o tratamento (horas ou dias depois da aplicação do fotossensibilizador), por iluminação com luz de comprimento de onda apropriado para cada fotossensibilizador. As células do tumor são destruídas rapidamente, e qualquer dano ao tecido saudável é curado entre seis e oito semanas.^{3,26,28,29}

A técnica apresenta algumas vantagens em relação às técnicas usualmente empregadas no tratamento do câncer, por exemplo, dano seletivo às células tumorais, possibilidade de repetir o tratamento sem restrições de indícios de resistência ao fotossensibilizador, ausência de intervenções cirúrgicas e conseqüente hospitalização, visto que muitos dos procedimentos podem ser realizados em nível ambulatorial. Entre as desvantagens dessa técnica figuram um alto custo dos equipamentos laser (do termo em inglês "*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*" ou amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) empregados como fonte de luz, fato esse que vem se modificando com a utilização de dispositivos como os diodos emissores de luz (LED), o custo de agentes fotossensibilizadores e a fotossensibilização cutânea prolongada, principalmente associada aos derivados da hematoporfirina.^{24,29,30}

Atualmente, entre os compostos que têm sido empregados como fotossensibilizadores estão: a naftalocianinas de silício, ftalocianina de silício (SiPc), *meso-tetrakis*-metoxifenilporfirinas, porfícenos, texafirina de lutécio(III) (*Lutrin*®) e texafirina de gadolínio(III) (*Motexafin Gadolinium*®), etiopurpurina de estanho (Sn Et₂), derivado hexil éter da pirofeoforbida-a (HPPH, *Photoclor*®), porfirinas e clorinas glicosiladas.^{25,26,31}

1.2.1 Princípios da Técnica de Terapia Fotodinâmica (TFD)

Quando há administração sistêmica de um FS, este se acumula preferencialmente nos tecidos doentes, em razão da formação de complexos intravasculares entre as substâncias fotossensíveis e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), pois sabe-se que células neoplásicas possuem maior quantidade de receptores LDL do que células não tumorais, no entanto, estudos recentes sugerem a participação de outras proteínas do plasma como as proteínas de alta densidade (HDL) e as soroalbuminas no transporte dos FS aos tecidos, bem como a retenção seletiva nos tumores. Portanto, FS com caráter hidrofílico devem ser transportados por albuminas e globulinas do plasma, e aqueles com caráter hidrofóbico por LDL.^{3,28,32}

O tumor é então irradiado, utilizando-se uma fonte de luz na região do vermelho ou infravermelho próximo, a fim de que a radiação penetre efetivamente no tecido neoplásico. A luz, na TFD, quando penetra no tecido, pode ser espalhada ou absorvida, sendo que, o espalhamento é o principal fator limitante da penetração da luz nos tecidos, e esses processos dependem do tipo de tecido e do comprimento de onda. O tecido biológico não é homogêneo e macromoléculas, organelas e camadas intersticiais deixam-no turvo, o que causa espalhamento e perda da direção do feixe de luz. A absorção ocorre pela presença dos cromóforos teciduais como hemoglobina, mioglobina e citocromos.³³

A irradiação do tumor provoca a excitação do FS a um estado eletrônico de maior energia, do qual pode retornar ao estado fundamental via processos radioativos (como fluorescência ou fosforescência) ou não radioativos (como conversão interna, cruzamento intersistema ou relaxações vibracionais). Dentre

estes processos de decaimento energético, o cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica (transição proibida por spin), onde o FS no estado eletrônico singlete excitado (S_1) sofre uma transição para o estado triplete excitado (T_1). O FS no estado triplete excitado apresenta um tempo de vida maior do que no estado singlete excitado, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_0$ ser proibida por spin. Dessa forma, o fotossensibilizador no estado T_1 pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, localizadas próximas à região irradiada, gerando espécies reativas que oxidam biomoléculas e danificam o tecido irradiado (Figura 1.8).^{26,34,35}

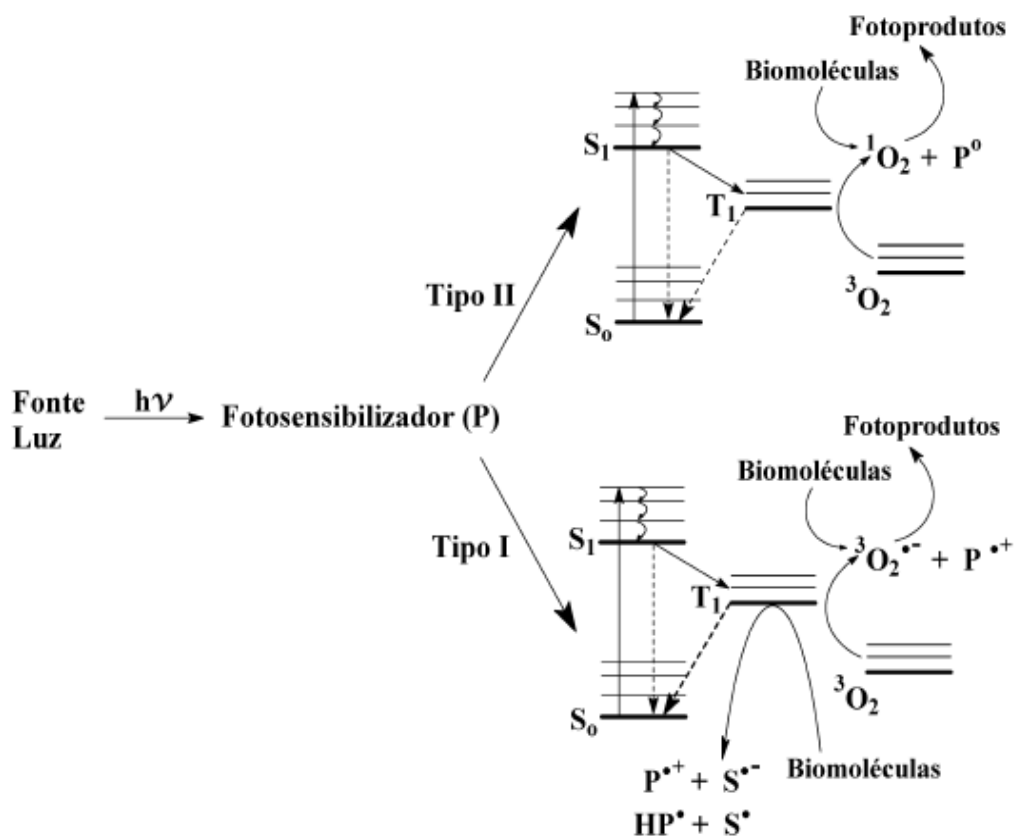


Figura 1.8 - Mecanismos (Tipo I e II) de geração de ROS pela combinação de luz, fotossensibilizador (FTS) e oxigênio no estado fundamental (3O_2).³⁴

A fotodestruição dos tecidos pode ocorrer através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou de oxigênio singlete (mecanismo tipo II).^{3,28,34,35}

No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas (preferencialmente O_2), produzindo radicais ou íons radicais através de reações de transferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons. A maioria destes radicais reage instantaneamente com o O_2 , gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($\cdot OH$), os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas.³⁶ O radical hidroxila também atravessa a membrana plasmática e não pode ser eliminado da célula. Esse radical altamente reativo pode ligar-se a um substrato orgânico, possuidor de carbono, e também oxidá-lo, recebendo um elétron do mesmo. O substrato oxidado resultante é um radical e pode reagir com outras moléculas em uma reação em cadeia. Esse tipo de reação em cadeia é comum no dano oxidativo de ácidos graxos e outros lipídeos e demonstra por que radicais como a hidroxila podem causar dano muito maior que o esperado.^{33, 36}

No mecanismo tipo II obtém-se oxigênio singlete ($^1\Delta_g$ ou 1O_2), altamente reativo, através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio ($^3\Sigma_g^-$ ou 3O_2). Em razão das reações de transferência de energia serem mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons, o mecanismo tipo II é geralmente favorecido nas reações de fotoxidação. Como o tempo de vida do oxigênio singlete é muito curto ($\sim 2 \mu s$), esta espécie reativa reage no seu sítio de formação. Isto significa que moléculas do

fotossensibilizador não ligadas às células não serão fototóxicas. O oxigênio singlete, quando gerado, pode reagir com lipídeos insaturados (incluindo colesterol), aminoácidos (como o triptofano, histidina e metionina) e ácido nucléicos. Lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas. Portanto, as reações fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido tumoral via necrose ou apoptose.^{3,28,35,37} A tabela 1 resume os efeitos comentados.

Tabela 1 – Mecanismo de atuação dos fotossensibilizadores

Mecanismo tipo I	Mecanismo tipo II
Interação com o substrato orgânico	Interação com o oxigênio fundamental ($^3\text{O}_2$)
Transferência de elétrons	Transferência de energia
Formação de radicais livres	Formação de Oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

Efeitos tóxicos do oxigênio sobre componentes biológicos já eram conhecidos no final de século XIX, tornando-se objeto de intensa investigação científica nos últimos anos. Embora seja grande o número de alvos subcelulares que podem sofrer a ação da TFD, como mitocôndrias, lisossomos e retículos endoplasmáticos, verifica-se geralmente, que os núcleos não são fotodestruídos. Isto é importante, em vista do fato que se podem excluir possíveis riscos mutagênicos ao DNA que levariam à formação de células cancerígenas.^{34,37}

Contudo, não existe certeza absoluta de que o oxigênio singlete seja o responsável pela fototoxicidade, uma vez que este leva à formação de radicais livres tais como: o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroxil ($\text{OH}^{\cdot}$) *via* reação de Fenton e (H_2O_2).³⁶

Sabe-se que os radicais livres são extremamente reativos e podem danificar muitas moléculas biológicas, incluindo o material genético de uma célula (DNA), algumas das reações podem ser observadas na Figura 1.9. No entanto, se compararmos com outras terapias citotóxicas, a TFD tem a vantagem de dupla seletividade: o FS pode ser direcionado para as células ou tecido doente, assim como a luz pode ser focalizada no local da lesão. Além disso, o procedimento pode ser repetido várias vezes, se necessário, uma vez que não há efeitos tóxicos cumulativos.³⁸

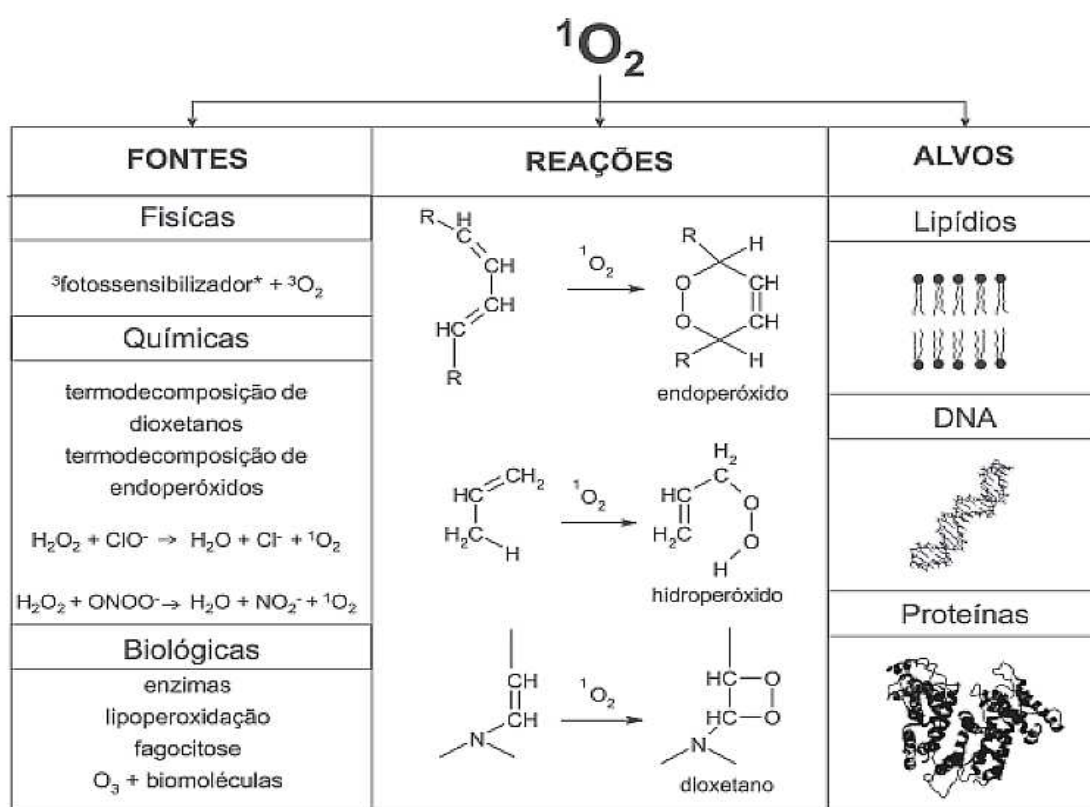


Figura 1.9 – Fontes, reações e alvos do $^1\text{O}_2$.³⁷

1.2.2 Propriedades do Oxigênio Singlete

O oxigênio possui três estados eletronicamente excitados conhecidos por oxigênio singlete. Dois destes estados, $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$, residem a 22,5 kcal/mol, acima do

estado fundamental, logo, são estados ditos degenerados, sendo convenientemente representados por $^1\Delta_g$. O terceiro estado, mais energético, é o $^1\Sigma_g^+$, cuja energia de excitação é igual a 37,5 kcal/mol.³⁷

Segundo a Teoria do Orbital Molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados em orbitais moleculares degenerados. Esses elétrons tendem a possuir o mesmo spin de forma a produzir multiplicidade máxima e assim um estado de mais baixa energia. Essa é a razão pela qual o estado fundamental do oxigênio molecular é um triplete.³⁷

A Tabela 2 apresenta as formas de ocupação de orbitais moleculares antiligantes, para o oxigênio no estado fundamental, assim como, para os estados excitados imediatamente superiores.

Tabela 2- Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado excitado singlete ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-$).³⁷

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

De acordo com a Tabela 2, uma vez que o estado $^1\Sigma_g^+$ possui mesma simetria que o estado fundamental, com spins opostos, possui uma energia de 37,5 kcal acima do estado fundamental, o tempo de vida da espécie nesta configuração é muito curto em meio aquoso (10^{-11} s). O oxigênio no estado excitado que se apresenta com a configuração denominada $^1\Delta_g$, tem dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, possui uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental,

com tempo de vida em solvente aquoso de 10^{-6} s. Esta é a espécie realmente ativa, sendo responsável pelo efeito foto-terapêutico ³⁶. Sua multiplicidade (igual à da maioria das moléculas orgânicas) faz do oxigênio singlete uma espécie quimicamente muito reativa. Além disso, a presença de um orbital molecular vazio confere a esta molécula caráter eletrofílico, o que contribui com sua alta reatividade para com um grande número de substratos biológicos.

O tempo de vida do oxigênio singlete em solução é profundamente influenciado pela natureza do solvente, em água, por exemplo, é cerca de 4,0 μ s. Já em água deuterada, situa-se em torno de 70 μ s. Em geral, em solventes que não possuem ligações C-H e grupos hidroxila na sua estrutura, o tempo de vida do oxigênio singlete tende a valores mais elevados. Em sistemas biológicos, o oxigênio singlete apresenta tempos de vida extremamente baixos, inferiores a 0,04 μ s, pois este, sendo muito reativo, ataca uma variedade de biomoléculas, em função disso, a eficácia do tratamento é reduzida. ^{28, 36}

1.2.3 Administração da Terapia Fotodinâmica (TFD)

Para a aplicação da técnica, após diagnóstico e avaliação rigorosa do problema clínico, o medicamento pode ser administrado de forma tópica (pomada ou creme), oral ou intravenosa. Quando no estado sólido é solubilizado em água ou soro fisiológico. A solução resultante é administrada intra-venosamente e o terapeuta, após aguardar o tempo recomendado (onde se tem o maior acúmulo do fármaco no tecido doente), efetua a iluminação. O processo de infusão da droga deve ser lento e cuidadoso diante da possibilidade de extravasamento devido à

fragilidade da parede celular das veias, especialmente de idosos. Caso o extravasamento ocorra, a área deve ser protegida da luz direta até que o inchaço e a coloração desapareçam. Para o tratamento de pele, a aplicação da droga ocorre via tópica.^{3,28}

As quantidades aplicadas de medicamento e as características do laser (tipo, dosagem de potência e tempo de iluminação) dependem da droga que está sendo aplicada e da espécie e gravidade da doença tratada.^{28,35,39} Além disso, uma grande variedade de fontes de iluminação está sendo usada, no entanto, o uso de LEDs, que possuem comprimentos de onda específicos, vem sendo promissor devido as vantagens econômicas, além de apresentar resultados satisfatórios quando se trata de tratamentos em câncer superficial ou até mesmo para realização experimental.³⁵

1.2.4 Propriedades do Fotossensibilizador (FS)

Um fotossensibilizador ideal para a Fotoquimioterapia deve possuir características específicas, pois a eficácia da TFD no tratamento de câncer depende de vários fatores. Destacam-se na Tabela 3, as principais características para um FS.

Tabela 3 – Características de um fotossensibilizador ideal³¹

Estabilidade	Estável quanto à formação de agregados e à fotodegradação
Toxicidade	Toxicidade minimizada na ausência de luz e citotóxica somente na presença de luz em comprimento de onda definido
Formulação/farmacocinética	O FS deve ter rápida eliminação do corpo e simplicidade na formulação
Ativação	Absorção de luz na região entre 650 e 850 nm, para máxima penetração de luz nos tecidos e mínimo espalhamento
Rendimento quântico	Elevado rendimento quântico de oxigênio singlete para reações fotoquímicas - produção de oxigênio singlete e outros EROs
Custo e disponibilidade	Baixo custo e disponibilidade comercial com a finalidade de promover utilização em tratamento extensivo
Seletividade	Acumulação favorável em tecido cancerígeno. Localização dentro de organelas e mitocôndrias com indução à apoptose
Cancerígenos/mutagênicos	Nenhuma mutação ou efeitos cancerígenos devem ser provocados pela administração do FS

1.2.5 Limitações da TFD

Os estados excitados do FS, possuem curto tempo de vida ($<1\mu\text{s}$) o que diminui a probabilidade da transferência de energia do FS para o oxigênio. Também em alguns casos a concentração de oxigênio dentro dos tecidos tumorais diminui a probabilidade de formação de oxigênio singlete, sendo que o mesmo possui curto tempo de vida em soluções aquosas, diminuindo reações entre o oxigênio singlete e as estruturas da célula.^{3,28}

Alguns fotossensibilizadores usados na TFD possuem baixa absorção ótica na região da janela terapêutica, e a maioria tende à formação de agregados em meio aquoso, os quais diminuem a eficácia em TFD. O preço desses compostos é elevado, o que torna alto o custo de tratamento para a dose recomendada para

aplicação. Além disso, o principal efeito colateral durante o tratamento em TFD, é a sensibilização à luz, que é contornada evitando exposição à luz solar e luz interna muito intensa por um período de até 6 semanas, dependendo do FS utilizado.³⁸

Com relação ao método de tratamento em TFD, utiliza-se uma fonte de luz com comprimentos de onda na região da janela terapêutica. Logo, lasers tornaram-se, então, fontes padrão para aplicações em TFD, por seu caráter monocromático, sua alta potência de saída e a facilidade no acoplamento a fibras ópticas (entrega endoscópica de luz). Os lasers mais comumente usados em TFD são os lasers de corante sintonizáveis devido à sua variedade de comprimentos de onda. Porém, o alto custo destas fontes restringe sua utilização. Avanços recentes dizem respeito ao uso de lasers de diodo, que emitem na região de absorção de muitos FSs usados atualmente. Além disso, estes lasers cobrem uma ampla variedade de comprimentos de onda a custos satisfatórios, são portáteis e vêm sendo amplamente empregados em diversos casos clínicos. Os LEDs também estão sendo utilizados, visto que estes atualmente estão disponíveis em vários comprimentos de onda e apresentam potências relativamente elevadas, o que, somado ao seu relativo baixo custo, fazem destes uma ótima opção.^{35,40,41}

1.2.5.1 Agregação dos compostos porfirínicos

Os compostos porfirínicos possuem uma alta hidrofobicidade, sobretudo na forma desmetalada, aspecto interessante à TFD, pois a menor compatibilidade com a água implica, em geral, em maior afinidade por membranas celulares. Por outro lado, essa propriedade faz com que haja grande tendência a esses compostos de se

auto-agregarem em solução aquosa.^{32,35} Forças de natureza eletrostática, forças de van der Waals, o efeito hidrofóbico, etc., contribuem para a formação de agregados.

Agregados da porfirina são formados devido à elevada hidrofobicidade, os quais geram espécies pequenas (dímeros e trímeros) e também agregados grandes (poliméricos). Com isso, suas propriedades espectrais e energéticas são afetadas, reduzindo o tempo de vida dos estados excitados, ou seja, o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete é reduzido, e isso compromete a eficácia em TFD.³ Portanto, é necessário que o FS se encontre na forma monomérica, característica que deve ser obtida após a mistura do fármaco com água (ou soro fisiológico), o que evita também a possibilidade de agregados maiores provocarem dor no momento da injeção e mesmo a morte do paciente, através de entupimento de artérias por precipitados. Uma formulação adequada do medicamento deve ser obtida de maneira que o FS se encontre na forma monomérica.³

Uma das maneiras de aferir a presença de espécies agregadas numa amostra de porfirinas é a análise espectroscópica em conformidade à Lei de Beer-Lambert. Desvios negativos a esta lei evidenciam uma provável presença de agregados, espectros de absorção em relação ao comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$), bem como o próprio coeficiente de absortividade molar, também evidenciam diferenças.⁴²

Exemplos de acoplamentos entre as moléculas de porfirinas referem-se à formação de agregados do tipo J, com ângulos entre monômeros inferiores a $54,7^\circ$, e aos agregados do tipo H, com ângulos superiores ao ângulo mágico. Ainda podemos dizer que nos agregados do tipo J as moléculas de porfirinas se agrupam de uma maneira linear e um forte desvio da banda Soret para o vermelho, enquanto que nos agregados do tipo H os monômeros organizam-se co-facialmente e um

desvio da banda Soret para o azul. No entanto, muitos agregados observados derivam da formação prévia de formas protonadas das porfirinas.^{42,43,44}

1.2.5.2 Reações de fotobranqueamento

Um processo adicional que o sensibilizador (droga) sofre é o de fotobranqueamento, causado por modificações na estrutura da molécula através de reações paralelas induzidas pela luz. Com a ocorrência fotobranqueamento a molécula sofrerá fotoxidação e o produto não irá mais absorver luz no comprimento de onda de incidência, deixando assim de exercer sua ação terapêutica.^{3,35}

O oxigênio singlete, por ser uma espécie extremamente reativa, pode por si levar a degradação dos compostos fotossensibilizadores (os seus próprios precursores iniciais), caracterizando um tipo especial de fotobranqueamento, um exemplo desse tipo de degradação pode ser observado na Figura 1.10.^{35,39}

Uma maneira de se medir o fotobranqueamento de um FS é irradiá-lo com luz visível, num meio saturado com oxigênio, e monitorar a absorbância. Caso ocorra fotobranqueamento, o mesmo será detectado através da queda na intensidade de absorbância do FS. Esse teste é importante, pois a não ocorrência de fotobranqueamento, demonstra que o mesmo não afetará a produção de oxigênio singlete, sendo então eficaz para aplicação na TFD.³⁹

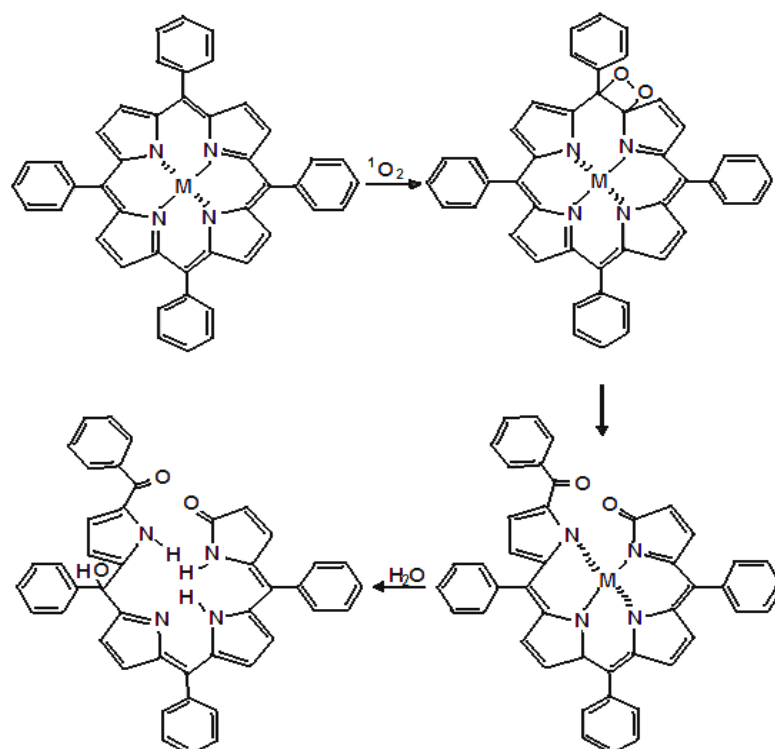


Figura 1.10 – Fotobranqueamento de um composto porfirínico metalado, na presença de oxigênio singlete.³⁵

Para solucionar o problema de fotoxidação da molécula, costuma-se administrar altas dosagens do FS a fim de compensar a sua perda por fotodegradação. Este procedimento, no entanto, pode ocasionar aumento dos efeitos colaterais provocados pela alta concentração do FS, além de aumentar o custo do tratamento.^{35,39}

1.2.6 Inativação Fotodinâmica (PDI) de microorganismos

Sabe-se que as bactérias possuem uma rápida multiplicação, bem como vem apresentando resistência diante de antibióticos, portanto, é importante encontrar novas técnicas antimicrobianas contra as quais as bactérias não sejam capazes de desenvolver resistência.³⁸

A associação a corantes fotossensibilizadores, com uma fonte de luz visível, administrado por via tópica ou sistêmica, potencializa a capacidade de o laser terapêutico produzir inativação microbiana. Microorganismos tais como bactérias, fungos, leveduras e vírus podem ser mortos por luz visível depois de tratamento com um FS apropriado e luz, em um processo denominado Inativação Fotodinâmica (PDI, do termo em inglês “*Photodynamic Inactivation*”). A PDI, sendo efetiva contra vírus, bactérias e fungos, pode ser usada como uma terapia para infecções localizadas, por aplicação local do FS na área infectada com aplicação tópica, gota a gota, injeção intersticial ou aerossol. Estudos realizados, *in vitro*, indicam a redução de micróbios, e ao mesmo tempo, não se tem notícias do desenvolvimento de resistência microbiana à PDI. ^{38,41}

A Terapia Fotodinâmica com finalidade antimicrobiana encontra-se bem estabelecida na literatura, tanto sua ação sobre diferentes bactérias, como sua ação antifúngica, principalmente em casos de infecções localizadas, de pouca profundidade e de microflora conhecida, como as de ocorrência mais frequentes na cavidade oral. Nesse contexto, a utilização de lasers associados à FS são capazes de matar microorganismos patogênicos, surgindo como uma terapia auxiliar ao tratamento odontológico preventivo e restaurador. ^{44,45,46}

Na Odontologia, o laser tem sido empregado na anti-sepsia de feridas; em preparos cavitários; na redução da população bacteriana de canais endodônticos e em bolsas periodontais. Os lasers de alta potência ou cirúrgicos têm sido empregados em cirurgias, enquanto lasers de baixa potência, também denominados terapêuticos ou não-ablativos, têm sido usados em procedimentos terapêuticos clínicos. ^{44,45,47}

Os testes *in vitro* podem detectar toxicidade de substâncias para uso em seres humanos, principalmente aquelas de aplicação clínica, que não devem causar reações adversas nem lesar o paciente. As culturas de células podem ser empregadas com sucesso para este fim, pois são reprodutíveis, de rápida obtenção e economicamente acessíveis. Métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como limitação do número de variáveis experimentais, obtenção de dados significativos mais facilmente e período de teste mais curto.⁴⁸

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. 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, pois apresentam uma membrana externa cobrindo a fina camada de peptídeoglicano. A membrana externa serve como barreira seletiva para a entrada e saída de algumas substâncias da célula, sua estrutura é composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos. Os lipopolissacarídeos estão localizados exclusivamente na camada externa da membrana, enquanto que os fosfolipídeos estão presentes quase completamente na camada interna. A porção lipídica dos lipopolissacarídeos é também conhecida como endotoxina e pode atuar como um veneno, causando febre, diarreia, destruição das células vermelhas do sangue e um choque potencialmente fatal.⁴⁶

Bactérias Gram negativas são agentes infecciosos de sepse neonatal relacionados a altos índices de morbidade e mortalidade. Nos quadros séptico por bactérias Gram negativas de origem intra-hospitalar, que são de difícil tratamento e terapêutica limitada, observam-se, muitas vezes, hemoculturas positivas para cepas

multirresistentes associadas à produção de beta-lactamase, que são enzimas com considerável atividade de hidrólise, e que inativam uma grande variedade de antibióticos beta-lactâmicos. As bactérias produtoras de beta-lactamase mais relatadas na literatura são a *Klebsiella pneumoniae* e a *Escherichia coli*.^{46,49}

A *E. coli* apresenta-se como bastonetes Gram negativos de 1,0 – 1,5 µm de largura e 2,0 – 6,0 µm de comprimento. Cresce em meios comuns, a temperatura ideal para crescimento é de 37⁰ C. As cepas patogênicas de *E. coli* se desenvolvem em ambientes internos ao corpo humano e estão associadas com doenças no intestino (enterite).⁴⁹

A *Staphylococcus aureus*, sendo Gram positiva, é encontrado colonizando a flora natural, principalmente da pele, pode torna-se patogênico em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. Devido sua virulência *S. aureus* pode comprometer organismo humano em infecções sistêmicas, ocasionando septicemia, endocardite, choque tóxico e outras complicações, independente da faixa etária e do ambiente em que foi adquirida a infecção.⁴⁹

1.3 BIOMOLÉCULAS E MICELAS

Algumas moléculas são conhecidas como anfifílicas, que contém tanto uma parte aquo-solúvel (hidrofílica) como uma parte aquo-insolúvel (hidrofóbica, geralmente lipossolúvel). Esses compostos alteram a tensão superficial do meio e são comumente chamados de agentes surfactantes ou tensoativos.

Os anfifílicos formam uma variedade de estruturas moleculares não covalentes que protegem as caudas hidrofóbicas da água. Em concentrações baixas

em água as moléculas de anfifílicas mantêm-se na forma de monômeros. Todavia ao se elevar a concentração, atingindo uma estreita faixa limite conhecida como concentração micelar crítica (cmc), tem-se a formação de micelas (Figura 1.11). As micelas podem ser formadas de fosfolipídeos (lipídeos complexos), por exemplo, onde a parte polar ou hidrofílica fica rodeada de água, e a parte apolar ou hidrofóbica (caudas hidrocarbonadas), ficam seqüestradas no interior. Podemos classificar as micelas aquosas em neutras, catiônicas, aniônicas e zwitteriônicas dependendo da cabeça polar.

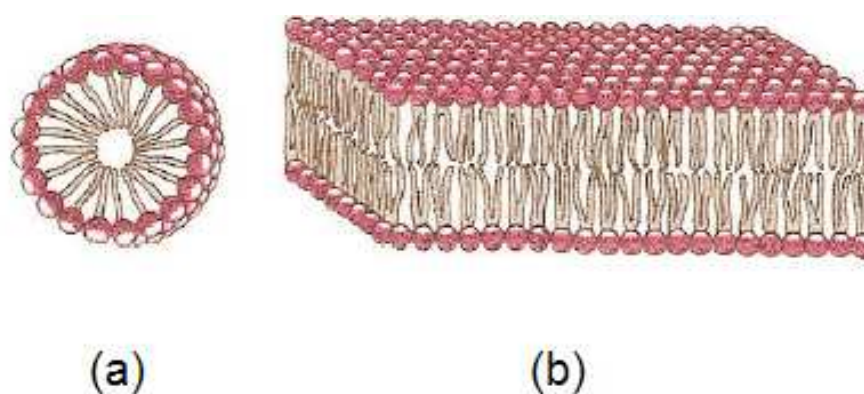


Figura 1.11 - Estrutura de uma micela (a) e de uma bicamada lipídica (b)⁵⁰

Muitas biomoléculas são anfifílicas, como as proteínas, pigmentos, algumas vitaminas, esteróides e fosfolipídios de membrana. As estruturas que compõem essas moléculas são estabilizadas por interações hidrofóbicas ao redor de regiões apolares.⁵¹

Sabe-se que o $^1\text{O}_2$ produzido em soluções aquosas através da excitação de fotossensibilizador pode penetrar no interior de micelas e oxidar os substratos dissolvidos na mesma ou pode ser gerado no interior da micela e difundir através do meio aquoso para uma micela diferente.⁵²

Pesquisas mostraram que as porfirinas altamente hidrofóbicas são capazes de penetrar na região lipídica de membranas. Devido à complexidade das membranas biológicas, utilizam-se modelos mais simples, como surfactantes na forma de micelas, para um estudo inicial de um grande número de fenômenos que ocorrem nas membranas, a fim de obter informações da interação de drogas com as membranas celulares.⁵³

O estudo da interação de porfirina com membranas e outros componentes do tecido e do sangue são importantes porque, em geral, as drogas são introduzidas através da corrente sangüínea, sendo que células cancerosas possuem uma elevada concentração de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na membrana citoplasmática. Então, testes que analisem a associação do fotossensibilizador com modelos simples, permitem prever a capacidade de penetração que a substância apresenta em relação ao sangue e lipoproteínas, que é um fator essencial para sua ação como agente terapêutico.³⁶

Em relação ao estudo de interação do fármaco com membranas celulares, deve-se também levar em conta o fato de que nos organismos vivos existe a variação de pH de acordo com as regiões corpóreas. Embora o pH fisiológico seja ao redor de 7,3, alguns tecidos celulares e intracelulares têm variações micro-locais e a intensa atividade neo-vascular, característica comum em tecidos neoplásicos, aparentemente proporciona aumento de acidez em regiões micro-localizadas.^{45,54} Portanto, a variação do pH é um fator importante a ser analisado, pois o agente fotossensibilizador pode perder a ação fotodinâmica se sofrer mudanças significativas em sua estrutura.

1.4 TESTE DE TOXICIDADE EM *ARTEMIA SALINA*(TAS)

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, é rico em proteínas, vitaminas (principalmente o caroteno) e sais minerais. Seus ovos são facilmente encontrados em lojas de aquaristas.⁵⁵

Os ovos levam de 24 a 36 horas para eclodirem e durante essa operação o aquário deverá ter apenas uma aeração leve, porém constante; a luz deve ser intensa e a temperatura entre 25 e 28°C. Atingindo a fase adulta com apenas de 18 a 24 dias de vida, a *Artemia s.* se reproduz com facilidade, Figura 1.12.

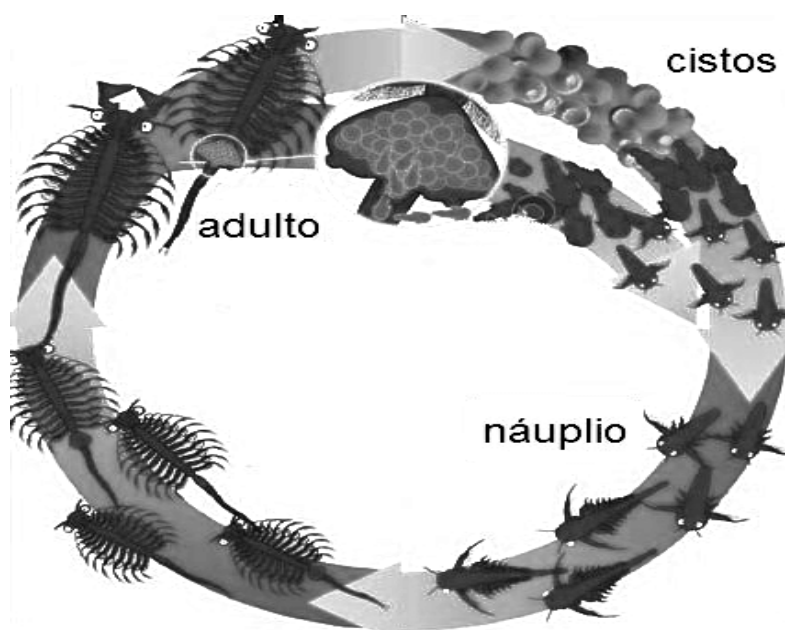


Figura 1.12 – Ciclo de vida da *Artemia salina*.

Sendo um organismo pequeno e de fácil manipulação em laboratório, é utilizado em bio-ensaio na avaliação de toxicidade, principalmente de águas residuais e de extratos naturais. A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e, relativamente simples, monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida dos

microcrustáceos. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bio-ensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica.⁵⁵

Diversos trabalhos^{55,56} tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida e antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras. As frações ou substâncias ativas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação.⁵⁵

1.5 PORFIRINAS $H_2(TNBPYP)$ e $Zn(TPPS_4)$

1.5.1 $H_2(TNBPYP)$

A porfirina base livre brometo de 5, 10, 15, 20-tetrakis(*N*-4-nitrobenzil-4-piridil)porfirina, $Br_4[H_2(TNBPYP)]$, foi sintetizada pelo grupo de pesquisas do professor Dr. Gianluca Azzeline. Na Figura 1.13 está apresentada a estrutura do íon.

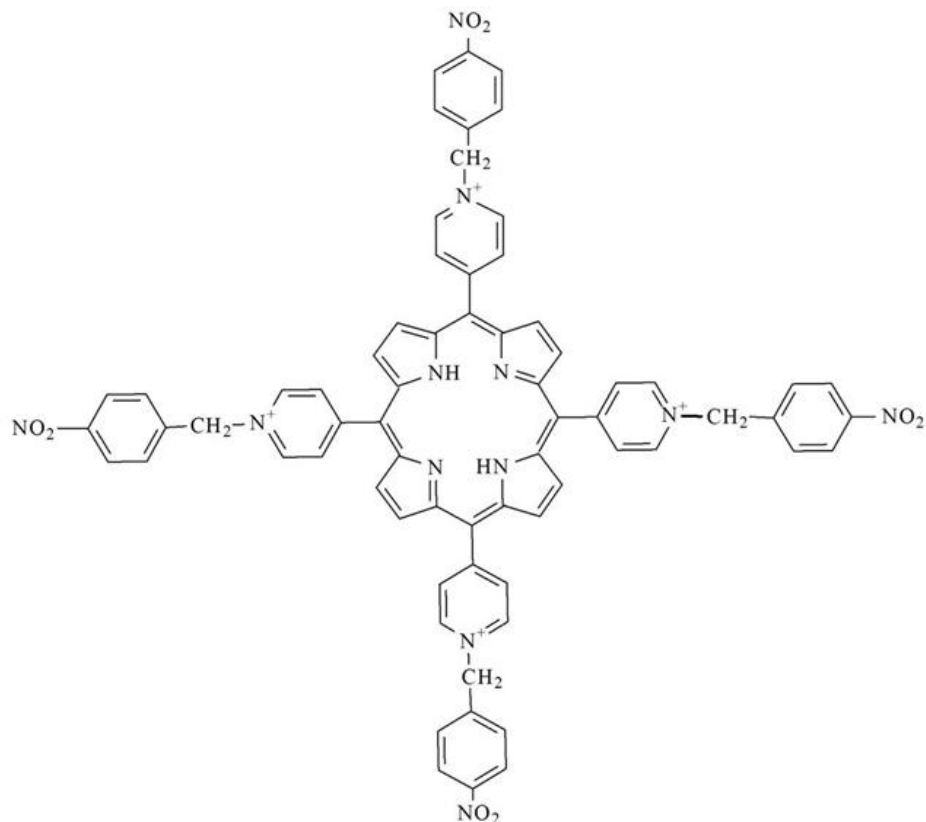


Figura 1.13 – Estrutura da porfirina 5,10,15,20-tetrakis(*N*-4-nitrobenzil-4-piridil)porfirina H₂(TNBPYP).

A hiperconjugação que ocorre quando o substituinte alquílico é o grupo nitrobenzila, por sua vez, origina estruturas de ressonância adicionais e como pode ser observado no esquema a seguir, a carga negativa é transmitida para o substituinte NO₂ aumentando a separação de carga.⁵⁷

Desta forma a densidade de carga positiva δ^+ é maior quando o substituinte na posição 4-benzílica é um aceptor de elétrons e praticamente igual quando é o hidrogênio ou um grupo com características doadoras de elétrons.

Foi realizado um estudo por Soares para investigar as propriedades espectroscópicas de filmes finos entre as porfirinas TNBPYP, TMPYP, TBPYP e metalocomplexos de Zn (II) (ZnP) com a melanina.⁵⁷ Observou-se um deslocamento batocrômico na posição do máximo de absorção da Banda Soret de

aproximadamente 20 nm nos filmes de porfirina em vidro, tanto para as bases livres como para os respectivos ZnP. Foi demonstrado diferentes afinidades do material porfirínico pelo vidro em função da estrutura da porfirina catiônica, sendo a ordem observada TBPYP>TNBPYP>TMPYP. Os ZnP apresentam uma menor afinidade comparativamente às respectivas bases livres, provavelmente devido à existência de moléculas de água coordenadas axialmente que impedem uma aproximação mais efetiva do complexo em relação ao substrato de vidro. Todos os filmes apresentam uma forte emissão de fluorescência. A supressão de fluorescência dos filmes do tipo porfirina-melanina-porfirina (p-m-p) segue a ordem TNBPYP>TBPYP>TMPYP, indicando que as porfirinas mais hidrofóbicas interagem mais fortemente com o polímero da melanina nestes filmes. Isso sugere que derivados porfirínicos são promissores na construção de sensores e na elaboração de sistemas de diagnóstico de tumores melanóticos.⁵⁷

1.5.2 ZnTPPS₄

A metaloporfirina 5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-(sulfonatofenil)porfirina zinco(II), Zn(TPPS₄), é um composto de caráter aniônico e água-solúvel, cuja estrutura é apresentada na Figura 1.14.

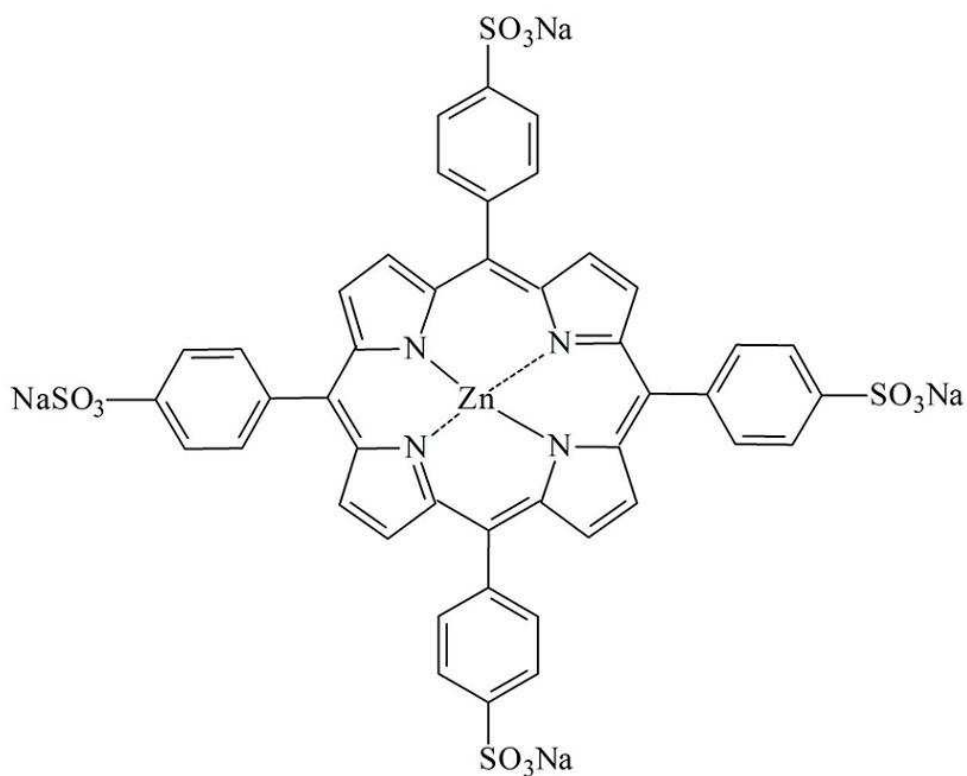


Figura 1.14 – Estrutura da porfirina 5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-(sulfonatofenil)porfirina zinco(II), Zn(TPPS₄).

Gandini e colaboradores verificaram que as metaloporfirinas FeTPPS₄ e ZnTPPS₄ interagem com micelas iônicas⁵⁸. Esse resultado indica que também possam ocorrer interações desses compostos com membranas celulares. Os resultados apresentados por Gandini comprovaram a presença de três espécies de porfirinas em equilíbrio na presença de cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC) de caráter catiônico. A formação de agregados não micelares ocorre abaixo do cmc, e em concentrações mais elevadas de surfactantes tem-se a razão crítica de surfactante/metaloporfirina, os agregados não micelares se decompõem de acordo com a espécie de porfirina e/ou ligação com a micela. O fato de ter ocorrido mudanças espectroscópicas com a porfirina Zn(TPPS₄), indica que a mesma é afetada pela presença dos surfactantes ocorrendo interação entre essas espécies o

que leva ao questionamento de que metaloporfirinas carregadas podem interagir com membranas celulares.⁵⁸

Estudos sobre o comportamento da $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$ nas matrizes de TiO_2 obtida pelo processo sol-gel demonstraram diminuição da absorção da amostra durante o processo de secagem, o que evidenciou uma extensa decomposição da molécula. O espectro de emissão apresentado na Figura 1.15 mostra as duas bandas desta porfirina, a 600 e 650 nm, acompanhadas de uma banda menor a 715 nm, que pode ser atribuída à forma agregada de TPPS protonada ($\text{H}_4\text{TPPS}^{2-}$). Esta é originária da forte desmetalção da porfirina de zinco.⁵⁹

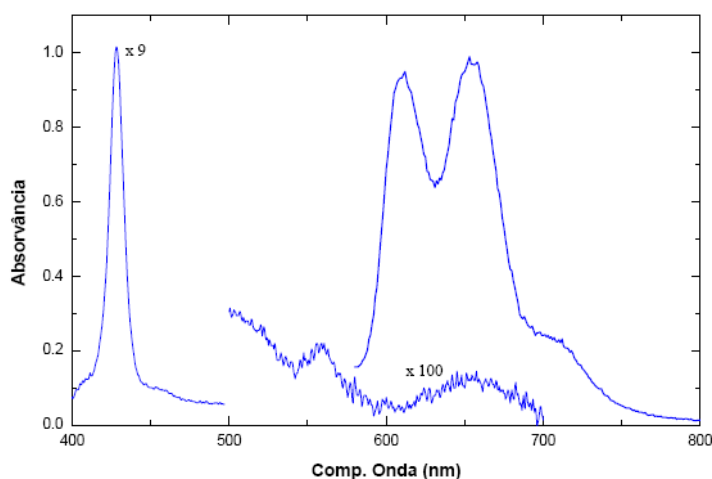


Figura 1.15 – Absorção e emissão de $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$, em matrizes de TiO_2 .⁵⁹

A comparação do comportamento da zinco porfirina em matrizes de TiO_2 com matrizes de SiO_2 revelou que nestas últimas a porfirina se encontra mais acessível a agentes externos, enquanto que nas matrizes de TiO_2 a principal interação ocorre com a matriz.⁵⁹

Kolarova e colaboradores, comparando os fotossensibilizadores por detecção de espécies reativas de oxigênio após reações fotodinâmicas *in vitro*,

verificou que uma concentração da $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$, de 10×10^{-6} mol/L induz efeitos fotodinâmicos em células de melanoma G361 com intensidade de luz de 5 mW cm^{-2} e com irradiação total de 5 J cm^{-2} usando LEDs como fontes de radiação.⁶⁰

Mendes analisou a porfirina $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$, determinou o pK da mesma na ausência e na presença dos surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS), *n*-hexadecil-*N,N*, dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), 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. Também foi avaliada a capacidade de agregação, 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. Com isso, observou-se que 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. Foi analisada a capacidade de reações de fotobranqueamento 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. Em relação aos testes microbiológicos verificou-se que o maior índice de mortalidade sobre *A. salina* ocorre na presença das porfirinas e sob iluminação, indicando ação fotodinâmica das porfirinas sobre esse microrganismo. No teste que realizou com a *E. coli*, evidenciou-se maior inibição no crescimento das colônias desse microrganismo quando as

mesmas foram tratadas com porfirinas e luz, com isso relatou que a porfirina pode ter características favoráveis como FS na TFD.⁶¹

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial fotossensibilizador das porfirinas 5, 10, 15, 20 – tetrakis (*N*-4-nitrobenzil-4-piridil)porfirina, $H_2(TNBPYP)$ e 5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-(sulfonatofenil)porfirina zinco(II), $Zn(TPPS_4)$, para uso na terapia fotodinâmica (TFD).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar espectroscopicamente (UV-Vis) a porfirina $H_2(TNBPYP)$ em meio homogêneo e heterogêneo, micela dos surfactantes SDS, CTAB e HPS;

Realizar testes de fotobranqueamento para verificar a degradação das porfirinas;

Determinar a capacidade de agregação dessas porfirinas em meios de água/etanol;

Verificar o potencial de produção de oxigênio singlete dessas porfirinas, através do teste do ácido úrico;

Testar a ação fotodinâmica das porfirinas analisadas frente à *Artemia salina* e com a bactéria *Staphylococcus aureus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Neste trabalho utilizou-se a porfirina catiônica, 5, 10, 15, 20 – tetrakis (*N*-4-nitrobenzil-4-piridil)porfirina, $H_2(TNBPYP)$ ($C_{68}H_{50}N_{12}Br_4O_8 \cdot 7H_2O$ MM = 1616 g/mol) (Figura 1.13) que foi sintetizada e cedida para análises pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Gianluca C. Azzellini do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.⁹⁰ Também foi utilizada a porfirina aniônica, 5, 10, 15, 20 – tetrakis (4-(sulfonatofenil)porfirina zinco(II), $Zn(TPPS_4)$ ($ZnC_{44}H_{24}N_4S_4Na_4O_{12}$ MM = 1086,29 g/mol) (Figura 1.14), sintetizada e cedida para análises pelo grupo de pesquisa do laboratório de Bioinorgânica e Catálise coordenado pela professora Dr^a. Shirley Nakagaki da Universidade Federal do Paraná.

Utilizou-se os modelos biomiméticos constituídos de micelas de surfactantes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) da Sigma, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) da Riedel de Haën e *N*-hexadecil – *N,N*, dimetil – 3 –amônio – 1 – propanosulfonato (HPS) da Sigma.

Todos os compostos foram utilizados sem purificações prévias. Em todas as medidas utilizou-se reagentes de qualidade PA e água destilada.

O espectrofotômetro Cary 100 Varian, foi utilizado para medidas de absorção ótica, assim como as cubetas de quartzo com 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 EM ÁGUA

Preparou-se soluções das porfirinas $H_2(TNBPYP)$ e $Zn(TPPS_4)$ com diversas concentrações abaixo de 10^{-4} mol/L. Obteve-se o espectro de absorção ótica de cada solução na faixa de 300 a 700 nm. Calculou-se o coeficiente de absortividade molar para cada porfirina em água através de dados de absorbância em função da concentração.

3.3 ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA PORFIRINA $[H_2(TNBPYP)]$ COM VARIAÇÃO DE pH E COM A PRESENÇA DE SURFACTANTES

3.3.1 Análise espectrofotométrica com variações de pH em água

Preparou-se 80 mL de solução de porfirina $H_2(TNBPYP)$ utilizando uma pequena parte sólida da porfirina que solubilizou-se em água destilada e deionizada atentando para que a absorbância da solução não passasse de 1,0 na banda Soret. Separou-se em 4 alíquotas de 20 mL para meio ácido e básico. Calibrou-se o pHmetro de acordo com a medida ácida ou básica. As leituras no espectrofotômetro (UV/Vis) foram realizadas na faixa de 350-650 nm. Mediu-se o pH inicial da solução da porfirina e após estabilizar, realizou-se a leitura no aparelho. Para medidas em meio básico preparou-se soluções de NaOH nas concentrações (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 mol/L) e com auxílio de uma micropipeta, foi adicionado para cada medida pequenas alíquotas de NaOH até que a solução ficasse próximo de pH 14,0, o

mesmo procedimento foi realizado para o meio ácido com o HCl nas mesmas concentrações até que o pH ficasse próximo de 0,0, e a cada variação de 0,5 no pH realizou-se uma medida no aparelho de (UV/Vis). O volume total de solução de NaOH ou HCl adicionado ao final de cada experimento foi menor que 10% do volume inicial, isto é, não ultrapassou 2 mL. Os testes foram feitos em triplicata.

3.3.2 Análise espectrofotométrica com alteração de pH em acetato/fosfato

Utilizou-se acetato de sódio P.A. e fosfato de sódio P.A., pesou-se as massas necessárias para que se obtivesse uma solução 20 mmol/L de cada um dos reagentes em água deionizada.

Preparou-se 80 mL de solução de porfirina $H_2(TNBPYP)$ utilizando-se como solvente solução de acetato-fosfato (20 mmol/L). Separou-se as alíquotas para as medidas em meio ácido e básico, e utilizando o mesmo procedimento anterior para as medidas em água, registrou-se a leitura no espectrofotômetro (UV/Vis) entre 350-650 nm a cada variação de pH. Todos os testes foram feitos em triplicata.

3.3.3 Análise espectrofotométrica com alteração de pH com surfactantes HPS, CTAB e SDS

Foram preparadas as soluções de surfactantes HPS, CTAB e SDS em solução de acetato-fosfato 20 mmol/L, pesou-se uma massa de cada surfactante para obter uma solução de 20 mmol/L para o HPS e CTAB e 40 mmol/L para o SDS.

Preparou-se 80 mL de solução de porfirina $H_2(TNBPYP)$ nas soluções de surfactantes. Separou-se em alíquotas para as medidas em meio ácido e básico. A absorbância foi medida em função do pH, variando este de 0,0 a 14,0 com a adição de soluções de HCl para o meio ácido e soluções de NaOH para o meio básico, semelhante o procedimento para o meio aquoso. Fez-se o monitoramento a cada 0,5 unidades de pH, com isso registrou-se o respectivo espectro de absorção da faixa de 350 a 650 nm. Todos os testes foram feitos em triplicata.

3.4 ANÁLISE DA AGREGAÇÃO DA PORFIRINA $H_2(TNBPYP)$ EM MISTURAS DE ÁGUA/ETANOL

As soluções de água/etanol foram preparadas através da mistura de volumes pré-determinados dos dois solventes ⁶². Analisou-se a influência do aumento do teor de água ao solvente etanol com a finalidade de avaliar a capacidade de agregação das porfirinas. Variou-se a porcentagem de água em 0; 20; 30; 40; 50; 60; 80 e 100%. As medidas espectroscópicas foram realizadas em cubetas de quartzo (caminho ótico de 1,00 cm) a 25 °C com adição de 300 μ L de solução da porfirina $H_2(TNBPYP)$ $6,2 \times 10^{-5}$ mol/L. Registrou-se um espectro de absorção na faixa de 300 a 700 nm para cada uma das misturas preparadas. Testes feitos em triplicata.

3.5 REAÇÕES DE FOTOBRANQUEAMENTO

Fez-se as medidas espectroscópicas na faixa de 300-700 nm. Iluminou-se a solução de porfirina (dentro de cubeta de quartzo) com um sistema de seis LEDs em

série (Figura 3.1), cada um com uma potência equivalente a 5 mW, totalizando 30 mW. Utilizou-se LEDs vermelhos e laranja para $H_2(TNBPpP)$. A cada 5 minutos de iluminação, a solução foi levada ao espectrofotômetro para nova leitura na mesma faixa de comprimento de onda, totalizando um período de iluminação de 1 hora.⁶² Realizou-se o mesmo procedimento para a porfirina $Zn(TPPS_4)$ iluminando com LEDs laranja e verde, durante uma hora.

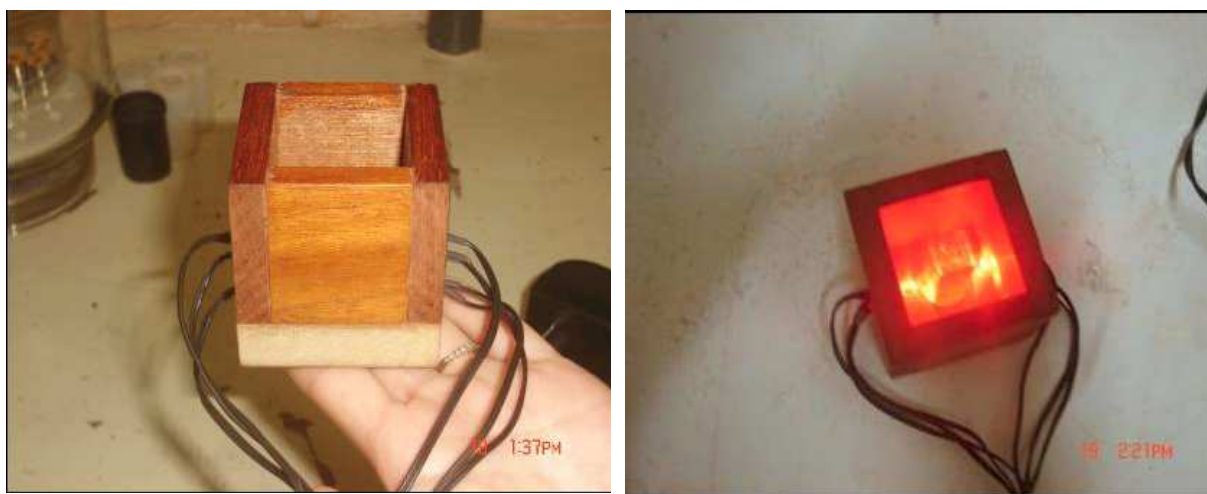


Figura 3.1 – Fotos do sistema de LEDs utilizado para iluminação das soluções de porfirinas

O sistema de iluminação utilizado foi proposto pelo grupo de pesquisas do Prof. Dr. N. Hioka da Universidade Estadual de Maringá e descrita por Soares.⁶²

3.6 TESTE DO ÁCIDO ÚRICO

O teste do ácido úrico permite avaliar a capacidade da porfirina em gerar oxigênio singlete, que é essencial para a TFD do tipo II. A absorbância foi medida entre 200 e 800 nm, pois a absorbância do ácido úrico apresenta banda de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ em 293 nm. Este teste foi realizado de acordo com adaptações da metodologia desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. N. Hioka, da

Universidade Estadual de Maringá e descrita por Soares.⁶² 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 a solução da porfirina $H_2(TNBPYP)$ ou da $Zn(TPPS_4)$ de modo que a concentração destas ficasse na ordem de 10^{-6} mol/L. Transferiu-se a solução contendo ácido úrico e porfirina para uma cubeta de quartzo e fez-se a leitura espectroscópica na faixa de 200 a 800 nm. Em seguida iluminou-se a solução de porfirinas com um sistema de LEDs vermelho, laranja e verde. 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 empírica, descrita abaixo na qual o Hioka e colaboradores sugeriram⁶³ e com adaptações para sistemas com LEDs:

$$AF = \Delta A_{AU} \times 10^5 / W \times t \times AP_{s\lambda irr} \text{ (equação 1)}$$

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;
- $AP_{s\lambda irr}$: 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)

Realizou-se o ensaio de toxicidade das porfirinas sobre a *Artemia salina* utilizando-se adaptações da metodologia de Meyer.^{61,62,64} Os ovos de microcrustáceo foram adquiridos em loja de artigos para aquários, sendo estes do fabricante Maramar Aquacultura.

Colocou-se os ovos de *Artemia salina* para eclodirem em 2 L de solução salina 3,8 g/L num recipiente retangular, constituído de dois compartimentos, um protegido da luz e outro iluminado por uma lâmpada fria de 14 W (Figura 3.2) a temperatura de 25 °C. Os ovos foram adicionados no compartimento protegido da luz, e após 48 horas foram coletados 20 microcrustáceos do compartimento iluminado e colocados em tubos de ensaio, em seguida adicionou-se pequenos volumes de solução de porfirina para obter as concentrações desejadas, sendo que a esse volume completou-se com solução salina até 3 mL. As amostras foram divididas em dois grupos:

I) O submetido à iluminação com LEDs vermelho e laranja para a porfirina $H_2(TNBPpP)$, e com LEDs vermelho, laranja e verde para a porfirina $Zn(TPPS_4)$, estas iluminadas por uma hora;

II) O sem iluminação, incluindo o controle que não possui solução das porfirinas e que ficou protegido da luz.

Após o tempo de irradiação, esperou-se duas horas para fazer a contagem do número de microcrustáceos vivos e mortos em cada tubo de ensaio. Os testes foram realizados em triplicata para cada medida.



Figura 3.2 – Recipiente utilizado para eclosão dos ovos de *Artemia salina*.

3.7.2 Ensaio *in vitro*: cultura bacteriana

Neste experimento utilizou-se a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, fornecida pelo laboratório de Microbiologia da UEPG. Preparou-se 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.

Da suspensão preparada pipetou-se 10 μ L e depositou-se em tubos contendo 2 mL de meio nutritivo BHI – infusão de cérebro e coração, em seguida adicionou-se solução de porfirina, ficando a solução com concentração desejada desse composto. Os tubos foram separados em dois grupos, sendo que todos estavam envolvidos com papel alumínio para não receberem irradiação ambiente.

A) Os submetidos à iluminação de LEDs vermelhos (emissão na faixa de 620 a 680 nm);

B) Os submetidos à iluminação de LEDs laranjas (emissão na faixa de 580 a 610 nm).

Os tempos de iluminação em cada um dos sistemas de LEDs foi de 2; 10 e 30 minutos. Fez-se ainda os seguintes controles:

- I) presença de iluminação e ausência de porfirina;
- II) presença de porfirina e ausência de iluminação;
- II) ausência de iluminação e porfirina (controle geral).

Fez-se a homogeneização das soluções antes e após a irradiação, agitando-se por cerca de 15 segundos em um aparelho vortéx Quimis e coletou-se 10 µL de cada um dos tubos semeando-se em placas de Petri contendo Agar BHI. 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).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORTIVIDADE MOLAR DAS PORFIRINAS EM ÁGUA

Neste trabalho, foi realizada a caracterização espectroscópica dos compostos $H_2(TNBPYP)$ e $Zn(TPPS_4)$. Os espectros de absorção característicos das porfirinas são apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2, respectivamente. Foram observados espectros típicos de porfirinas base livre e metaloporfirinas.

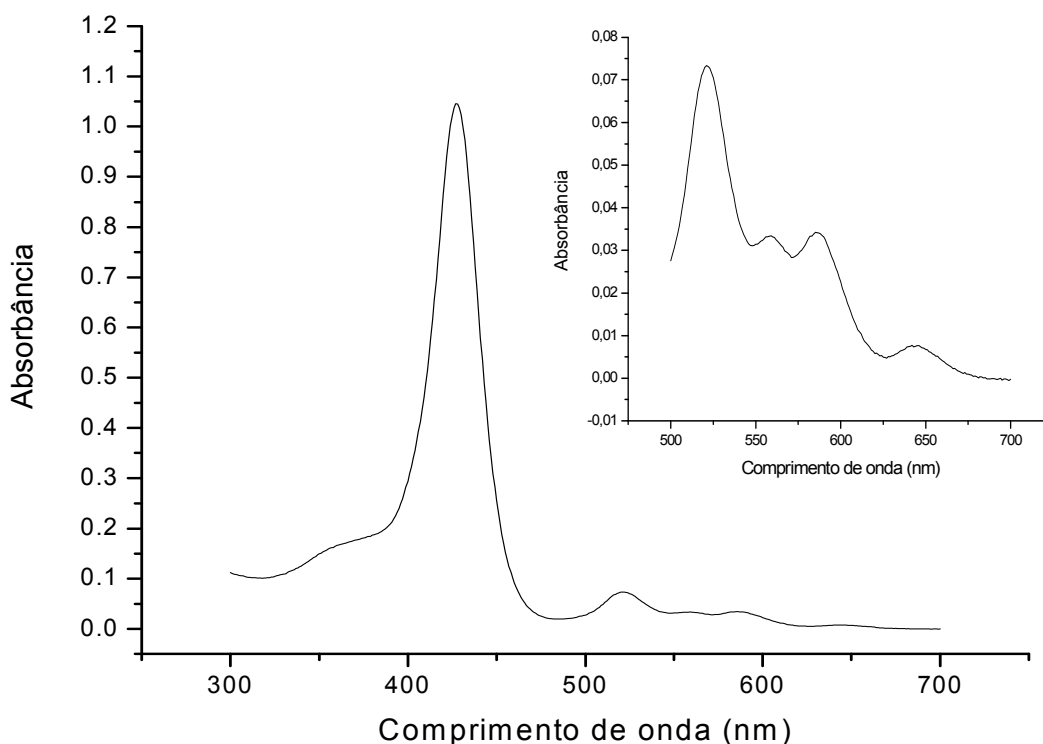


Figura 4.1 – Espectro de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ $6,2 \times 10^{-5}$ mol/L em água e espectro expandido da faixa das bandas Q.

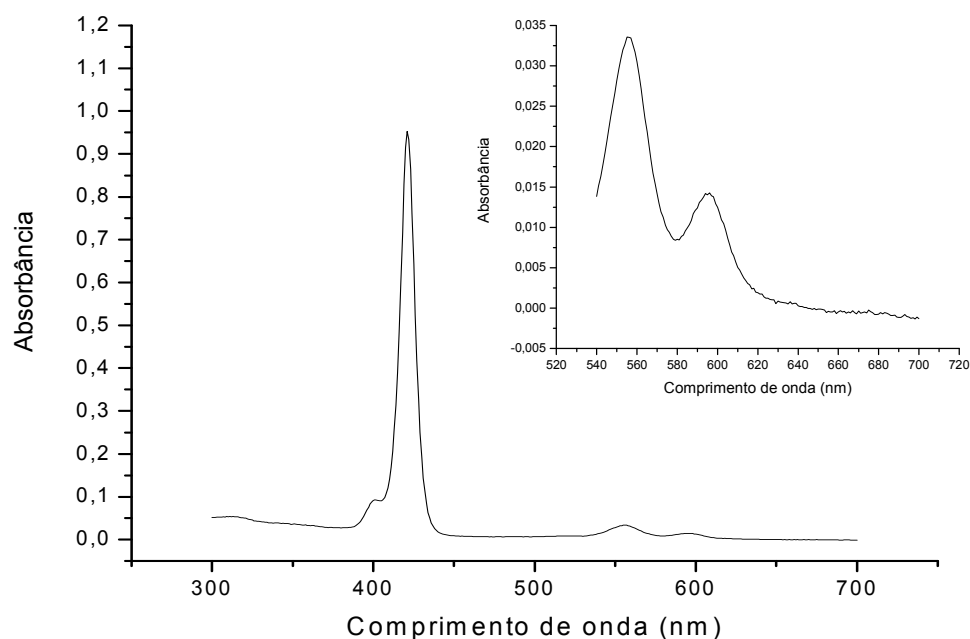


Figura 4.2 – Espectro de absorção da porfirina Zn(TPPS₄) $9,2 \times 10^{-5}$ mol/L em água e espectro expandido da faixa das bandas Q.

Nos espectros de absorção, característico de cada composto, verificamos uma banda extremamente intensa, na região de 400 nm (banda Soret), com $\lambda_{\text{máx}}$ específico para cada um dos compostos analisados. Na região de 500 a 700 nm foram observadas as bandas Q, para a H₂(TNBPyP) (base livre) observadas 4 bandas, para a Zn(TPPS₄) (metaloporfirina), observou-se duas bandas, como esperado, já que a presença do íon resulta em mudanças na simetria da molécula.

Os $\lambda_{\text{máx}}$ para cada banda, assim como os coeficientes de absortividade molar (ϵ) calculados de cada composto estudado são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Coeficientes de absorvidade molar (ϵ) e máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) para os compostos Zn(TPPS₄) e H₂(TNBPyP) em água

Porfirina		Soret(B)	Q I	Q II	Q III	Q IV
H₂(TNBPyP)	$\lambda_{\text{máx}}, \text{nm}$	428	522	559	586	642
	$\epsilon \times 10^5 \text{ (L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$	5,45	0,34	0,13	0,15	0,24
Zn(TPPS₄)	$\lambda_{\text{máx}}, \text{nm}$	421	555	595	-	-
	$\epsilon \times 10^5 \text{ (L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})$	2,89	0,11	0,05	-	-

Comparando-se os dados obtidos na caracterização por absorção ótica (Tabela 4) para a H₂(TNBPyP) com os resultados apresentados por Soares⁵⁷ para a mesma porfirina em tampão fosfato, observou-se total concordância com relação a posição dos máximos de absorção e maiores (ϵ) do que os determinados por Soares em tampão fosfato. O meio utilizado nas duas determinações deve ser fator determinante das diferenças observadas.

Os valores de ϵ e $\lambda_{\text{máx}}$ obtidos para a metaloporfirina Zn(TPPS₄) são próximos dos relatados por Kadish⁴², que também foram determinados em meio aquoso. Para a banda Soret, Kadish observou-se $\lambda_{\text{máx}}$ de 422 nm com ϵ de $3,48 \times 10^5 \text{ L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ e os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ para as bandas QI e QII são 556 nm e 595 nm e 0,15 e $0,06 \times 10^5 \text{ L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, respectivamente.

4.2 ESTUDO ESPECTROFOTOMÉTRICO DA PORFIRINA $H_2(TNBPYP)$ SOB VARIAÇÃO DE pH NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE SURFACTANTES

É importante analisar as propriedades espectroscópicas das porfirinas sob a influência do pH visando o uso como fotossensibilizadores para a TFD, pois estes, frente a diferentes pHs do meio corpóreo, devem manter-se estáveis, sendo que, em grande parte os fotossensibilizadores são introduzidos através da corrente sanguínea em concentrações na faixa de 10^{-5} a 10^{-6} mol/L. Dessa maneira, realizou-se o estudo da variação de pH da porfirina $H_2(TNBPYP)$, em água e acetato/fosfato, como também na presença dos surfactantes HPS (zwiteriônico), SDS (aniônico) e CTAB (catiônico).

Para a porfirina $Zn(TPPS_4)$, o grupo de pesquisas SCEOM – Síntese e Caracterização Espectroscópica de Compostos Orgânicos e Materiais da UEPG em trabalhos anteriores analisou a porfirina em diferentes pHs bem como em presença ou não de surfactantes. O comportamento espectral da porfirina $Zn(TPPS_4)$, 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 (zwiteriônico). 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.⁶¹

4.2.1 Estudo espectrofotométrico em meio ácido

Com a acidificação da solução de $H_2(TNBPYP)$ em água, observa-se uma diminuição gradativa na absorbância da banda Soret e posterior deslocamento da banda de 426 nm para 452 nm, Figura 4.3. Portanto, há modificação dos espectros da porfirina com a diminuição do pH, mostrando que os íons H^+ interagem com a estrutura da porfirina, alterando seu sistema eletrônico e conseqüentemente sua absorbância. A presença de uma nova espécie é comprovada pelo deslocamento do comprimento de onda da banda Soret para 452 nm e pela presença do ponto isosbético em 440 nm. No entanto, essa mudança em água, só ocorreu em pHs menores que 2,0, onde é observada inclusive a alteração da cor da solução de marrom claro para esverdeada. Esse comportamento, já foi observado anteriormente em outras porfirinas tetrapirrólicas.^{53,65} As porfirinas catiônicas piridínio substituídas, quando em meio neutro, apresentam dois prótons nos nitrogênios pirrólicos, estando na forma de base livre (H_2P). Em meio ácido, a porfirina pode ser protonada por até dois H^+ , formando as espécies monoprotonada (H_3P^+) e diprotonada (H_4P^{2+}). Geralmente, as porfirinas apresentam cor violeta quando protonadas, mas algumas meso substituídas apresentam a cor verde na forma ácida.^{53,65} Esse comportamento é explicado pelas interações entre o anel piridil e o sistema π do macrociclo. Devido às interações do tipo van der Waals e Coulombianas envolvidas, o anel perde a sua planaridade com a inserção do primeiro próton, aumentando as interações entre o substituinte meso e o anel porfirínico, originando a cor verde, a nova configuração eletrônica da molécula facilita à entrada do segundo próton originando a forma diprotonada H_4P^{2+} .^{53,65}

Como mencionado na descrição da metodologia, o volume da solução utilizado no experimento é de 20 mL e as alíquotas adicionadas são de no máximo 20 μL , portanto, a diminuição de absorbância observada não pode ser explicada por diluição da solução.

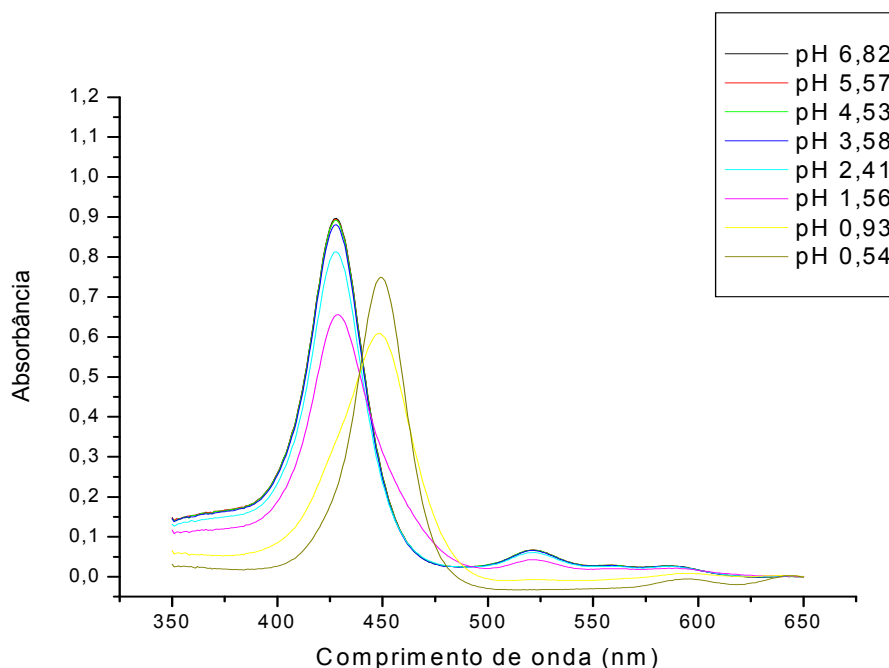
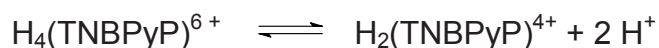


Figura 4.3 – Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPYP})$ em água na faixa de pH entre 7,0 e 0,5.

Com base nos resultados apresentados e na análise da literatura descrita, propõe-se que na faixa de pH de 0,5 a 7,0 tem se equilíbrio entre as espécies $\text{H}_2(\text{TNBPYP})^{4+}$ e $\text{H}_4(\text{TNBPYP})^{6+}$ como segue:



O espectro com a banda Soret centrada em 452 nm foi atribuído à forma diprotonada $\text{H}_4(\text{TNBPYP})^{6+}$ e o espectro com a banda centrada em 426 nm foi

atribuído a espécie $H_2(TNBPYP)$. O gráfico com variação de absorbância nesse comprimento de onda em função do pH é apresentado na Figura 4.3. O ajuste dos dados apresentados nas Figuras 4.4 usando a função sigmoideal fornece um pK de 1,2.

Analisando as Figuras 4.3 e 4.4, verificou-se em que faixa de pH a porfirina manteve-se estável (faixa de pH 7 a 2,5). Essa informação é importante, pois estudos mostram que as células cancerosas têm pH menor que células sadias. Também deve-se analisar a questão de formação dos agregados. Pois alguns agregados derivam da formação prévia de formas protonadas das porfirinas, a repulsão existente de monômeros, causada pela forte densidade eletrônica do anel central pode ser atenuada com a inserção de cargas positivas no centro desse mesmo anel, que assim favorece a interação entre os monômeros.⁶⁶ Na faixa de concentração de porfirina que utilizou-se (10^{-5} – 10^{-6} mol/L) não observou-se indicação de agregação. Para descartar-se totalmente essa possibilidade precisam ser realizados experimentos com outras técnicas, tais como fluorescência molecular e RMN que indicariam mais claramente caso estivesse ocorrendo a formação de agregados.

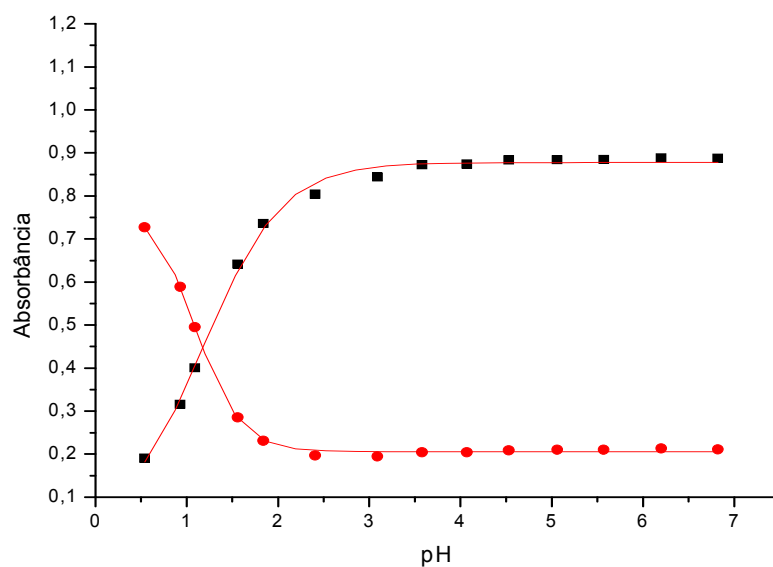


Figura 4.4 – Gráfico de absorvância de porfirina $H_2(TNBPYP)$ em solução aquosa em função do pH em (■) 426 nm e (●) 452 nm.

Ao analisar os dados dos testes com a solução da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em solução de acetato/fosfato 20 mmol/L em meio ácido, observa-se o mesmo comportamento já visto em água. Os resultados de um dos experimentos é apresentado na Figura 4.5.

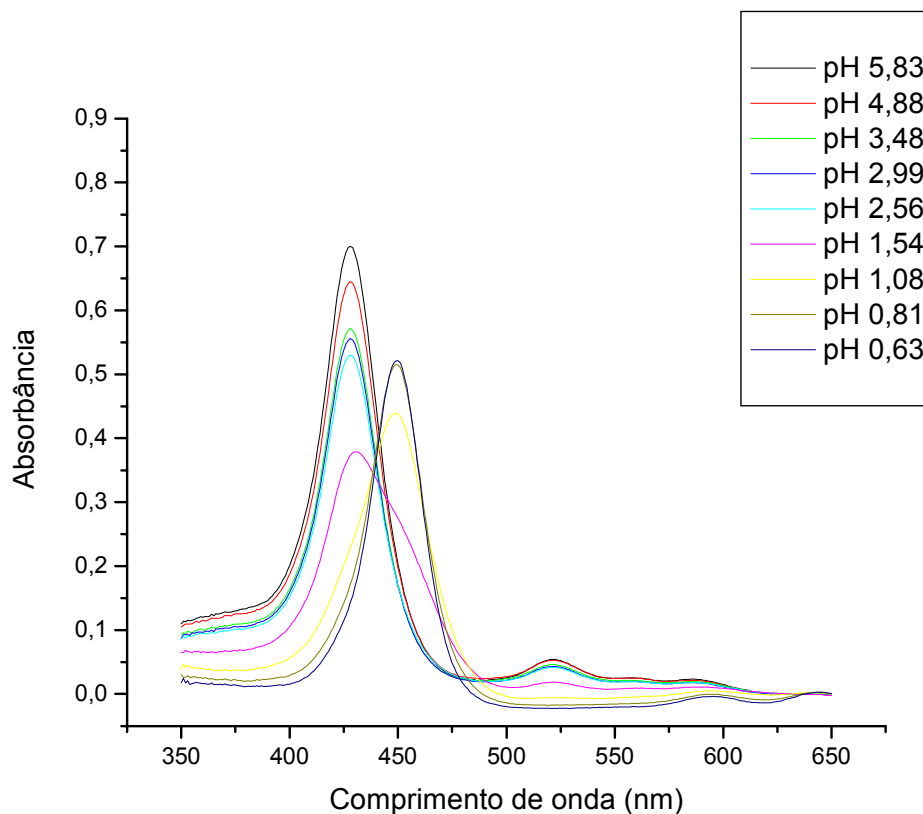


Figura 4.5 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPyP)$ em acetato-fosfato, em pH's entre 6,0 e 0,5

Os resultados apresentados são concordantes com os descritos na literatura para outras porfirinas piridínio substituídas.^{53,67} O ajuste dos dados experimentais utilizando-se uma função sigmoidal, permitiu a obtenção dos valores de pK para a transição da primeira para a segunda espécie (pK_1). Foram observadas pequenas alterações quando comparados os pKs obtidos em água (1,2) e acetato-fosfato (1,3), isso mostra que a força iônica do meio, influenciou pouco no valor de pK e que a porfirina é estável com a variação do pH na faixa de 6,0 a 2,0.

Para obter informações preliminares sobre a interação das porfirinas com as membranas celulares, foi utilizado como modelo os surfactantes na forma de

micelas. Embora as micelas sejam um modelo bastante simplificado das membranas biológicas, o estudo das propriedades espectroscópicas das porfirinas nas micelas, pode dar subsídios importantes para a compreensão da interação de porfirinas com a membrana biológica, pois, quando utilizadas como fármaco, podem ser introduzidas através da corrente sanguínea.^{42,53, 58,68}

Estudos mostram que as porfirinas altamente hidrofóbicas são capazes de penetrar na região lipídica de membranas, e as moderadamente hidrofóbicas distribuem-se preferencialmente nas partes polares de membranas ricas em proteínas.^{32,69}

Para avaliar o efeito das micelas no valor de pK do equilíbrio entre as formas $H_2(TNBPYP)^{4+}$ e $H_2(TNBPYP)^{6+}$ realizaram-se experimentos para análise da absorbância das porfirinas em função do pH em concentrações fixas de porfirina e surfactantes. Foram realizados os experimentos com os surfactantes *N*-hexadecil-*N,N*, dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS), que é zwitteriônico, dodecil sulfato de sódio (SDS), um surfactante aniônico, e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) que é catiônico, e as concentrações utilizadas foram maiores que a concentração micelar crítica (cmc) para garantir a interação porfirina-micela.

Nos experimentos realizados em presença de micelas de HPS o espectro de absorção da solução de porfirina é muito semelhante ao observado em meio aquoso. O $\lambda_{m\acute{a}x}$ da banda Soret ocorre em 430 nm (Figura 4.6). O comportamento espectral com a variação do pH também foi semelhante ao observado para o composto em água. Analisando-se a variação do $\lambda_{m\acute{a}x}$ da banda Soret e com o ajuste dos pontos pela função sigmoidal, observa-se na Figura 4.7, que a porfirina manteve-se estável na faixa de pH que vai de 6 até aproximadamente 2, com pK em 1,3.

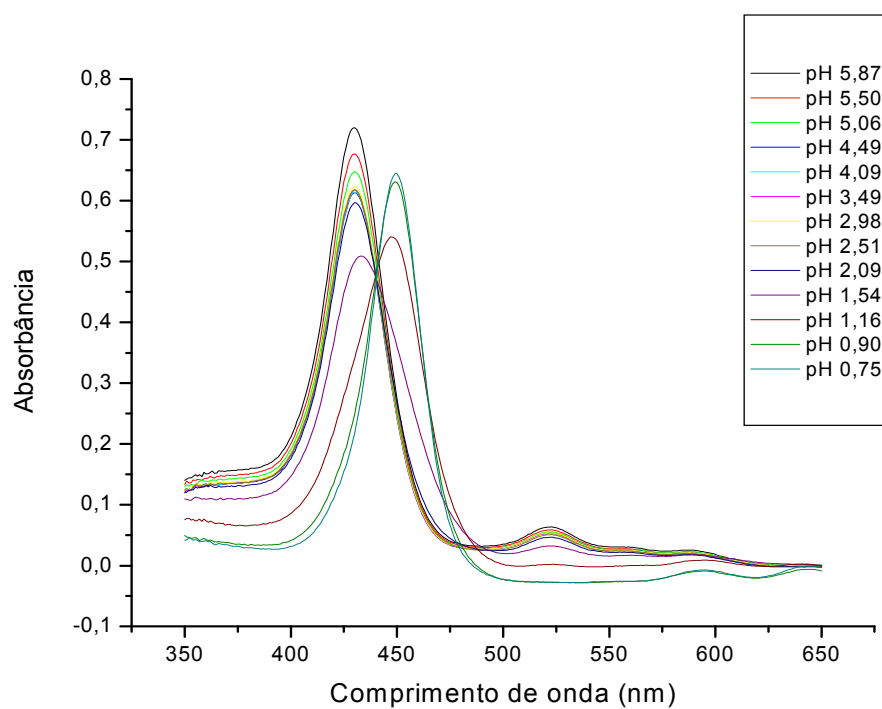


Figura 4.6 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPyP)$ em acetato-fosfato na presença de HPS (20 mmol/L), em pH's entre 6,0 e 0,5.

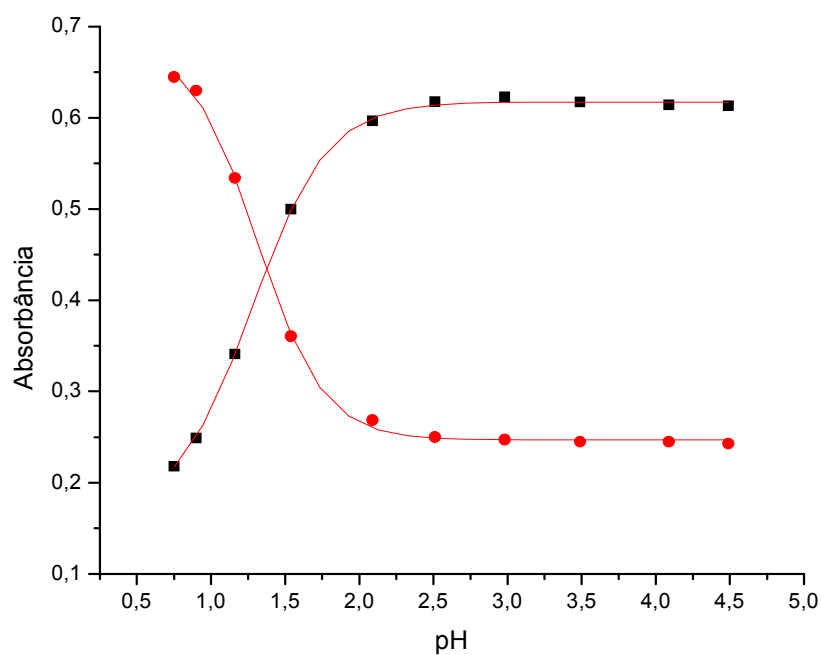


Figura 4.7 – Gráfico da absorbância da porfirina $H_2(TNBPyP)$ em acetato-fosfato na presença de HPS (20 mmol/L), em função do pH em (■) 430 nm e (●) 450 nm.

Nos experimentos com o surfactante CTAB, de caráter catiônico, obteve-se um espectro com as mesmas características para experimentos realizados em meio aquoso ou em acetato-fostato. Com a variação do pH foi observado o deslocamento da banda Soret, de 428 nm para 450 nm (Figura 4.8). Utilizando-se a variação de absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$, determinou-se um pK igual a 1,7 que é um pouco superior aos observados em meio homogêneo (Figura 4.9). Os resultados comparativos são apresentados na Tabela 5. Os resultados indicam que a presença das micelas de CTAB influenciou no equilíbrio:

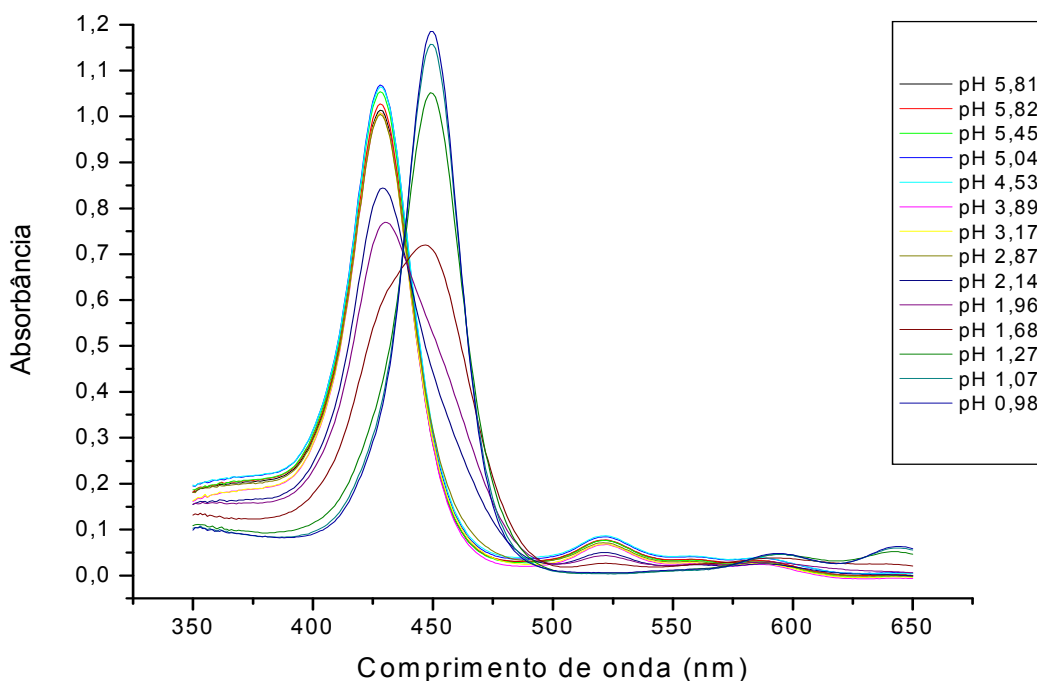
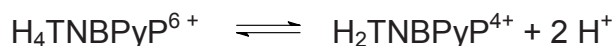


Figura 4.8 – Espectros de absorção da porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPYP})$ em acetato-fosfato na presença de CTAB (20 mmol/L), em pH's entre 6,0 e 0,5.

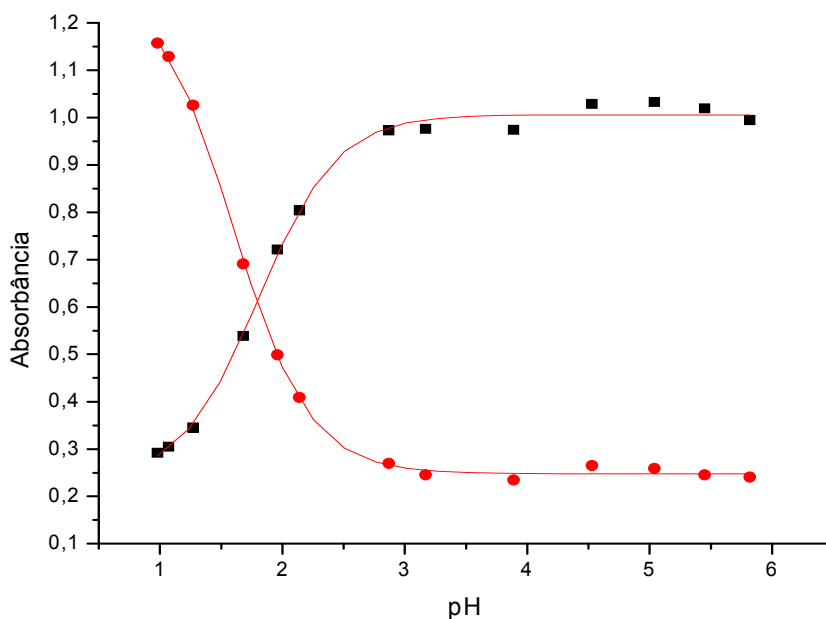


Figura 4.9 – Gráfico da absorbância da porfirina H₂(TNBPYP) em acetato-fosfato na presença de CTAB (20 mmol/L), em função do pH em (■) 428 nm e (●) 450 nm.

Nos experimentos realizados na presença do surfactante SDS (40 mmol/L), que é aniônico, verifica-se que o $\lambda_{\text{máx}}$ da banda Soret, em pHs próximos de 6,0, foi deslocado para 436 nm. Na Figura 4.10, nota-se que com a acidificação da solução há uma diminuição gradativa da absorbância e um pequeno deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ da banda Soret para 442 nm, que ocorrem em pHs abaixo de 1,0.

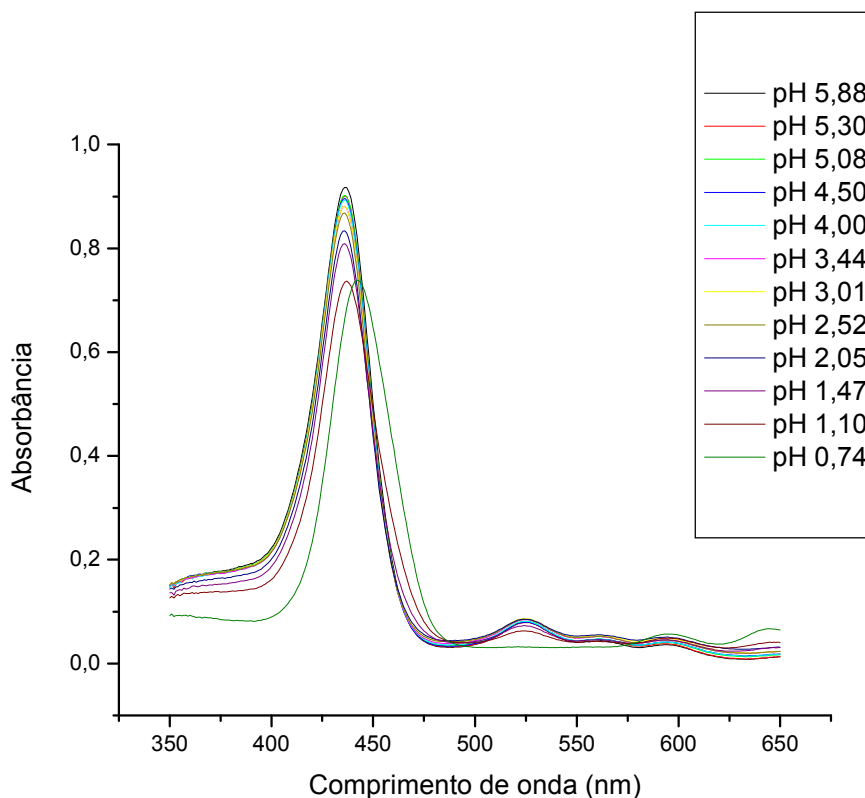


Figura 4.10 – Espectros de absorção de solução da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em acetato-fosfato 20 mmol/L na presença de SDS (40 mmol/L), em pH's entre 6,0 e 0,5.

Através dos resultados obtidos, bem como pela análise espectral, observou-se um comportamento diferente da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em presença de SDS, pois não foi observada grandes mudanças espectrais com a acidificação da solução, isso sugere uma interação porfirina-micela e que a porfirina possa estar protegida pelo surfactante, e dificultando sua protonação. Para melhor esclarecimento, montou-se então o gráfico da variação da absorbância em 428 e 458 nm em função do pH com base na diferença entre os espectros obtidos entre os pHs 5,88 e 0,74 e com o ajuste de dados experimentais e utilizando a função sigmoidal, obtemos o valor de pK_1 de 0,9 (Figura 4.11) no qual verifica-se a estabilidade da porfirina na faixa de pH 6 a 1.

Os diferentes valores de pK em meio ácido aparecem na Tabela 5, sendo que valores abaixo de 1,5 indicam estabilidade da estrutura molecular diante de alterações no meio, visto que o valor de pK indica a presença de duas espécies em equilíbrio, ou seja, a base livre e a protonada.

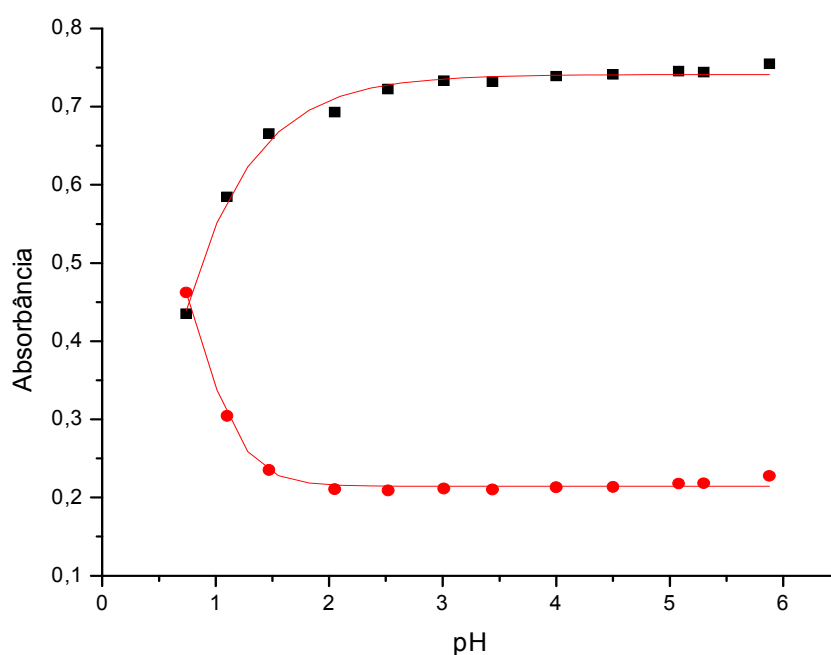


Figura 4.11 – Gráfico da absorbância da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em acetato-fosfato na presença de SDS (40 mmol/L), em função do pH em ■ 428 nm e ● 458 nm.

Tabela 5 – Valores de pK_1 da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em diferentes meios

H ₂ O	Acetato/fosfato	HPS	CTAB	SDS
1,2	1,3	1,3	1,7	0,9

Em meios homogêneos, água e acetato/fosfato, os resultados indicam a formação de outra espécie quando a solução é acidificada, provavelmente ocorre a

protonação da porfirina com aparecimento da forma diácida $[H_4(TNBPYP)]^{6+}$, como já observado para outras porfirinas, como por exemplo a TMPyP.⁶¹ Os dados também indicam interação porfirina-micela quando em presença de micelas SDS (aniônica), portanto há predominância do efeito eletrostático na interação com o surfactante, fato já observado por outros autores com porfirinas semelhantes.^{42,53,61}

4.2.2 Estudo espectrofotométrico em meio básico

Experimentos semelhantes aos descritos para meio ácido foram realizados para estudar o comportamento da absorbância da porfirina $H_2(TNBPYP)$ quando o meio sofre alcalinização, foram feitos experimentos em meios homogêneos (solução aquosa e solução acetato/fosfato 20 mmol/L) e em meios heterogêneos (solução dos surfactantes HPS 20 mmol/L, SDS 40 mmol/L e CTAB 20 mmol/L).

Preparou-se uma solução aquosa da porfirina $H_2(TNBPYP)$ com concentração na ordem de 10^{-6} mol/L, e esta, ao sofrer variações de pH, apresentou uma diminuição do valor de absorbância da banda Soret em meio básico, e apenas em elevados pHs foi observado que ocorre o deslocamento da banda Soret de 427 nm para 472 nm (Figura 4.12).

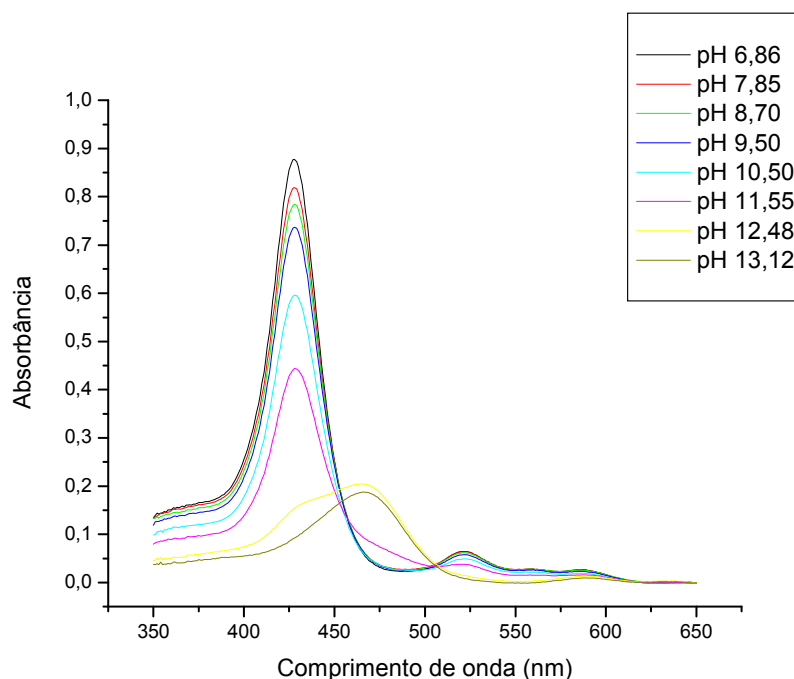


Figura 4.12 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em água, em pH's entre 7,0 e 13,5.

Com a alcalinização do meio, observou-se que houve alteração do espectro da porfirina e mudanças na cor da solução que passou de marrom claro em meio neutro para amarela em meio básico, indicando a formação da espécie desprotonada $(TNBPYP)^{2+}$ em pHs altos.

Foi feita a análise da absorbância em dois comprimentos de onda em função da variação do pH, sendo que os λ foram escolhidos com base na diferença entre os espectros obtidos nos pHs 6,86 e 13,12, Figura 4.13. Utilizou-se a função sigmoidal para ajuste de dados experimentais e para que se obtivesse o pK igual a 13,7. Pode ser observado através deste gráfico que houve diminuição da absorbância em 427 nm desde o começo da alcalinização, e em pHs acima de 11, a diminuição da absorbância foi mais significativa.

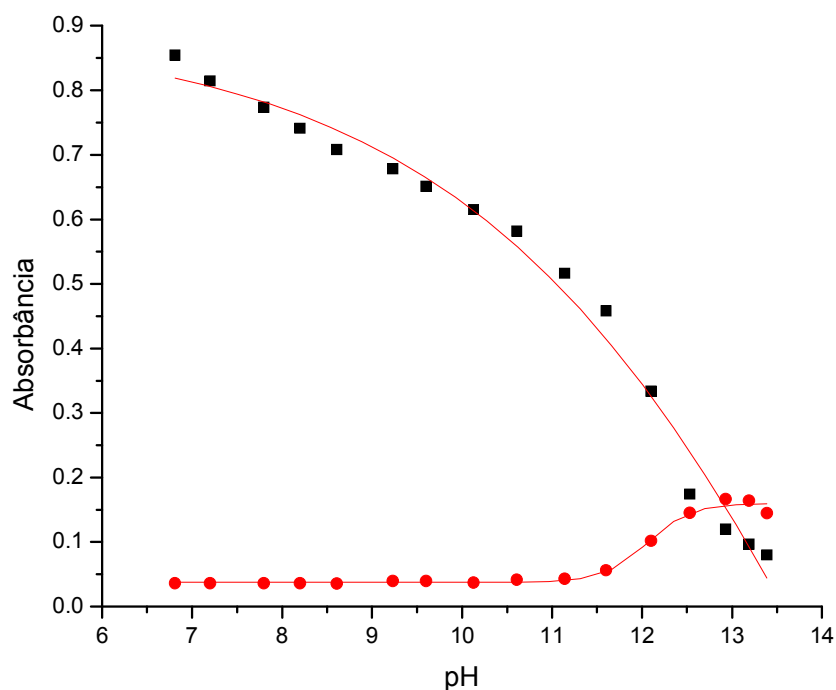


Figura 4.13 – Gráfico de absorvância de porfirina $H_2(TNBPYP)$ em solução aquosa em função do pH nos comprimentos de onda (■) 427 nm e (●) 472 nm.

Na Figura 4.14, são analisados os registros de absorvância em solução de acetato/fostato, e com a alcalinização da solução, observa-se o mesmo tipo de comportamento apresentado em água. Com o tratamento dos dados determinou-se o pK de 12,4.

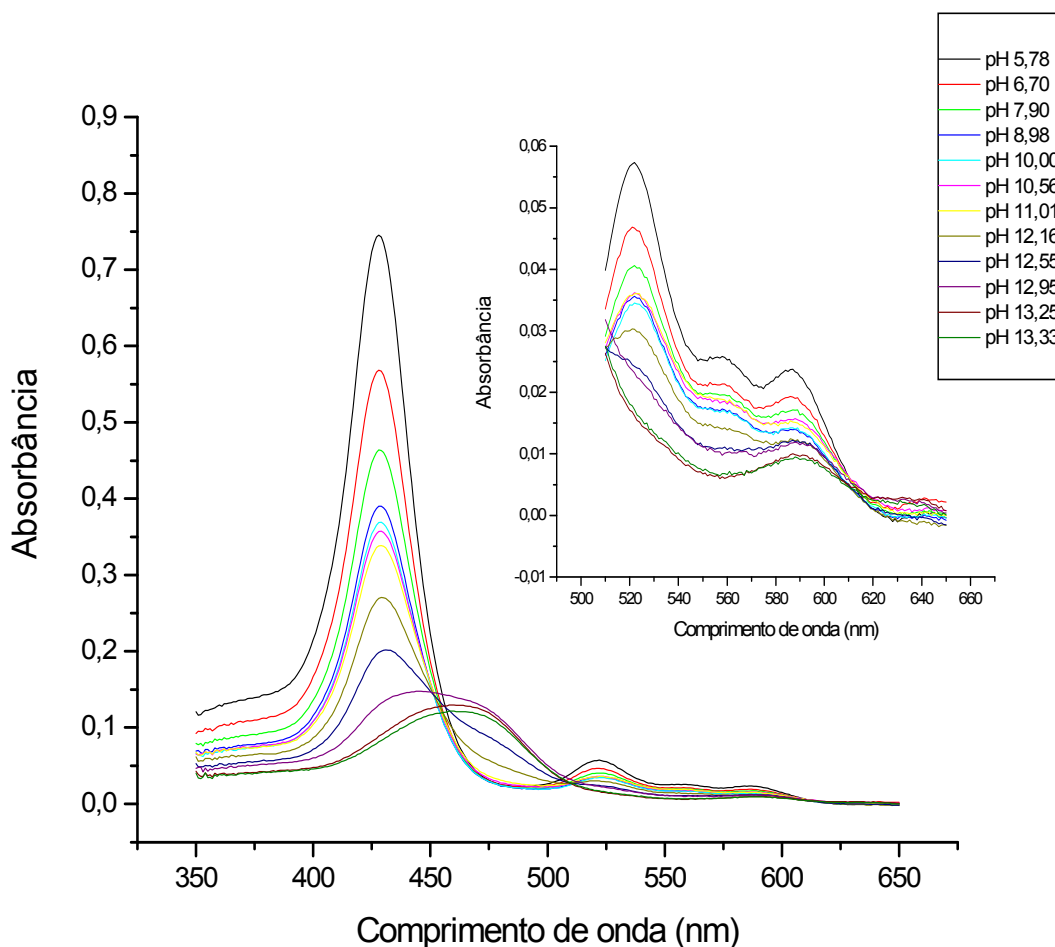


Figura 4.14 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em acetato-fosfato (20 mmol/L), em pH's entre 6,0 e 13,5.

Em presença do surfactante HPS, (Figura 4.15) o comportamento da porfirina em meio básico foi semelhante ao apresentado em meio homogêneo, e com o ajuste de dados obteve-se um valor de pK igual a 12,0, verificou-se que ocorreu diminuição na intensidade de absorbância da banda Soret, que deve estar relacionado com alterações na estrutura com a alcalinização do meio.

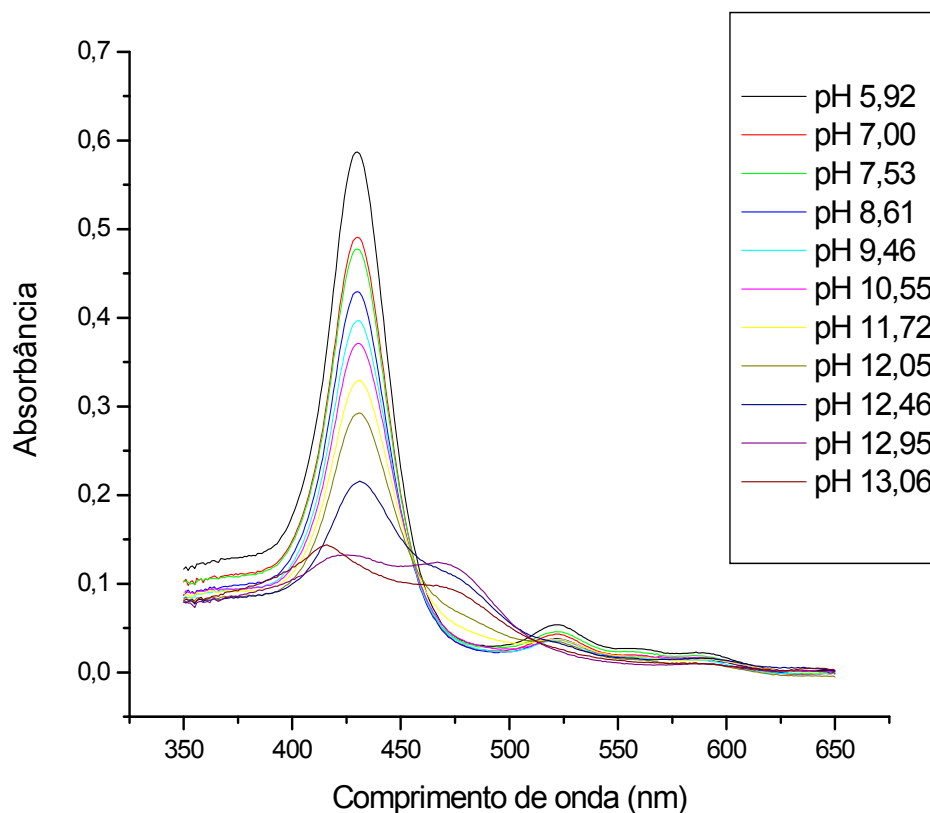


Figura 4.15 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em acetato-fosfato, na presença de HPS (20 mmol/L) em pH's entre 6,0 e 13,5.

No espectro de absorção da porfirina em presença de CTAB (20 mmol/L) (Figura 4.16), observa-se comportamento semelhante ao observado em solução acetato/fosfato, pois esta manteve-se estável numa grande faixa de pH. Observou-se que em pH acima de 12,5, a banda Soret apresenta um deslocamento para comprimentos de onda maiores, podendo caracterizar a formação a espécie desprotonada, nesse caso, calculou-se o valor de pK 12,4, que é um valor semelhante ao obtido em meio de acetato/fosfato.

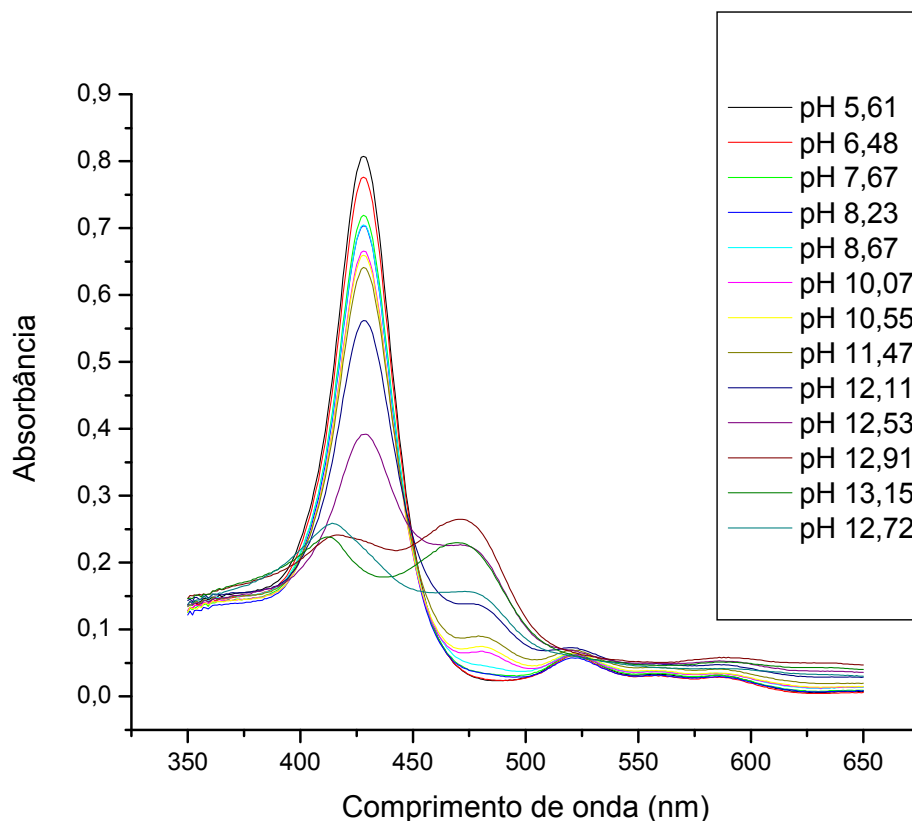


Figura 4.16 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em acetato-fosfato na presença de CTAB (20 mmol/L), em pH's entre 6,0 e 13,5.

Os experimentos realizados em presença de micelas de SDS apresentaram resultados diferentes aos observados nos outros meios analisados. Observa-se na Figura 4.17, que não ocorreram mudanças no comprimento de onda máximo de absorção da banda Soret, na faixa de pH entre 5,5 a 13,0. Logo, não foi possível calcular o valor de pK_2 , o que sugere a interação da porfirina com o SDS, pois através dos dados obtidos não há indícios de uma nova espécie presente em solução, significa que o surfactante protegeu a porfirina das variações de pH do meio, numa extensa faixa de pH. Os valores de pK determinados em todos os meios analisados estão apresentados na Tabela 6.

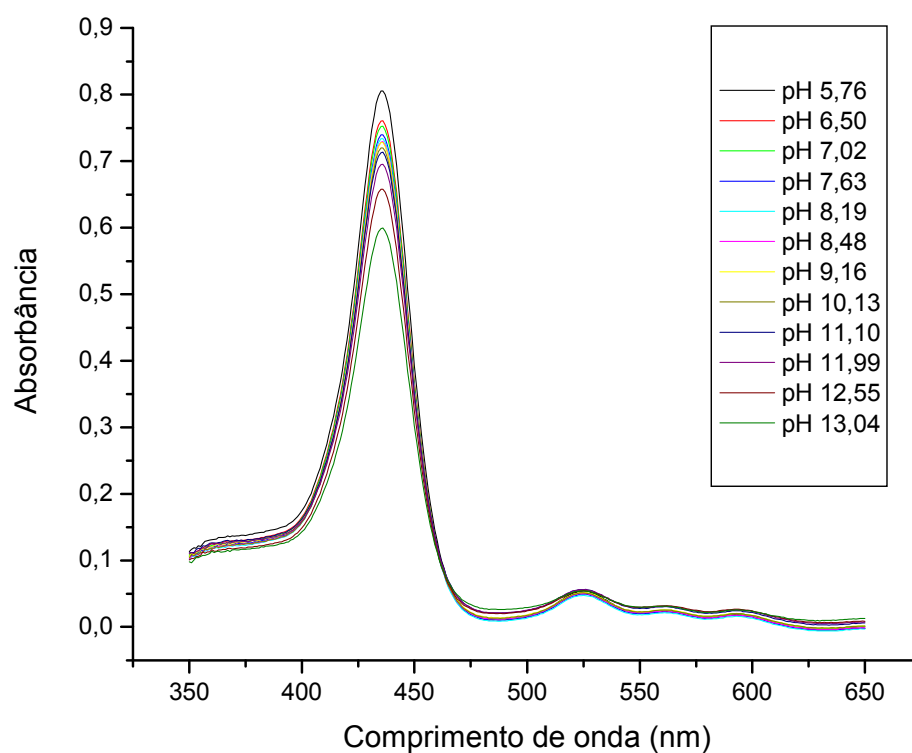


Figura 4.17 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPyP)$ em acetato-fosfato na presença de SDS (40 mmol/L), em pH's entre 6,0 e 13,5.

Tabela 6 – Valores de pK_2 da porfirina $H_2(TNBPyP)$ nos diferentes meios analisados

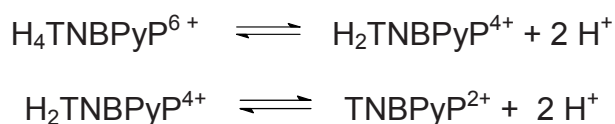
Água	Acetato/fosfato	HPS	CTAB	SDS
13,7	12,4	12,0	12,4	-----

Em relação aos valores de pK s obtidos em água com os obtidos em solução de acetato/fosfato, algumas mudanças foram observadas em ambas transições, isso indica que nessas condições o aumento da força iônica influencia o valor de pK . Na parte básica houve uma alteração de 1,3 para medidas realizadas em meio

básico comparando-se os resultados em água com os obtidos em solução de acetato/fosfato 20 mmol/L.

Observou-se que tanto a acidificação quanto a alcalinização da solução de porfirina resultaram em um deslocamento espectral para comprimentos de onda maiores. Também verifica-se a presença de um ponto isobéstico em 440 nm quando se diminui o pH da solução, e um outro ponto isobéstico em 455 nm quando se aumenta o pH da solução. Isso sugere a existência de três espécies na faixa de pH de 0,5 a 14,0.

De acordo com a literatura,^{67,70} bem como através dos dados obtidos através de procedimentos realizados em meio ácido e básico, pode-se estabelecer uma proposta de equilíbrio na faixa de pH de 1,0 a 13,0 como mostra o esquema a seguir:



Considerando-se o equilíbrio químico da porfirina, como sendo resultante da combinação linear de três componentes puras: a espécie diprotonada $[\text{H}_4(\text{TNBPYP})]^{6+}$, a base livre $[\text{H}_2(\text{TNBPYP})]^{4+}$ e a desprotonada $(\text{TNBPYP})^{2+}$.

Na análise espectrofotométrica em presença de micelas de SDS na faixa de pH 2,0 a 14,0 (Figuras 4.10 e 4.17), observa-se que só está presente uma espécie de porfirina, a base livre. Algumas alterações no espectro de absorção, principalmente na região das bandas Q só são visíveis abaixo de pH 1,0, indicando início da protonação. Comparando os valores de pK_1 com os obtidos em acetato/fosfato, percebe-se que realmente a porfirina não apresentou grandes

mudanças espectrais numa extensa faixa de pH, isso indica que a porfirina que é carregada positivamente interage com as micelas de SDS, que são carregadas negativamente, através das forças de atração eletrostática, ficando dessa maneira protegida da protonação ou desprotonação ocasionadas pela variação do pH do meio. Também, deve-se considerar a alteração na distribuição de carga do anel porfirínico ocasionada pela interação porfirina-micela.⁵³

4.3 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE AGREGAÇÃO

Devido à estrutura molecular dos compostos porfirínicos tetrapirrólicos, estes tendem a se auto-associar para formar dímeros ou grandes agregados, onde tendem a atingir maior estabilidade. Este fenômeno é direcionado pelas forças de interação hidrofóbicas ou eletrostáticas entre os compostos. Em geral quatro tipos diferentes de interações moleculares podem ser distinguidos: dipolo-dipolo (eletrostática), dipolo induzido – dipolo (indução), dipolo induzido – dipolo induzido – (forças de dispersão de London) e uma pequena força de repulsão (repulsão de Pauli). Todas estas forças são referidas como interações de Van der Waals.⁶⁹

Nos experimentos realizados com a porfirina $H_2(TNBPYP)$ para avaliar a capacidade de agregação em diferentes misturas água/etanol cujos resultados são apresentados na Figura 4.18, foi possível verificar que houve mudanças na intensidade da absorbância das bandas absorção e pequenos deslocamentos no $\lambda_{m\acute{a}x}$ dos picos. Como mostra a Figura 4.18, as maiores mudanças espectrais são caracterizadas pelas diferenças dos coeficientes de absorvidade nos solventes analisados. Não houve formação de um novo pico, que caracterizaria a presença de

uma nova espécie, indicando a formação de agregado, e para resultados mais conclusivos, seria necessário a utilização de técnicas que melhor comprovem a presença ou não de agregado, como por exemplo, a fluorescência molecular. Contudo, uma das maneiras de aferir a presença de espécies agregadas numa amostra de porfirina é a análise espectroscópica das amostras, através de testes de conformidade à lei de Beer – Lambert, sendo que os desvios negativos evidenciam uma provável presença dos agregados. Nos espectros obtidos em várias concentrações na faixa de 10^{-5} a 10^{-6} mol/L utilizados para a determinação do (ϵ), verificou-se a conformidade com a lei de Beer, e pesquisas sobre a caracterização de compostos porfirínicos, indicam que é mais provável a formação de agregados em concentrações maiores que 10^{-6} mol/L.^{42,58}

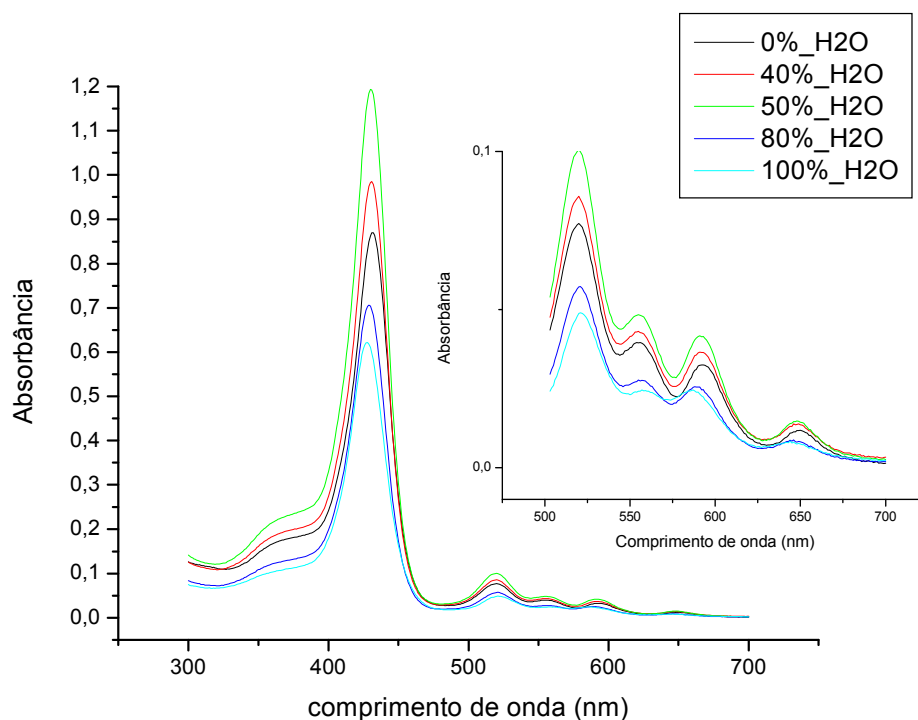


Figura 4.18 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ em diferentes misturas de água e etanol.

Segundo a literatura,^{17,71} agregados moleculares podem formar estruturas altamente organizadas que são classificadas de acordo com a orientação do dipolo de transição induzido do monômero constituinte, sendo assim, derivados de hematoporfirina, apresentam dois tipos de agregados em solução aquosa: agregado-J que são representados por um arranjo de moléculas dispostas lado a lado e os agregado-H dispostos face-a-face, como mostra a Figura 4.19. Agregados tipo J produzem um leve deslocamento da banda Soret para o vermelho, assim como na posição das bandas Q.⁴³

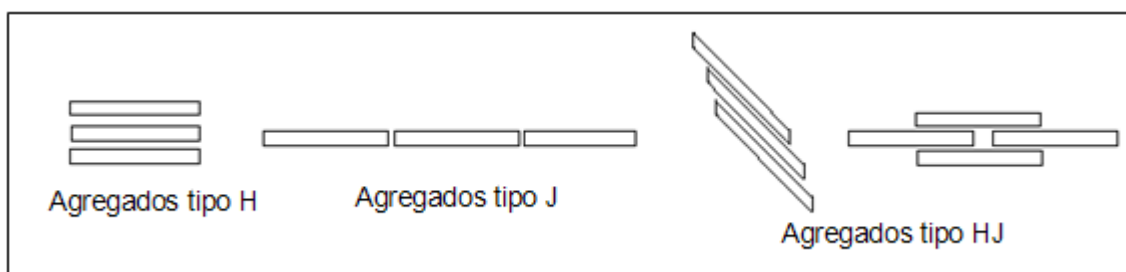


Figura 4.19 – Geometria de agregados.⁴³

O mesmo decréscimo na absorbância da banda Soret, que ocorre com o aumento da porcentagem de água é verificado nas bandas Q, estas apresentam redução de aproximadamente 50% na absorbância.

Os dados obtidos indicam um resultado favorável para a Terapia Fotodinâmica, pois, a formação de agregados altera os espectros de absorção e emissão, rendimento quântico, produção de oxigênio singlete entre outros, diminuindo a atividade fotodinâmica.^{28,43}

4.4 TESTE DE FOTOBRANQUEAMENTO

A degradação do FS pela luz é um grande problema, pois este perde sua eficiência em aplicações terapêuticas. Geralmente, o composto reage com oxigênio singlete e/ou outros compostos formados no momento da iluminação, sofrendo então alterações em sua estrutura, que diminui a eficiência da substância na TFD, pois isso acarreta o decréscimo da concentração do FS no sítio de ação e menor poder de absorção de luz do composto degradado. Assim a quantidade de princípios ativos excitados é menor, consequentemente diminui a ação fotodinâmica.

Os experimentos de fotobranqueamento foram realizados em cubetas de quartzo tampada utilizando um sistema de seis LEDs para iluminação e analisando-se a absorção da solução de porfirina a cada 5 minutos. Com base nos espectros de absorção molecular das porfirinas (Figuras 4.1 e 4.2) optou-se pela utilização dos LEDs vermelho, laranja e verde, sendo que o vermelho possui emissão na faixa de 630 a 650 nm (Figura 4.20) região onde ocorre maior penetração de luz pelos tecidos, o LED laranja compreende a faixa de emissão de 580 a 605 nm (Figura 4.21) e o verde de 490 a 560 nm.

Para a porfirina $H_2(TNBPYP)$ realizou-se os experimentos para verificar a estabilidade frente à iluminação com LED vermelho e laranja, por um período total de 60 minutos demonstrados nas Figuras 4.22 e 4.23. Observou-se que não ocorrem mudanças significativas no espectro da porfirina, pois esta apresentou um decaimento de apenas 5,2 % no máximo de absorção da banda Soret quando iluminada por LED vermelho e menor ainda, 3,7 % na presença do LED laranja.

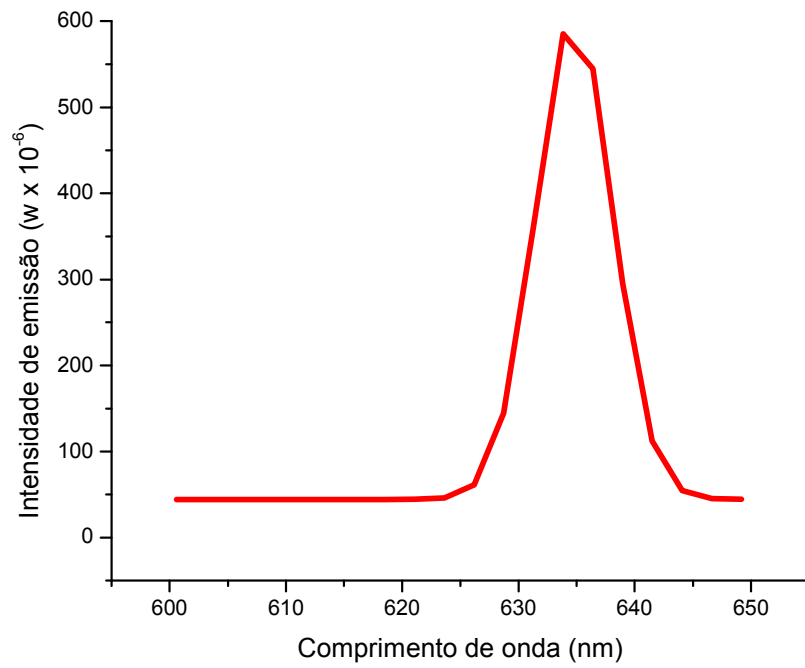


Figura 4.20 – Espectro de emissão de LED vermelho.

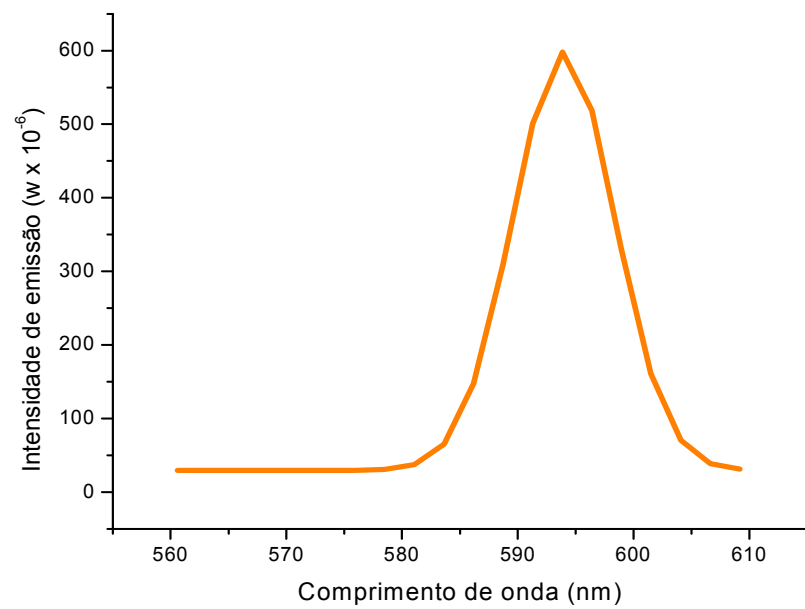


Figura 4.21 – Espectro de emissão de LED laranja.

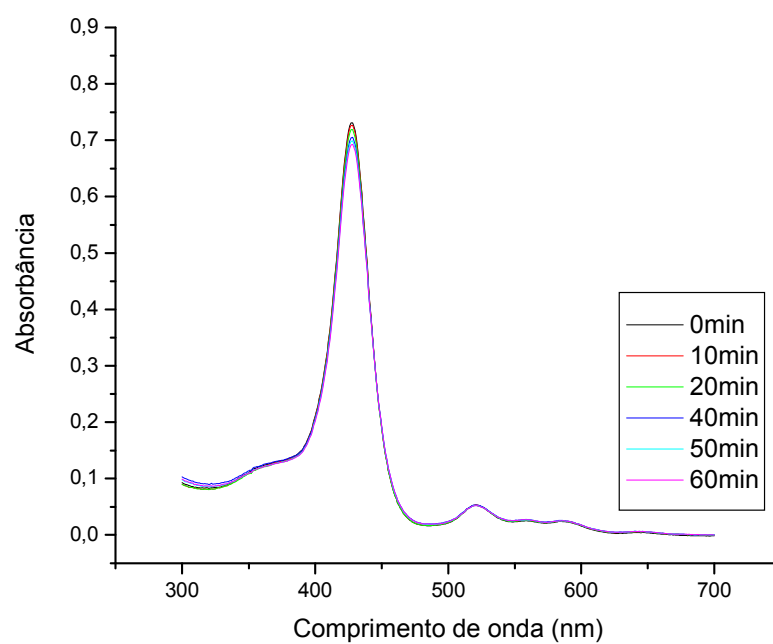


Figura 4.22 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ à 10^{-6} mol/L durante o teste de fotobranqueamento em água, num período total de iluminação de 60 min com LED vermelho.

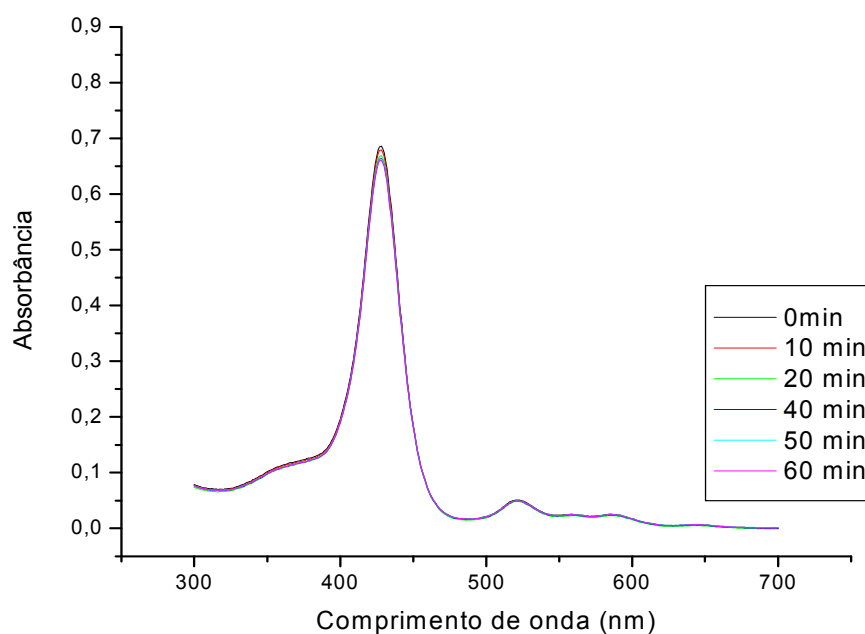


Figura 4.23 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ à 10^{-6} mol/L durante o teste de fotobranqueamento em água, num período total de iluminação de 60 min com LED laranja.

As soluções de $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$ foram irradiadas com LED laranja e verde, num período de 60 minutos, observa-se na Figura 4.24, com o LED laranja, apresentando um decaimento de 7 % no máximo de absorção na banda Soret. No processo de iluminação com LED verde, observa-se maior decaimento do máximo de absorbância (Figura 4.25), pois esta apresentou um valor de 13,3%, um indicativo de que a molécula está sendo degradada durante a iluminação.

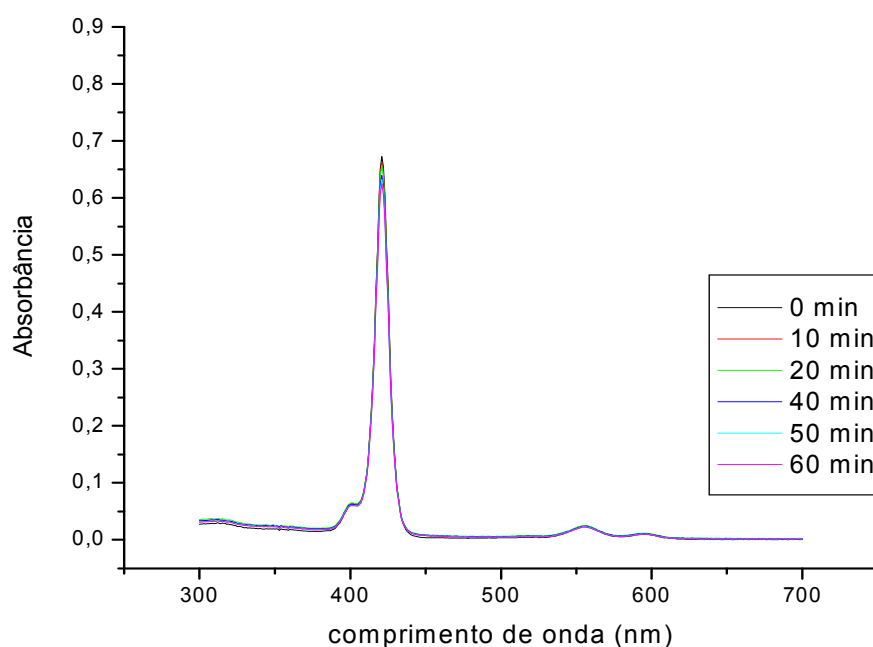


Figura 4.24 – Espectros de absorção da porfina $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$ à 10^{-6} mol/L durante o teste de fotobranqueamento em água, num período total de iluminação de 60 min com LED laranja.

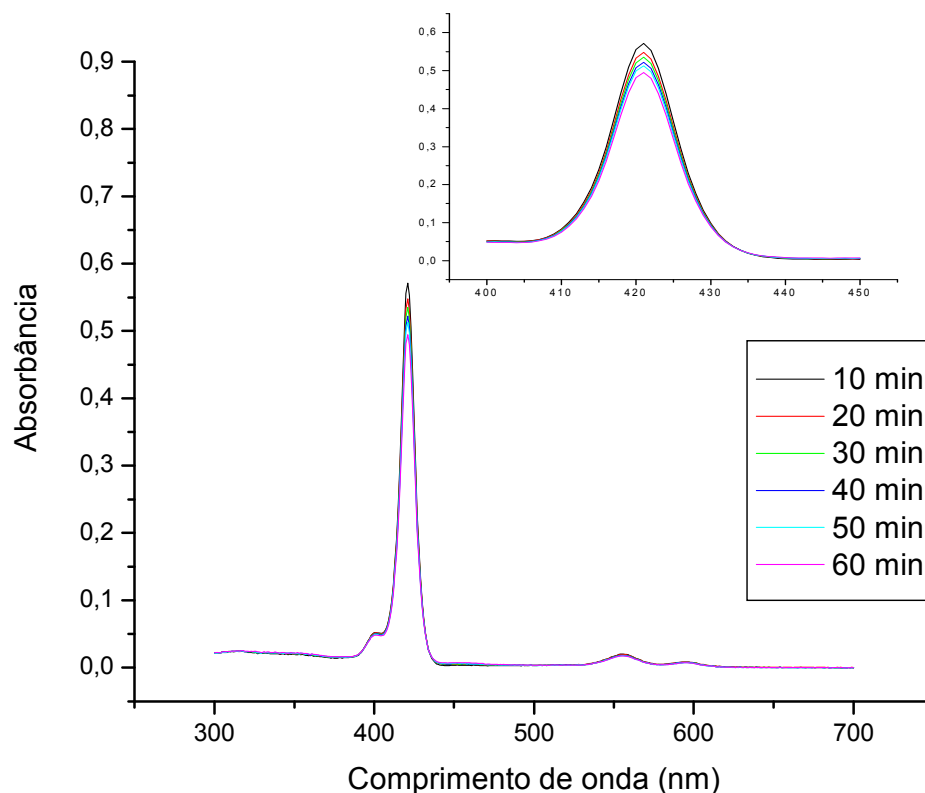


Figura 4.25 – Espectros de absorção da porfirina Zn(TPPS₄) à 10^{-6} mol/L durante o teste de fotobranqueamento em água, num período total de iluminação de 60 min com LED verde.

O fotobranqueamento da porfirina Zn(TPPS₄) frente ao LED vermelho já havia sido estudado e não foi observado fotodegradação.⁶¹

4.5 TESTE DO ÁCIDO ÚRICO

Esse método é simples e de fácil execução, requer a solubilização da porfirina em solução aquosa de ácido úrico (AU) e, em seguida, a irradiação com LED para geração de oxigênio singlete, à medida que este é formado será captado pelo ácido úrico, levando assim à diminuição na intensidade da banda de absorção do AU que é observada em 293 nm. Essa é uma determinação química quantitativa

da ação fotodinâmica de FS para serem usados em TFD, quando prevalece TFD tipo II, de acordo com o esquema abaixo, e de acordo com a reação (Figura 4.26) o ácido úrico sofre fotoxidação.^{61, 62, 72}

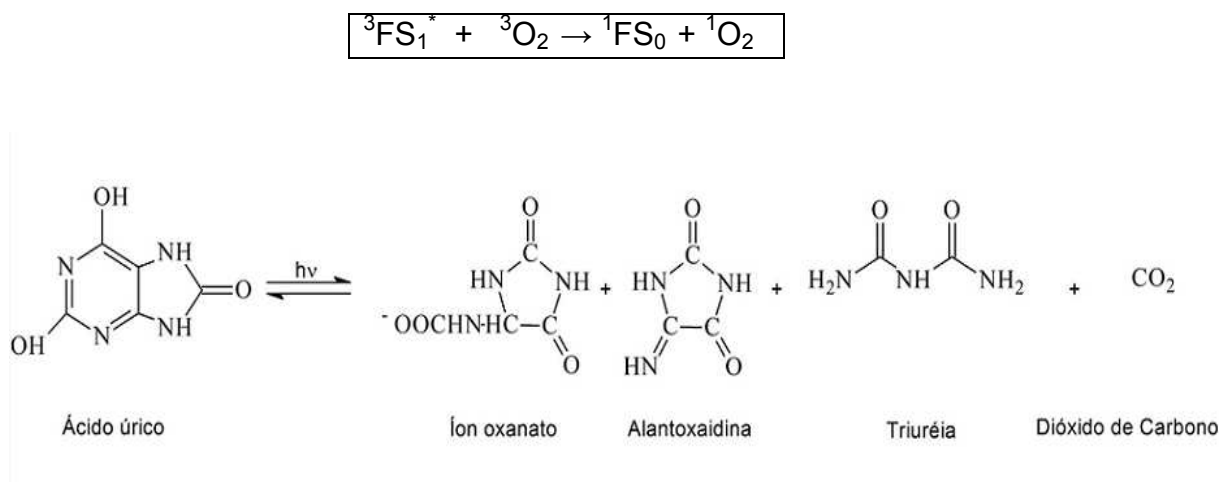


Figura 4.26 – Fotoxidação do ácido úrico via oxigênio singlete.

Medidas experimentais foram realizadas com as porfirinas $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ com LEDs vermelhos e verdes e com a $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$ com LEDs verdes e laranjas, com iluminação por 30 minutos. Os resultados para a porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ são apresentados nas Figuras 4.27 e 4.28, observa-se o decaimento da banda característica do ácido úrico, em 293 nm, indicando que está ocorrendo a reação de decomposição do AU pela ação do oxigênio singlete gerado pelos FSs excitados.

Comparando-se as Figuras 4.27 e 4.28 nota-se um maior decaimento da banda característica do AU, em 293 nm, quando a solução da porfirina foi excitada com Led verde. Verificou-se que ocorreu também uma diminuição na intensidade de absorbância da banda Soret, em cerca de 7%, mostrando que a porfirina sofreu reações de fotobranqueamento, como já descrito anteriormente.

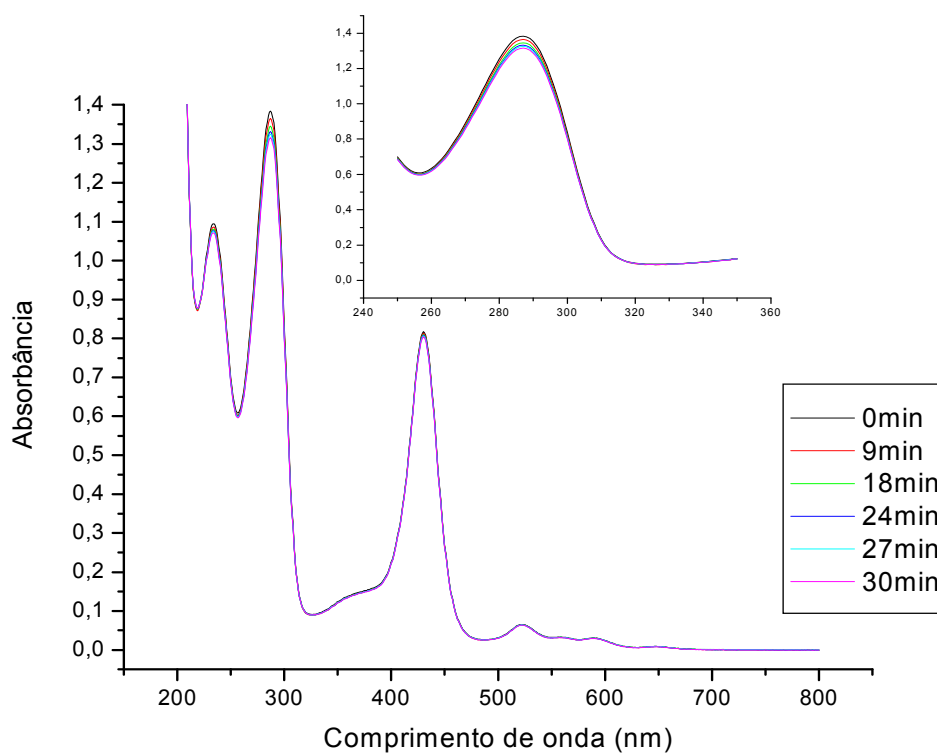


Figura 4.27 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ à 10^{-6} mol/L em água durante o teste de ácido úrico (10^{-4} mol/L), num período total de iluminação de 30 min com LED vermelho.

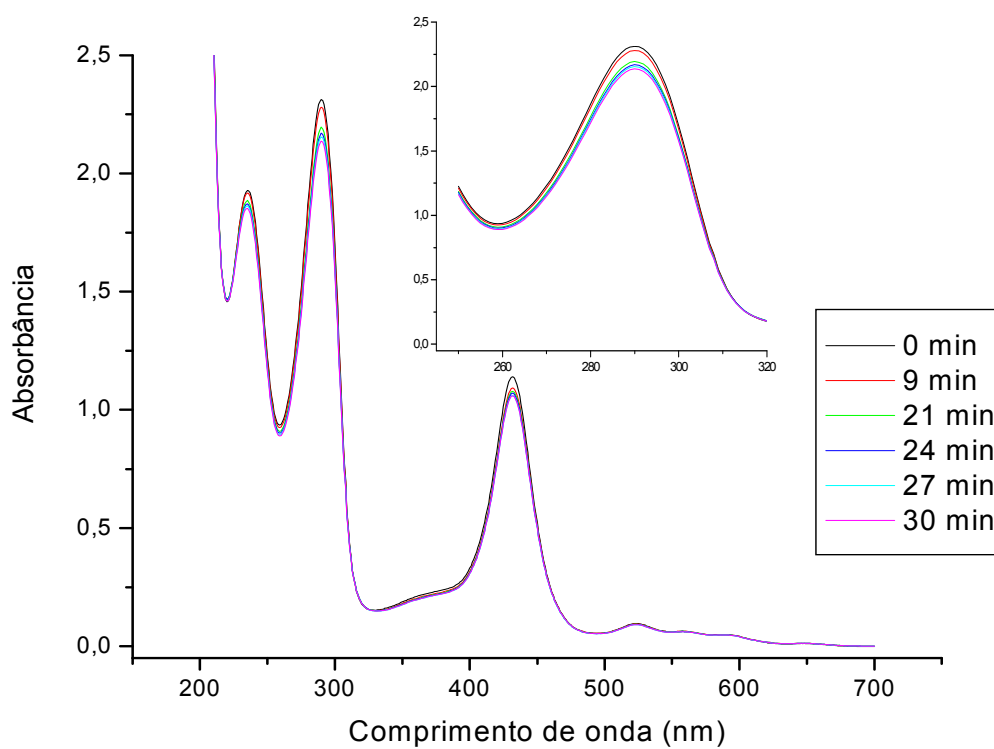


Figura 4.28 – Espectros de absorção da porfirina $H_2(TNBPYP)$ à 10^{-6} mol/L em água durante o teste de ácido úrico (10^{-4} mol/L), num período total de iluminação de 30 min com LED verde.

Medidas realizadas com a $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$ e apresentadas nas Figuras 4.29 e 4.30, mostram que ocorre uma diminuição na intensidade da banda de AU, assim como na intensidade da banda Soret da metaloporfirina.

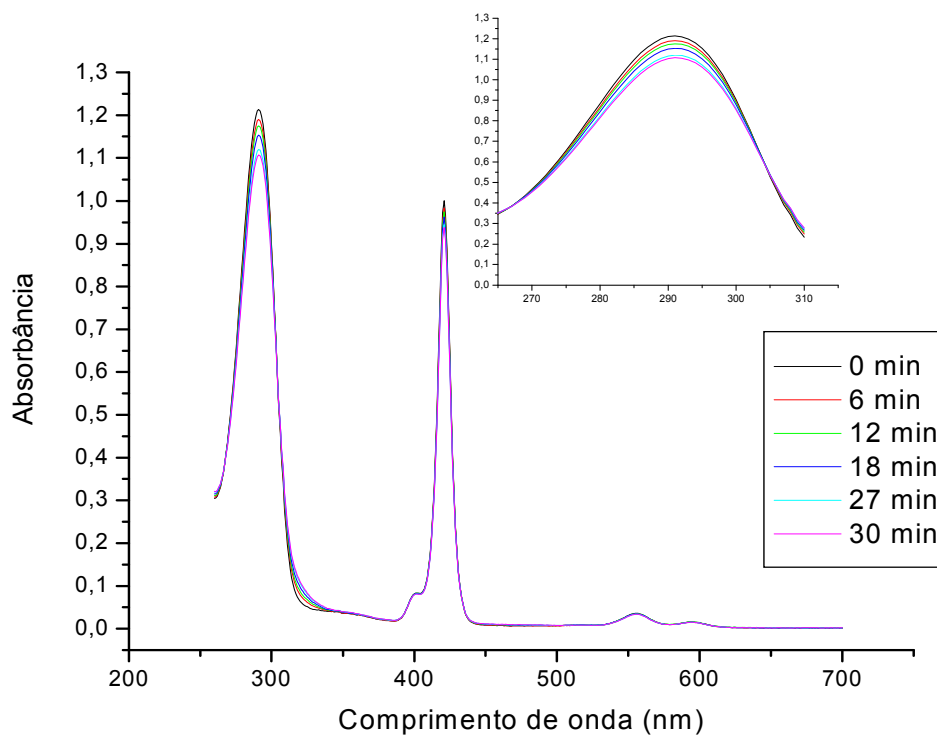


Figura 4.29 – Espectros de absorção da porfirina $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$ à 10^{-6} mol/L em água durante o teste de ácido úrico (10^{-4} mol/L), num período total de iluminação de 30 min com LED laranja.

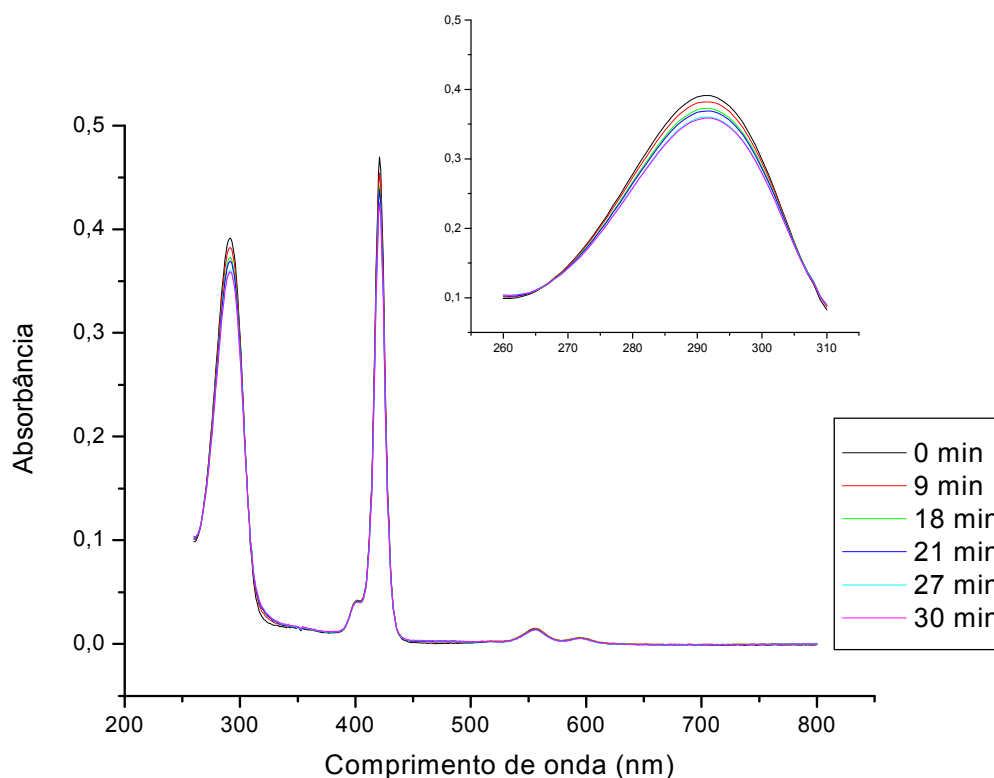


Figura 4.30 – Espectros de absorção da porfirina Zn(TPPS₄) à 10⁻⁶ mol/L em água durante o teste de ácido úrico (10⁻⁴ mol/L), num período total de iluminação de 30 min com LED verde.

Comprovou-se a geração de oxigênio singlete, mas numa pequena quantidade. Porém deve-se ressaltar que não houve injeção de oxigênio nas amostras durante o experimento.

A eficácia de diferentes fotossensibilizadores pode ser comparada através do cálculo da atividade fotodinâmica (AF), segundo a equação 1, descrita na parte de materiais e métodos. Então, realizou-se os cálculos de AF para as diferentes porfirinas, que são apresentados na Tabela 7, observou-se a H₂(TNBPyP) apresenta uma maior AF, dentro do mesmo período de tempo analisado, sendo que a fonte de iluminação de melhor resultado, nesse sentido foi o LED vermelho.

Para a Zn(TPPS₄) os resultados indicam uma maior atividade fotodinâmica com o uso do LED laranja. Mendes 2008 relatou baixa AF com uso de LEDs vermelhos.⁶¹

Tabela 7 – Valores médios de algumas grandezas, obtidas através dos espectros do teste do AU para as porfirinas H₂(TNBPyP) e Zn(TPPS₄)

Porfirina	LED	$\Delta A_{A.U.}$	t(s)	AF
H ₂ (TNBPyP)	Vermelho	0,067	1800	19,7
	Verde	0,175	1800	5,2
Zn(TPPS ₄)	Vermelho	0,016*	1800*	0,27*
	Laranja	0,106	1800	13,6
	Verde	0,032	1800	4,5

$\Delta A_{A.U.}$ = variação da absorbância em 293 nm da solução após o tempo total de irradiação; t = tempo de irradiação; AF = atividade fotodinâmica. *Fonte: Mendes, M. Dissertação de mestrado, 2008.

4.6 TESTES DE TOXICIDADE

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

O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural de compostos. Os cistos de *Artemia salina* são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco.⁶⁴ Essas vantagens contribuíram para a popularização do bioensaio, sobretudo a partir da década de 90. Quanto à citotoxicidade em comparação com células humanas, os resultados apresentam uma boa correlação, tal como já

estabelecido para extratos de plantas, sugerindo que este bioensaio seja utilizado para testar produtos naturais marinhos com potencial atividade farmacológica,⁵¹ portanto o teste com a *A. salina* vem cada vez mais sendo reconhecido como uma alternativa para a busca de compostos candidatos a novas drogas.^{41,64}

Realizou-se medidas, em triplicata, com os microcrustáceos para verificar a toxicidade da porfirina $H_2(TNBPYP)$ frente à iluminação com os LEDs vermelhos e laranjas com solução de porfirina em diferentes concentrações. De modo semelhante foram realizados testes com porfirina $Zn(TPPS_4)$ com os LEDs vermelhos, laranjas e verdes.

Nas Figuras 4.31 e 4.32 são apresentados os gráficos que expressam a média dos valores de mortalidade obtidos dos testes com a porfirina $H_2(TNBPYP)$ com os LEDs utilizados. Algumas soluções foram submetidas a iluminações com LED e outras não, incluindo os controles (branco) com *A. salina* e sem porfirina. Os resultados apresentados mostram que a porfirina $H_2(TNBPYP)$ é tóxica para *A. salina* mesmo sem iluminação. Verificou-se também que somente para iluminação com LED vermelho observou-se claramente uma maior mortalidade nas amostras iluminadas (ação fotodinâmica), tendo a toxicidade variado com a concentração da porfirina $H_2(TNBPYP)$ utilizada, maior aumento de mortalidade devido à iluminação foi observado nas amostras com concentração de $2,2 \times 10^{-6}$ mol/L (Figura 4.31). Esses resultados estão de acordo com o maior valor de atividade fotodinâmica com o LED vermelho observado no teste com ácido úrico.

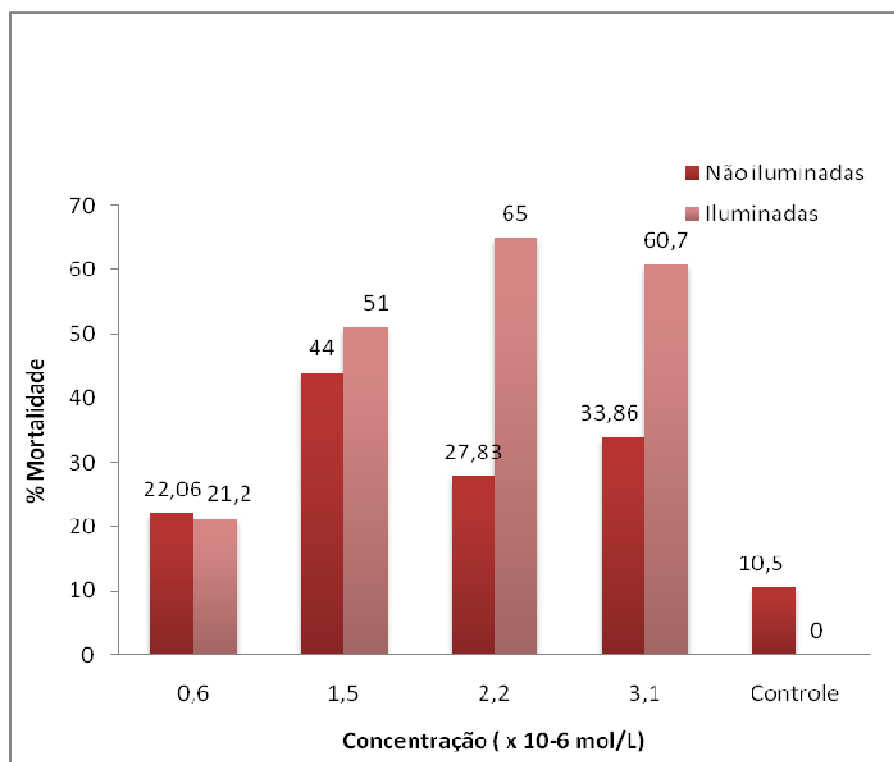


Figura 4.31 – Gráfico da mortalidade percentual média de *Artemia salina* em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina $H_2(TNBPYP)$ utilizando-se LEDs vermelhos.

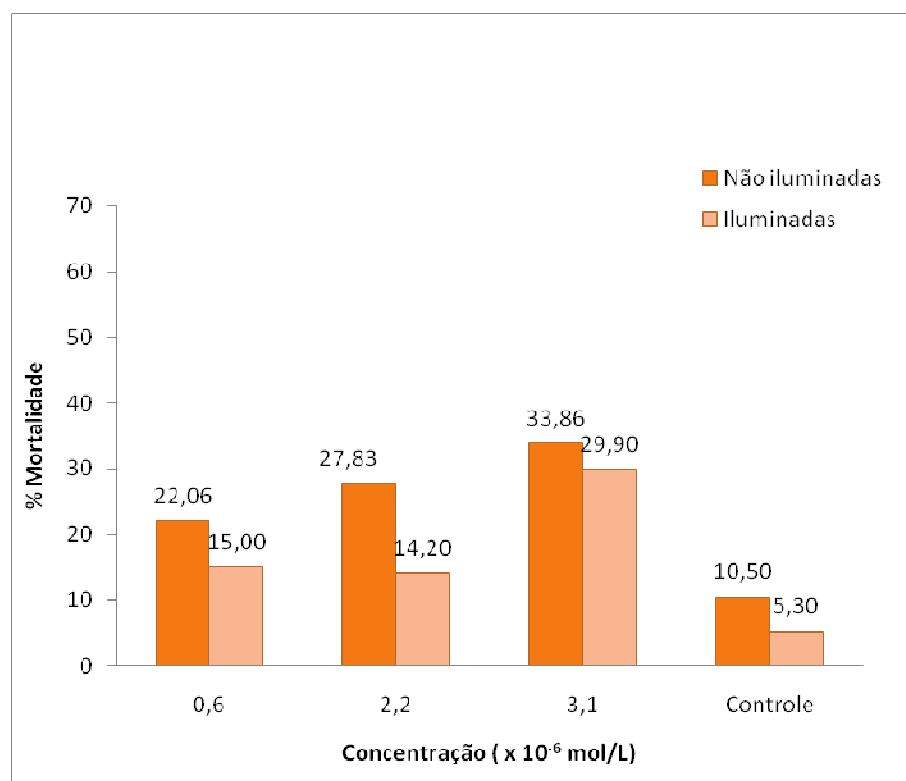


Figura 4.32 – Gráfico da mortalidade percentual média de *Artemia salina* em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina $H_2(TNBPYP)$ utilizando-se LEDs laranjas.

Nas Figuras 4.33 a 4.35 são apresentados os resultados de testes realizados com a porfirina $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$ utilizando Leds vermelhos, laranjas e verdes. Os resultados mostram que a porfirina $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$ é bem menos tóxica que a $\text{H}_2\text{(TNBPyP)}$ na faixa de concentração analisada, tanto na ausência quanto na presença de iluminação.

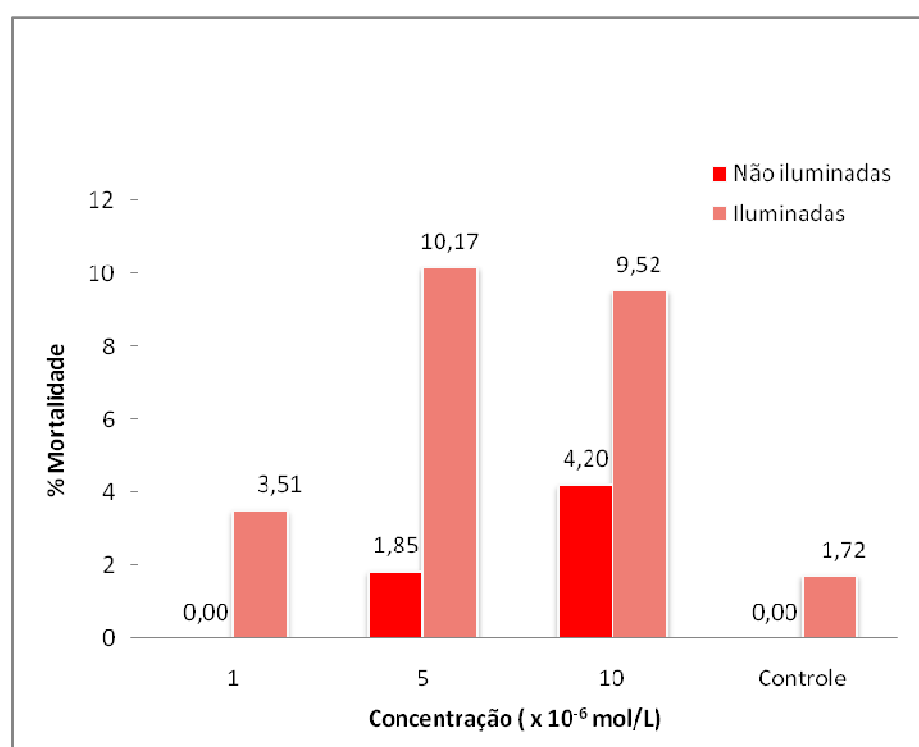


Figura 4.33 – Gráfico da mortalidade percentual média de *Artemia salina* em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$ utilizando-se LEDs vermelhos.

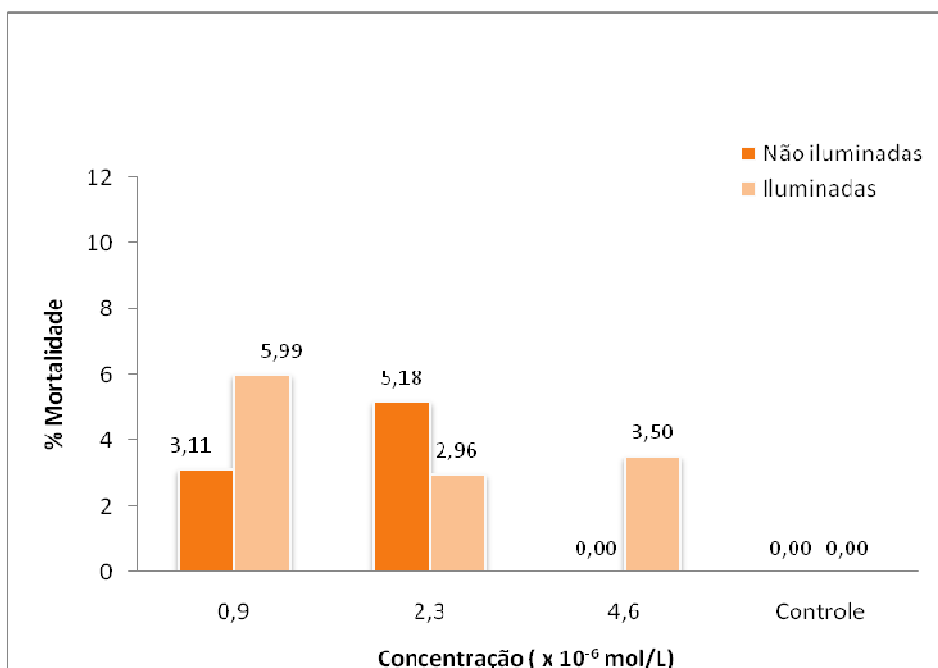


Figura 4.34 - Gráfico da mortalidade percentual média de *Artemia salina* em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina Zn(TPPS₄) utilizando-se LEDs laranjas.

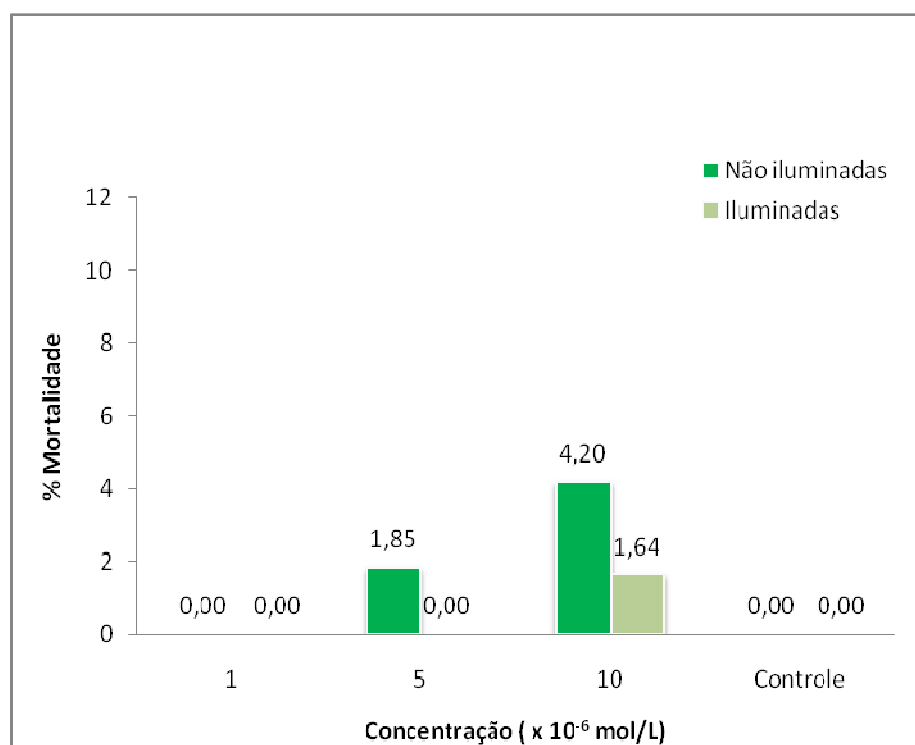


Figura 4.35 – Gráfico da mortalidade percentual média de *Artemia salina* em soluções aquosas com diferentes concentrações da porfirina Zn(TPPS₄) utilizando-se LEDs verdes.

Os resultados apresentados para a $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$ não são favoráveis à TFD, visto que a porfirina apresentou-se citotóxica para as *A. salinas* em pequenas porcentagens, tanto iluminadas como não iluminadas. No entanto, de acordo com os resultados de Mendes, em que foi avaliada a toxicidade das porfirinas $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$ e TMPyP ($1,0 \times 10^{-6}$ mol/L) frente ao microcrustáceo *A. salina*, foi verificado que ambas mostraram maior efeito fotodinâmico quando associadas à luz vermelha, sendo que a mortalidade dos microcrustáceos foi maior em presença de $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$.⁶¹

Comparando-se os resultados para a porfirina $\text{Zn(TPPS}_4\text{)}$ com os três sistemas de iluminação, verificou-se que o melhor resultado foi de testes com o LED vermelho, Figura 4.33, pois a mortalidade foi superior sob iluminação, com uma diferença de 3 a 4 vezes maior que sem iluminação. Outro fator importante verificado, é que nos testes realizados com iluminação laranja e verde, a porcentagem de mortalidade foi muito baixa, e isso pode sugerir que durante a iluminação com os LEDs, não foi gerado oxigênio singlete suficiente para causar a morte dos microcrustáceos, ou ainda, a molécula esteja sofrendo reações de fotobranqueamento, como foi verificado anteriormente.

Analisando conjuntamente os resultados obtidos para as duas porfirinas observou-se que embora a porfirina $\text{H}_2\text{(TNBPyP)}$ tenha uma maior toxicidade sem iluminação, essa apresentou melhores resultados de ação fotodinâmica com concentração de $2,2 \times 10^{-6}$ mol/L e com iluminação com LEDs vermelhos. Esse resultado pode ser explicado pela maior atividade fotodinâmica determinada no teste do ácido úrico, visto que a maior ação fotodinâmica da porfirina com o LED vermelho implica em capacidade de gerar oxigênio singlete.

4.6.2 Ensaio *in vitro* com culturas de microorganismos

Na literatura há relatos de que bactérias gram-negativas, como a *E. coli*, são mais resistentes a fotossensibilizadores (FS) utilizados na TFD, enquanto que bactérias gram-positivas, como a *S. aureus*, são mais susceptíveis à inativação fotodinâmica, e isso, aparentemente, se deve a diferenças em suas estruturas básicas da parede celular.^{38,73} Alguns resultados indicam que os FS carregados positivamente são geralmente mais eficientes em bactérias e agem em concentrações menores que fotossensibilizadores neutros e aniônicos.^{38,46-50,73}

A inativação fotodinâmica da bactéria depende de vários fatores como o tipo e a concentração do FS, a espécie do microorganismo, a fonte de luz e o tempo de irradiação.^{47,38,61} Testes *in vitro* com cultura de microorganismos também estão sendo utilizados como indicativo de atividade fotodinâmica em células tumorais, já que tanto bactérias e leveduras, quanto as células tumorais se reproduzem rapidamente.⁶²

Para avaliar a atividade fotodinâmica das porfirinas $H_2(TNBPYP)$ e $Zn(TPPS_4)$ na inativação de microorganismos, realizou-se testes com a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Devido a resultados anteriores,⁶¹ achou-se conveniente utilizar a concentração $5,0 \times 10^{-6}$ para as porfirinas e os tempos de iluminação de 2, 10 e 30 minutos. Um dos diferenciais do trabalho é o uso do sistema de iluminação com LED já utilizados com outros fotossensibilizadores por Soares e Mendes.^{57, 58} Tentando levar em conta a “janela terapêutica” e as posições das bandas Q das porfirinas utilizou-se LEDs vermelhos ($\lambda_{\text{máx}} \cong 650 \text{ nm}$) e laranjas ($\lambda_{\text{máx}} \cong 595 \text{ nm}$).

Os LEDs vermelhos também foram usados com a finalidade de comparação com trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa. Foi observada ação

antimicrobiana para testes realizados com alguns fotossensibilizadores, como em trabalho realizado por Mendes, no qual a porfirina TMPyP apresentou melhores resultados frente a bactéria *E. coli* que a porfirina $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$, sendo o resultado atribuído a maior capacidade de geração de oxigênio singlete da TMPyP sob iluminação dos LEDs vermelhos em meio aquoso.⁶¹

Como já mencionado anteriormente, foram utilizados os seguintes controles:

I) ausência de porfirina e presença de iluminação; II) presença de porfirina e ausência de iluminação e III) ausência de porfirina e de iluminação (controle geral).

Na Figura 4.36 são mostrados exemplos de resultados de dois controles (I e II) onde é observado um grande crescimento de bactérias.

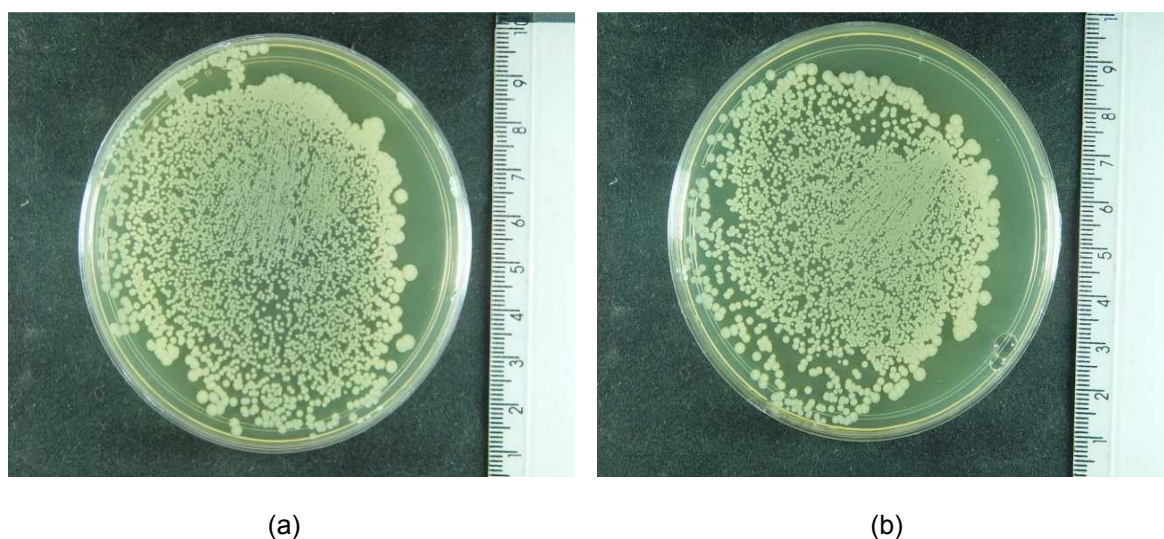


Figura 4.36 – Unidades formadoras de colônia de *S. aureus* (a) na presença de porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ ($5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) e sem iluminação - controle II (b) sob iluminação de luz vermelha por 30 minutos e sem porfirina (controle I).

A Tabela 8 apresenta a média dos valores obtidos para cada experimento com a porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$. Analisando a tabela podemos verificar que na presença da porfirina na concentração de $5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ e iluminação houve inibição

no crescimento da bactéria, quando comparado com os controles para os dois tipos de LED utilizados. Houve maior inibição do crescimento bacteriano quando a amostra foi submetida à luz laranja, porém, outros experimentos precisam ser realizados para elucidar o papel do LED na inativação, já que houve inibição no crescimento bacteriano só com a presença da iluminação, e um maior efeito fototóxico com o menor tempo de iluminação.

Tabela 8 – Número de UFC/mL – Unidades formadoras de colônias – *Staphylococcus aureus* ($\times 10^2$). Na presença e na ausência da porfirina $H_2(TNBPYP)$, sob diferentes tempos de iluminação com LED vermelho e laranja.

TEMPO/ ILUMINAÇÃO	$H_2(TNBPYP)^{4+}$ (5×10^{-6} mol/L)		Controle I (sem porfirina)	
	LED vermelho	LED laranja	LED vermelho	LED laranja
2	incontável	717	incontável	1845
10	2281	857	Incontável	Incontável
30	1927	781	incontável	Incontável
Controle II	Incontável			
Controle III	Incontável			

Os resultados dos testes com LED vermelho mostraram ação fototóxica da porfirina $H_2(TNBPYP)$ com inibição da reprodução celular da *S. aureus*, e que o tempo de iluminação é determinante para o efeito fotodinâmico, tendo o tempo de 30 minutos apresentado o menor número de colônias.

Na Figura 4.37, verifica-se que quando comparamos os dois LEDs utilizados o efeito inibitório maior foi observado com a iluminação laranja, e isso ocorre em todos os tempos de iluminação testados, esse efeito é observado também na Figura 4.38.

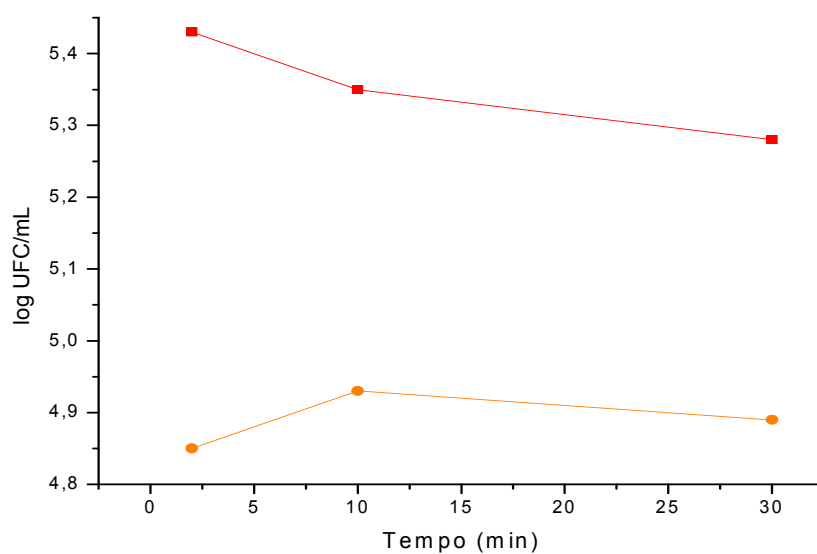


Figura 4.37 – Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, na presença da porfirina $H_2(TNBPYP)$ sob (●) iluminação laranja e (■) iluminação vermelha.

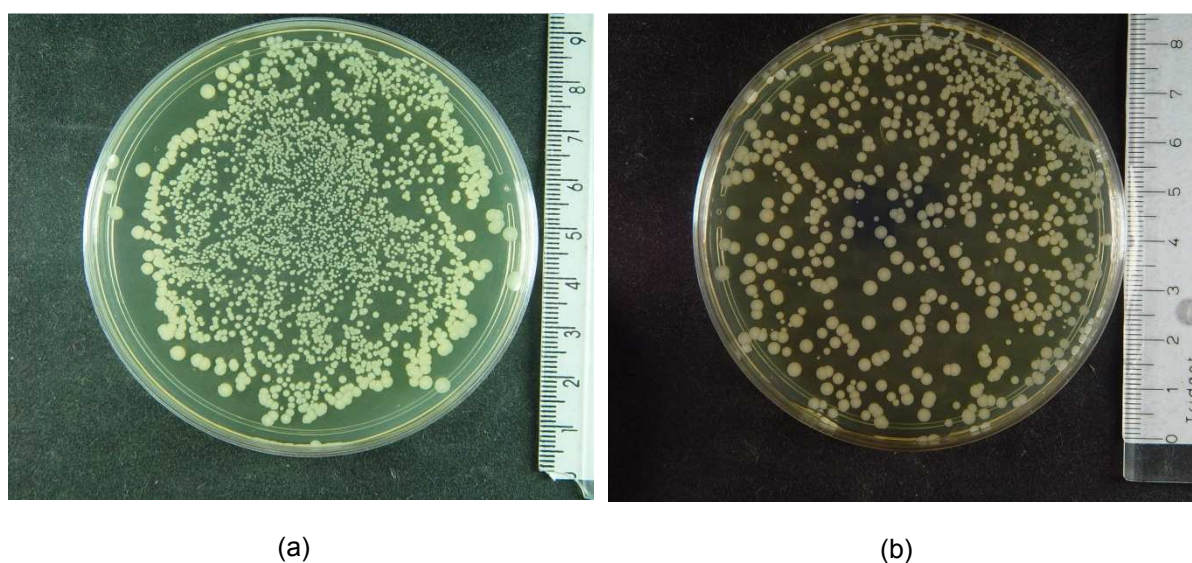


Figura 4.38 – Unidades formadoras de colônia de *S. aureus* na presença de porfirina $H_2(TNBPYP)$ (5×10^{-6} mol/L) (a) sob iluminação de luz vermelha e (b) sob iluminação de luz laranja por 30 minutos.

Na Tabela 9, são apresentados os resultados das medidas realizadas com a porfirina $Zn(TPPS_4)$, na qual comparamos os resultados com os LEDs vermelho e laranja numa mesma concentração de porfirina. É observada ação fototóxica na

reprodução da *Staphilococcus aureus* com os dois LEDs testados. Com relação ao efeito do tempo de iluminação os resultados com os dois LEDs nos tempos de 10 e 30 minutos de iluminação são muito semelhantes, como mostrado na Figura 4.40. Não é observada uma resposta linear com relação ao tempo de iluminação para o LED laranja.

Tabela 9 – Número de UFC/mL – Unidades formadoras de colônias – *Staphilococcus aureus* ($\times 10^2$). Na presença e na ausência de porfirina Zn(TPPS₄) sob diferentes tempos de iluminação vermelha e laranja.

TEMPO/ ILUMINAÇÃO	Zn(TPPS ₄) (5×10^{-6} mol/L)		Controle I (sem porfirina)	
	LED vermelho	LED laranja	LED vermelho	LED laranja
2	Incontável	1589	Incontável	1845
10	2307	2126	Incontável	Incontável
30	1915	1907	Incontável	Incontável
Controle II	Incontável			
Controle III	Incontável			

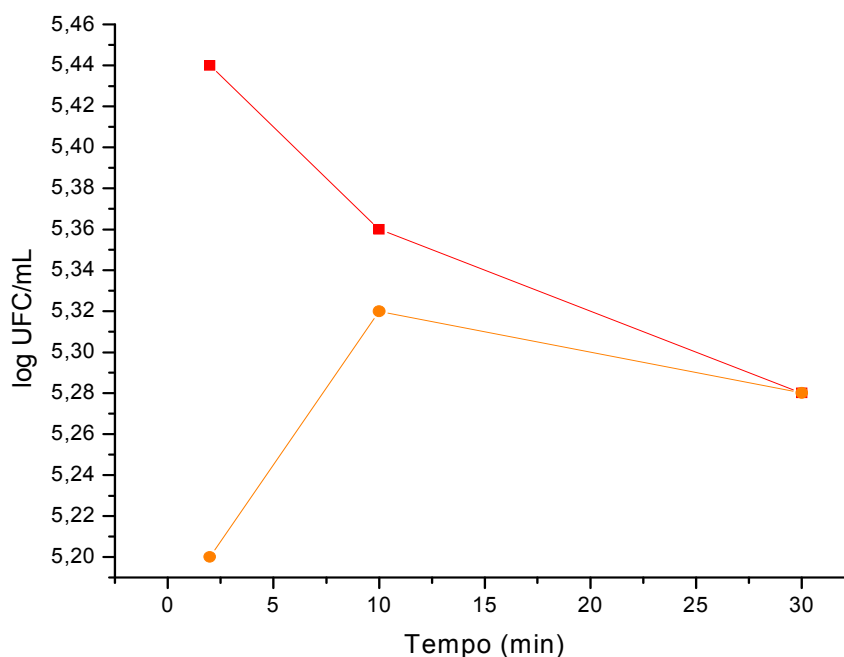


Figura 4.39 – Gráfico do log UFC/mL em função do tempo, na presença da porfirina Zn(TPPS₄) (5 x 10⁻⁶ mol/L) sob (●) iluminação laranja e (■) iluminação vermelha.

Devemos levar em consideração que a interação do agente FS com o substrato, muitas vezes é um ponto crítico para a eficiência fotodinâmica, sendo que a ativação pela fonte de energia pode não ocorrer, uma vez que o tempo entre a colocação do FS no alvo e sua ativação pela fonte de luz, varia de acordo com a interação desejada. De acordo com Ribeiro,⁷⁴ nas aplicações tópicas da TFD, principalmente antimicrobiana, espera-se que o corante una-se ao microrganismo, ou mesmo chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular, localizando-se no citoplasma da célula ou mesmo intercalando-se com o DNA do núcleo. Os tempos de pré-irradiação típicos utilizados em TFD antimicrobiana vão de um a dez minutos.

Rovaldi e colaboradores, ao investigarem, *in vitro*, a ação da TFD sobre bactérias orais, empregou laser com comprimento de onda de 662 nm, taxa de fluência de 100 mW/cm² durante 150 minutos e dois derivados da clorina. A

incubação das células com o laser ou com o FS de forma isolada não afetou a viabilidade das mesmas. Quando empregados em conjunto, ocorria atividade bactericida.⁷⁵ Logo é de se esperar que a inativação fotodinâmica seja mais eficaz se fizermos o uso de um período de tempo maior de irradiação, bem como um tempo suficiente para a penetração do FS nas células microbianas para assim, a associação de luz e porfirinas apresentar resultados satisfatórios.

Com relação às porfirinas testadas e devido a crescente busca por novos fotossensibilizadores para uso em TFD, assim como para várias outras possibilidades com uso destes compostos, seria importante mais estudos para verificar qual a concentração da porfirina é mais eficiente, qual o melhor tempo de irradiação e pré-irradiação, assim como investigação de qual fonte pode apresentar melhores resultados.

5 CONCLUSÕES

Através da avaliação do comportamento espectral da porfirina catiônica $H_2(TNBPYP)$ no UV-Vis observou-se que esta é estável em uma ampla faixa de pH, e que as alterações que ocorrem em pHs extremos se dão devido à protonação e desprotonação da molécula, fato observado em meio aquoso, acetato/fosfato e na presença de micelas. No entanto, a análise espectrofotométrica em presença de micelas de SDS mostrou que a porfirina foi protegida das alterações de pH pelas micelas desse surfactante aniônico. Isso mostra que os efeitos eletrostáticos podem favorecer o encapsulamento das porfirinas, bem como, a possibilidade de interagir com membranas celulares.

O fenômeno de agregação da porfirina $H_2(TNBPYP)$ foi avaliado em misturas H_2O /etanol, os resultados indicam que possivelmente não ocorreu a formação de agregados na faixa de concentração analisada, no entanto, para resultados mais conclusivos devem ser realizadas análises com outras técnicas.

As porfirinas $H_2(TNBPYP)$ e $Zn(TPPS_4)$ são fotoestáveis nas condições analisadas. A geração de oxigênio singlete foi avaliada através do teste do ácido úrico, observou-se que os melhores resultados de geração da espécie reativa 1O_2 foram para a porfirina $H_2(TNBPYP)$ sob iluminação de LEDs vermelhos, ou seja, esta apresentou maior atividade fotodinâmica (AF).

Houve ação fotodinâmica das porfirinas contra a *Artemia salina* utilizando-se o sistema de iluminação à base de LED. O maior índice de mortalidade ocorreu na presença da porfirina $H_2(TNBPYP)$ e sob iluminação com LED vermelho.

Nos teste *in vitro* com a bactéria *Staphylococcus aureus* observou-se ação fotodinâmica das duas porfirinas analisadas e com os dois LEDs testados, sendo

que os melhores resultados de inativação bacteriana foram obtidos para o tempo de iluminação de 30 min. Portanto, os resultados demonstram que as porfirinas testadas tem potencial para serem utilizadas em Terapia Fotodinâmica.

6 REFERÊNCIAS

1. BARBOSA NETO, N. M.; DE BONI, L.; MENDONÇA, C. R.; MISOGUTI, L.; QUEIROZ, S. L.; DINELLI, L. R.; BATISTA, A. A.; ZÍLIO, S. C. J. Nonlinear Absorption Dynamics in Tetrapyrridyl Metalloporphyrins. **Phys. Chem. B**, v. 109, 17340-17345, 2005.
2. BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K.; TROJANOWICZ, M. Porphyrins in analytical chemistry. A review. **Talanta**, v. 51, p. 209-224, 2000.
3. SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F. e HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Quím. Nova**, v. 25, p. 801-807, 2002.
4. MILGROM, L. R. **The Colours of Life: An Introduction to Chemistry of Porphyrins and Related Compounds**. New York: Oxford University Press, 1997.
5. GOUTERMAN, M. In: DOLPHIN, D. **The pophyrins**. New York: Academic Press, 1978.
6. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. Porphyrin-based Photosensitizers for use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, v. 54, p. 4151-4202, 1998.
7. KAIN, W. E SCHWEDERSKI, B. **Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life**. Wiley, 1994.
8. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução de Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. São Paulo. Sarvier, 2000.
9. ADLER, A. D.; LONGO, F. R.; SHERGALIS, W. Mechanistic Investigations of Porphyrin Syntheses. I. Preliminary Studies on *ms* - Tetraphenylporphin. **J. Am. Chem. Soc.**, Philadelphia, v. 86, p. 3145-3149, 1964.
10. ADLER, A. D.; LONGO, F. R.; FINARELLI, J. D.; GOLDMACHER, J.; ASSOUR, J.; KORSAKOFF, L. A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. **J. Org. Chem.**, v. 32, p. 476, 1967.
11. DOLPHIN, D., TRAYLOR, T. G., XIE, L. Y.; Polyhaloporphyrins: Unusual Ligands for Metals and Metal-Catalyzed Oxidations. **Acc. Chem. Res.**, v. 30, p. 251-259, 1997.

12. TRAYLOR, P. S.; DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G. Sterically Protected Hemins with Electronegative Substituents: Efficient Catalysts for Hydroxylation and Epoxidation. **J. Chem. Soc. Chem. Com.**, v.5, p. 279-280, 1984.
13. ASSIS, M. D.; MELO, A. J. B.; SERRA, O. A.; IAMAMOTO, Y. Study of catalytic activity of nitro substituted ironporphyrins. **J. Mol. Cat. A: Chem.**, v. 97, p. 41-47, 1995.
14. SESSLER, J. L.; WEGHORN S. J. **Expanded, Contracted and Isomeric Porphyrin**. Oxford: Elsevier, 1997.
15. MONTANARI, F., Biomimetic oxygenations catalyzed by metalloporphyrins and metallophorphinoids bearing co-catalytic functions, **Pure & Appl. Chem.**, v. 66, p. 1519-1526, 1994.
16. ROTOMSKIS, R.; STRECKYTE, G.; BAGDONAS, S. Phototransformations of sensitizers .1. Significance of the nature of the sensitizer in the photobleaching process and photoproduct formation in aqueous solution. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v. 39, p. 167-171, 1997.
17. HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. M. The nature of $\pi \rightarrow \pi$ interactions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 112, p. 5525 – 5534, 1990.
18. WU, Y. D.; CHAN, K. W. K.; YIP, C. P.; VOGEL, E.; PLATTNER, D. A.; HOUK, K. N. Porphyrin Isomers: Geometry, Tautomerism, Geometrical Isomerism and Stability. **J. Org. Chem.**, v. 62, p. 9240-9250, 1997.
19. ISOGAI, Y.; ISHIDA, M. Design of a Novel Heme Protein with a Non-Heme Globin Scaffold. **Biochem.**, v. 48, p. 8136-8142, 2009.
20. SCHIAVON, M. A.; IWAMOTO, L. S.; FERREIRA, A. G.; IAMAMOTO, Y.; ZANONIC, M. V. B.; ASSIS, M. das D. Synthesis and Characterization of a Novel Series of Meso (Nitrophenyl) and Meso (CarboxyPhenyl) Substituted Porphyrin. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, p. 458-466, 2000.
21. ARAKI, K.; TOMA, H. E. Química de Sistemas Supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos. **Quím. Nova**, v. 25, p. 962-975, 2002.
22. DAL SANTOS, M. A; ANTUNES, A.C.; RIBEIRO, C.; BORGES, C.P.F.; ANTUNES, S.R.M.; ZARA, A.J.; PIANARO, S.A. **Mat. Lett.**, v. 57, p. 4378, 2003.

23. NATURE PUBLISHING GROUP, **TFD**. Disponível em <<http://www.nature.com/reviews/cancer>> acesso em 20 nov. 2007.
24. DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v.3, p. 380-386, 2003.
25. LEVY, J.G. Photodynamic therapy. **TIBTECH**, v. 13, p. 14-18, 1995.
26. SILVA, E. R.; SANTOS, E. P.; JÚNIOR, E. R. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, p. 211-217, 2009.
27. DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized Singlet Oxygen and its Applications. **Coord. Chem. Rev.**, v. 233-234, p. 351-371, 2002.
28. MACHADO, A. E. DA H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000.
29. FELÍCIO L. B. A.; FERREIRA J.; BENTLEY, M. V. B.; BAGNATO, V. S.; TEDESCO, A. C.; SOUZA, C. S. A terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico como modalidade de tratamento para neoplasias cutâneas não-melanoma. **An Bras Dermatol.**, v. 83, p. 309-316, 2008.
30. HAGE, R. Terapia fotodinâmica aplicada ao tratamento do carcinoma epidermóide em uma gata: Relato do caso. **Braz. J. Vet. Res. Science**, v. 41, p. 143-144, 2004.
31. O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. **Photochem. and Photobiol.**, v. 85, p.1053-1074, 2009.
32. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. Pyrrolic photosensitizers. **Curr. Med. Chem.**, v.3, p. 239-272, 1996.
33. CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiag. Photodyn. Ther.**, v. 1, p. 279-293, 2004.
34. RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A.; SILVA, A. R.; FLORES, A. V.; RONCHI, I. M.; TEDESCO, A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Ecl. Quím.**, v. 32, p. 7-14, 2007.

35. RIBEIRO, J. N.; FLORES, A. V.; MESQUITA, R.; NICOLA, J. H.; NICOLA, E. M. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. **Phys.**, v. 5, p.5, 2005.
36. OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J. Photochem. and Photobiol.**, v. 39, p. 1-18, 1997.
37. RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; MASCIO, P. D. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Quím. Nova**, v. 29, p.563-568, 2006.
38. PERRUSSI, J. R. Inativação Fotodinâmica de microorganismos. **Quím. Nova**, v. 30, p. 988-994, 2007.
39. RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A. Análise das propriedades anticancerígenas de meso-tetramesitilporfirina empregando métodos espectroscópicos. **Revista Analyt.**, v. 2, p. 43-49, 2004.
40. MANG, T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiag. and Photodyn. Ther.**, v. 1, p.43-48, 2004.
41. PELOI, L. S.; SOARES, R. R. S.; BIONDO, C. E. G.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **J. Biosci.**, v. 33, p. 231-237, 2008.
42. KADISH, K. M.; MAIYA, G. B.; ARAULLO, C.; GUILARD, R. Micellar Effects on the Agregation 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. **Inorg. Chem.**, v. 28, p. 2725-2731, 1989.
43. AGGARWAL, L. P. F.; BORISSEVITCH, I. E. On the dynamics of the TPPS₄ agregation in aqueous solutions successive formation of H and J aggregates. **Spectrochim. Acta, Part A: Molec. and Biomolec. Spectr.**, v. 63, p. 227- 233, 2006.
44. HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 3, p. 436-450, 2004.

45. TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; NETO, C. F. Terapia Fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, p. 445-59, 2009.
46. TRAGANTE, C. R.; CECCON, M. E. J. R.; FALCÃO, M. C.; SEITI, M.; SAKITA, N.; VIEIRA, R. A. Prevalência de sepse por bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal. **Rev Paul Pediatr.**, v. 26, p. 59-63, 2008.
47. ALVES, E.; COSTA, L.; CARVALHO, C. M. B.; TOMÉ, J. P. C. FAUSTINO, M. A.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic *meso*-substituted porphyrins. **BMC Microbiol.**, v. 70, p. 1-13, 2009.
48. ROGERO, S.O.; LUGÃO, A. B.; IKEDAB, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de toxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.**, v. 6, p. 317-320, 2003.
49. TRABULSI, L.R; ALTHERNUM, F. **Microbiol.** São Paulo, 2005.
50. MARZZOCO, A; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro. Guanabara. 1999.
51. LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.
52. RYTER, S. W.; TYRREL, R. M. Singlet molecular oxygen ((O-1(2)): A possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radical Biol. & Med.**, v. 24, p. 1520-1534, 1998.
53. TOMINAGA, T. T; SOARES, D.; SILVA, J. C. Z; DAL SANTOS, M. A.; BORGES, C.P.F. Estudos Espectroscópicos da Porfirina Catiônica Meso-tetrakis- (N-metil-4piridil) (TMPyP) em presença de Micelas Iônicas de CTAB, SDS e HPS. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci Agl. Eng.**, v. 10, p. 7-14, 2004.
54. OSTLER, R. B.; SCULLY, A. D.; TAYLOR, A. G.; GOULD, I. R.; SMITH, T. A.; WAITE, A.; PHILLIPS, D. The Effect of pH on the Photophysics and Photochemistry of Disulphonated Aluminum Phthalocyanine. **Photochem. and Photobiol.**, v. 71, p. 397-404, 2000.

55. SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Quím. Nova**, v. 21, p. 557-559, 1998.
56. CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. **BMC Biotechnol.**, v. 2, p. 1-5, 2002.
57. SOARES, D. **Estudo da interação entre Porfirinas e Eumelanina sintética**. 2005, 133f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2005.
58. 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. **J. Inorg. Biochem.**, v.85, p. 263-277, 2001.
59. HUNGERFORD, G.; FERREIRA, M. I. C.; PEREIRA, M. R., FERREIRA, J. A.; COELHO, A. F. Spectroscopic Characterization of Porphyrin-Doped Sol-Gel-Derived Matrices. **J. Fluor.**, v. 10, p. 283-290, 2000.
60. KOLAROVA, H.; BAJGAR, R.; TOMANKOVA, K.; NEVRELOVA, P.; MOSINGER, J. Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. **Toxicol. in Vitro**, v. 21, p. 1287-1291, 2007.
61. MENDES, M. **Estudo das propriedades das Porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ para Potencial de Aplicação em Terapia Fotodinâmica**. 2008, 132f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.
62. SOARES, R. R. da S. **Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. 2006, 81 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
63. PELLOSI, D. S.; BATISTELA V. R.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. Proposta metodológica para quantificar atividade fotodinâmica química de fotossensibilizadores irradiados por luz policromática. **Anais e XVI Encontro de Química da Região Sul**. Blumenau, 2008.
64. MEYER, B. N. Brine shrimp: a conveniente general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, p. 31-34, 1982.

65. LIEGEL, R. M. **Porfirinas e metaloporfirinas catiônicas aquossolúveis: síntese e caracterização de derivados benzilpiridínio substituídos**. 1996. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
66. RICCHELLI, F.; GOBBO, S.; JORI, G. Photosensitization of mitochondria by liposome-bound porphyrins. **Photochem. and Photobiol.**, v.58, p.53-58, 1993.
67. PASTERNAK, R. F.; HUBER, P. R.; BOYD, P.; ENGASSER, G.; FRANCESCONI, L.; GIBBS, E.; FASELLA, P.; VENTURO, G. C.; HINDIS L. C. On the aggregation of meso-substituted water soluble porphyrins. **J. Am. Chem. Soc.**, v.94, p.4511- 4517, 1972.
68. BORISSEVITCH, I. E.; BORGES, C. P. F.; YUSHMANOV, V.E.; TABAK, M. Localization of dipyrromethane molecules in ionic micelles: effect of micelle and drug charges, **Biochim. et Biophys. Acta**, v. 1238, p. 57-62, 1995.
69. MENEZES, P. F. C. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do fotogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006, 182f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2006.
70. LEIGHTON, P.; COWAN, J. A.; ABRAHAM, R. J.; SANDERS, J. K. M. Geometry of porphyrin-porphyrin interactions. **J. Org. Chem.**, v. 53, p. 733-740, 1988.
71. KASHA, M.; RAWLS, H. R. The excitation model in molecular spectroscopy. **Pure Appl. Chem.**, v. 1, p. 371 – 392, 1965.
72. 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, p. 708-713, 2004.
73. BANFI, S.; CARUSO, E.; BUCCAFURNI, L.; BATTINI, V.; ZAZZARON, S.; BARBIERI, P.; ORLANDI, V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. **J. Photochem. and Photobiol. B: Biol.**, v. 85, p.28-38, 2006.
74. SOUZA, G. R. **“Análise comparativa da emissão de luz por LED e lasers emitindo no vermelho do espectro eletromagnético na redução de bactérias periodontopatogênicas”**. Estudo *“in vitro”*. 2007, 119f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

75. ROVALDI, C.R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N. A.; FRIDEN, P. M.; ROTHSTEIN, D. M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 3364-3367, 2000.
76. MICHELS S, SCHMIDT-ERFURTH U. Sequence of early vascular events after photodynamic therapy. **Invest. Ophth. Vis. Sci.**, v.44, p. 2147, 2003.
77. SALVA, K. A. Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages or indications. **Clin. Dermatol.**, v. 20, p. 571-581, 2002.
78. GARCEZ, A. A. Terapia fotodinâmica em odontologia: laser de baixa potência para redução microbiana. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 57, p.223-225, 2003.
79. LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 158-163, 2006.
80. REDMOND, R. W.; KOICHEVAR, I. E. Symposium-in-Print: Singlet Oxygen Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. **Photochem. and Photobiol.**, v. 82, p. 1178–1186, 2006.
81. NUNES, B .S. ; CARVALHO, F. D. ; GUILHERMINO, L. M. ; STAPPEN, G. V. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environ. Pollution.**, v.144, p. 453-462, 2006.
82. STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Koogan, 1992.
83. PREVIDELLO, B. A. F.; CARVALHO, F. R.; TESSARO, A. L.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. O pKa de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Quím. Nova**, v. 29, p. 600-606, 2006.
84. SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug. Discov. Today**, v. 4, p. 507-517, 1999.
85. RIBEIRO, M. G.; AZZELLINI, G. C. Synthesis of New Cationic Metalloporphyrins and Heterodimer Formation with Anionic Metallophthalocyanines. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, p. 914-921, 2003.