

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

ROSANA BALZER

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS $[H_2(TDFSP)]$ E
 $[Zn(TDFSP)]$ VISANDO APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

PONTA GROSSA
2010

ROSANA BALZER

ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS $[H_2(TDFSP)]$ E
 $[Zn(TDFSP)]$ VISANDO APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD)

Dissertação apresentada para 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
2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

B198e Balzer, Rosana
 Estudo físico-químico e biológico dos compostos [H₂(TDFSPP)] e
 [Zn(TDFSPP)] visando aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD) /
 Rosana Balzer. Ponta Grossa, 2010.
 113f.
 Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade
 Estadual de Ponta Grossa .
 Orientadora: Profa. Dra. Christiane P. F. Borges

 1. Terapia Fotodinâmica. 2. Compostos porfirínicos.
 3. Microrganismos. I. Borges, Christiane P. F. I. T.
 .

CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

ROSANA BALZER

**“ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO DOS COMPOSTOS [H₂(TDFSP)]
E [Zn(TDFSP)] VISANDO APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA
(TFD).”**

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
UEPG/PR


Prof^a. Dr^a. Josiane de Fátima Padilha de Paula
UEPG/PR


Prof^a. Dr^a. Shirley Nakagaki
UFPR/PR

Ponta Grossa, 02 de agosto de 2010.

A Deus e ao meu Anjo da Guarda por me guiarem por toda a vida.

*Aos meus amados pais, Waldemar e Maria por serem os exemplos máximos de
amor, dignidade, respeito e educação.*

*Aos meus irmãos e irmãs, por sempre estarem presentes, protegendo-me e
apoando-me em todos os momentos da vida, em especial, a minha irmã Mariana.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Christiane P. F. Borges, pelo seu carinho e exemplo de sucesso e competência profissional. Sou extremamente grata pelos valerosos ensinamentos.

À Prof.^a Dr.^a Shirley Nakagaki, pelo fornecimento dos compostos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio André Santos, pelo auxílio no desenvolvimento dos ensaios microbiológicos.

Ao Prof. Dr. Gerson Knipphoff da Cruz, pelo auxílio na análise dos L_{ED}.

À laboratorista Luzia, pelo carinho, paciência e dedicação no auxílio ao desenvolvimento dos ensaios microbiológicos.

As colegas de pesquisa, Jeanine Domareski, Juliane Nadal, Ariana Antonangelo e Jacqueline Okada, pela colaboração e pelo carinho.

A todos os colegas e professores que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela formação que me proporcionou.

Aos órgãos de fomento, Capes (DS e Pró-e quipamento/2007) e Fundação Araucária, pelo fundamental apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho investigaram-se as propriedades dos compostos 5, 10, 15, 20 tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirina de sódio, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, e 5, 10, 15, 20 tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirinato zinco (II) de sódio, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, visando aplicabilidade como fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica (TFD). Utilizaram-se sistemas de LED em diferentes faixas de emissão, alaranjado, verde e vermelho para irradiação das amostras. As reações de fotobranqueamento foram estudadas através da análise da absorção molecular UV-Visível irradiando-se as amostras com sistemas de LED durante uma hora. Observou-se que os compostos são fotoestáveis. A geração de oxigênio singlete foi analisada através do teste de ácido úrico, observando-se, que os compostos geraram oxigênio singlete, a zinco porfirina apresentou uma maior eficiência na geração da espécie reativa. A capacidade de agregação em diferentes proporções do sistema água/etanol foi analisada com as técnicas de absorção molecular UV-Visível e emissão de fluorescência, os resultados indicaram que não ocorreu formação de agregados para os compostos nas condições analisadas. A ação fotodinâmica dos compostos foi analisada através de ensaios *in vitro* com o microcrustáceo *Artemia salina* e com os micro-organismos *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Através da análise dos resultados obtidos nos testes com *Artemia salina* conclui-se que para os dois compostos e para os três sistemas de LED, a maior percentagem de mortalidade ocorreu nos testes com associação do composto e irradiação. Isso indica que houve atividade fotodinâmica dos sistemas utilizados. Os resultados obtidos nos testes para avaliar a atividade fotodinâmica dos compostos para inativação de micro-organismos mostraram que o tempo de iluminação não influenciou no número de unidades formadoras de colônia (UFC) de micro-organismos. Os menores valores de UFC foram observados para os sistemas com associação de composto e iluminação, ou seja, observou-se atividade fotodinâmica. Assim, os resultados demonstram que os compostos apresentam potencial para serem aplicáveis em Terapia Fotodinâmica.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. Compostos porfirínicos. Micro-organismos.

ABSTRACT

The properties of compounds 5, 10, 15, 20-tetrakis (2,6 difluor-5-sulfonatophenyl) sodium porphyrin, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, and 5, 10, 15, 20-tetrakis (2,6 difluor-5-sulfonatophenyl) sodium porphyrinate zinc (II), $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$, were investigated with the objective of using them as photosensitizers in Photodynamic Therapy (PDT). LED systems were used at different emission bands, orange, green and red for irradiation of samples. Photobleaching reactions were studied through the molecular absorption analysis UV-Visible, irradiating samples with LED systems for one hour. It was observed that compounds are photostable. Oxygen singlet generation was analyzed through the uric acid test, and it was observed that the compounds generated oxygen singlet. Zinc porphyrin presented higher efficiency in the generation of the reactive species. Aggregation at different proportions of the water/ethanol system was evaluated with UV-Visible techniques and fluorescence emission. Results indicated that there was no formation of aggregates for the compounds in the conditions analyzed. The photodynamic action of compounds was analyzed through *in vitro* analysis with brine shrimp *Artemia salina* and the microorganisms *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Through the analysis of results obtained in tests with *Artemia salina*, it was concluded that for both compounds and for the three LED systems, the highest percentage of death occurred in tests with association of compound and irradiation, which indicates photodynamic activity in the systems employed. Results obtained in the tests to evaluate photodynamic activity of compounds for inactivation of microorganisms revealed that lighting time did not influence the number of colony forming units (UFC). The lowest UFC values were observed for the systems with association of compounds and light, that is, there was photodynamic activity. Thus, results demonstrated that the compounds present potential to be used in Photodynamic Therapy.

Key words: Photodynamic Therapy, Porphyrin compounds, Microorganisms.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	- Estrutura do anel porfirínico.....	19
Figura 2	- Estrutura do anel porfirínico (a) clorina (b) e da bacterioclorina (c)....	20
Figura 3	- Estrutura do anel porfirínico com numeração, segundo a IUPAC.....	21
Figura 4	- Sistema de numeração do anel porfirínico de Fisher.....	22
Figura 5	- Espectros eletrônicos da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ (----) e do composto $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ (----) em água.....	24
Figura 6	- Estrutura da Eosina Y.....	27
Figura 7	- Estrutura da hematoporfirina IX.....	28
Figura 8	- Friedrich Meyer-Betz antes (A) e após (B) aplicação de HP IX e exposição à luz solar.....	29
Figura 9	- Caminho de célula e agente cancerígeno aos órgãos.....	31
Figura 10	- Profundidade de penetração da luz no tecido em função do comprimento de onda.....	32
Figura 11	- Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica Tipo I.....	33
Figura 12	- Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica Tipo II.....	34
Figura 13	- Rota Biossintética da Pp IX a partir do ácido α -aminolevulínico.....	36
Figura 14	- Representação do Diagrama de Jablonski.....	38
Figura 15	- Espectro de emissão da 5,10,15,20 - tetrafenil porfirina $\text{H}_2(\text{TPP})$ em clorofórmio.....	41
Figura 16	- Representação das formas de agregação.....	43
Figura 17	- Excitação Eletrônica para porfirinas monoméricas (a) agregada de forma linear (b) paralela(c).....	44
Figura 18	- Geometria de agregados.....	45
Figura 19	- Estrutura da 5,10,15,20-Tetrakis (4-sulfonatofenil)porfirinato de zinco(II) - ZnTPPS_4	48
Figura 20	- Estrutura dos compostos $\text{Na}_4[\text{M}(\text{TDFSPP})]$ sendo $\text{M} = \text{H}_2, \text{Zn}(\text{II})$	51
Figura 21	- Espectrofotômetro Cary 100 Varian utilizado para análise de absorção no UV-Vís.....	52

Figura 22	- Fluorímetro Cary Eclipse Varian utilizado para análise de fluorescência.....	52
Figura 23	- Sistema de LED em série (diodo emissor de luz).....	53
Figura 24	- Sistema de iluminação das soluções utilizado nos testes de fotobranqueamento	55
Figura 25	- Recipiente utilizado para eclosão de <i>Artemia Salina</i> nos testes de TAS.....	57
Figura 26	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em água e espectros expandidos da faixa das bandas Q em diferentes concentrações.....	60
Figura 27	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em etanol e espectros expandidos da faixa das bandas Q em diferentes concentrações.....	61
Figura 28	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em água e espectros expandidos da faixa das bandas Q.....	62
Figura 29	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em etanol e espectros expandidos da faixa das bandas Q.....	63
Figura 30	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em diferentes misturas de água e etanol.....	66
Figura 31	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em diferentes misturas de água e etanol.....	67
Figura 32	- Espectros de emissão de fluorescência da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em água com diferentes concentrações e $\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$	68
Figura 33	- Espectros de emissão de fluorescência da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em etanol com diferentes concentrações e $\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$	69
Figura 34	- Espectros de emissão de fluorescência da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em água com diferentes concentrações e $\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$	69
Figura 35	- Espectros de emissão de fluorescência da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em etanol com diferentes concentrações e $\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$	70
Figura 36	- Espectros de emissão de fluorescência da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em diferentes misturas de água e etanol.....	71

Figura 37	- Espectros de emissão de fluorescência da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ em diferentes misturas de água e etanol.....	71
Figura 38	- Reações do oxigênio singlete em meio biológico, reações com moléculas do fotossensibilizador caracterizam uma via de reação de fotobranqueamento.....	73
Figura 39	- Espectro de emissão do sistema de LED alaranjado.....	73
Figura 40	- Espectro de emissão do sistema de LED verde.....	74
Figura 41	- Espectro de emissão do sistema LED vermelho.....	74
Figura 42	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ em água durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED alaranjado em diferentes tempos de irradiação.....	75
Figura 43	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ em água durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED verde em diferentes tempos de irradiação.....	76
Figura 44	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ em água durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED vermelho em diferentes tempos de irradiação.....	76
Figura 45	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ em água durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED alaranjado em diferentes tempos de irradiação.....	77
Figura 46	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED verde em diferentes tempos de irradiação.....	78
Figura 47	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED vermelho em diferentes tempos de irradiação.....	78
Figura 48	- Fotoxidação do ácido úrico via oxigênio singlete.....	80
Figura 49	- Espectros de absorção do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em água por um período de 60 min com LED alaranjado.....	81
Figura 50	- Espectros de absorção do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em água por um período de 60 min com LED verde.....	82
Figura 51	- Espectros de absorção do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em água por um período de 60 min com LED vermelho.....	82
Figura 52	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ a $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água durante o teste do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ sob iluminação de LED alaranjado por um período de 60 min.....	83

Figura 53	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ a $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água durante o teste do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ sob iluminação de LED verde por um período de 60 min.....	84
Figura 54	- Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ a $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água durante o teste do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ sob iluminação de LED vermelho por um período de 60 min.....	84
Figura 55	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ a $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água durante o teste do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ sob iluminação de LED alaranjado por um período de 60 min.....	86
Figura 56	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ a $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água durante o teste do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ sob iluminação de LED verde por um período de 60 min.....	86
Figura 57	- Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ a $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ durante o teste do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ sob iluminação de LED vermelho por um período de 60 min.....	87
Figura 58	- Média de mortalidade de <i>Artemia salina</i> para soluções aquosas dos compostos em diferentes concentrações sem iluminação de LED.....	89
Figura 59	- Morte percentual média de <i>Artemia salina</i> para soluções aquosas dos compostos na concentração de $1,0 \mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED alaranjado.....	90
Figura 60	- Morte percentual média de <i>Artemia salina</i> para soluções aquosas dos compostos na concentração de $1,0 \mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED verde.....	91
Figura 61	- Morte percentual média de <i>Artemia salina</i> para soluções aquosas dos compostos na concentração de $1,0 \mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED vermelho.....	91
Figura 62	- Morte percentual média de <i>Artemia salina</i> para soluções aquosas dos compostos na concentração de $5,0 \mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED alaranjado.....	92
Figura 63	- Morte percentual média de <i>Artemia salina</i> para soluções aquosas dos compostos na concentração de $5,0 \mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED verde.....	93
Figura 64	- Morte percentual média de <i>Artemia salina</i> para soluções aquosas dos compostos na concentração de $5,0 \mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED vermelho.....	93

Figura 65	- Unidades formadoras de colônia de <i>Candida albicans</i> (a), <i>Escherichia coli</i> (b) e <i>Staphylococcus aureus</i> (c) sem a presença de solução dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ e iluminação.....	95
Figura 66	- Efeito da porfirina $[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ para <i>Candida albicans</i> em sistema de LED alaranjado e vermelho.....	97
Figura 67	- Efeito da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ para a bactéria <i>Escherichia coli</i> em sistema de LED alaranjado e vermelho.....	97
Figura 68	- Efeito da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> em sistema de LED alaranjado e vermelho.....	98
Figura 69	- Efeito da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ para <i>Candida albicans</i> em sistema de LED alaranjado e vermelho.....	100
Figura 70	- Efeito da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ para a bactéria <i>Escherichia coli</i> em sistema de LED alaranjado e vermelho.....	100
Figura 71	- Efeito da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ para a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> em sistema de LED alaranjado e vermelho.....	101
Figura 72	- Unidades formadoras de colônia de <i>Candida albicans</i> na presença de $[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED alaranjado.....	101
Figura 73	- Unidades formadoras de colônia de <i>Escherichia coli</i> na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED alaranjado.....	102
Figura 74	- Unidades formadoras de colônia de <i>Escherichia coli</i> na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED vermelho.....	102
Figura 75	- Unidades formadoras de colônia de <i>Staphylococcus aureus</i> na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED alaranjado.....	103
Figura 76	- Unidades formadoras de colônia de <i>Staphylococcus aureus</i> na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED vermelho.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Parâmetros fotofísicos de porfirinas meso substituídas e seus metalo complexos.....	42
Tabela 2	- Intensidades das transições eletrônicas e as regras de seleção.....	59
Tabela 3	- Valores de comprimento de onda (λ) máximo e absortividade molar para as bandas de absorção dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$	64
Tabela 4	- Percentagens de fotobranqueamento em sistemas de LED.....	79
Tabela 5	- Valores médios de grandezas obtidas a partir dos espectros do teste de ácido úrico para os compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$	88
Tabela 6	- Média do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) ($\times 10^3$) na presença e ausência da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em diferentes sistemas.....	96
Tabela 7	- Média do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) ($\times 10^3$) na presença e ausência do composto $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em diferentes sistemas.....	99

SIGLAS, FÓRMULAS E ABREVIATURAS

ν	- frequência
ALA	- δ - ácido aminolevulínico
DNA	- ácido desoxirribonucleico
FS	- fotossensibilizador
h	- constante de Planck
HOMO	- orbital molecular ocupado de mais alta energia (do termo em inglês: <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
Hp IX	- hematoporfirina IX
HpD	- derivado de hematoporfirina
HPS	- <i>N</i> - hexadecil- <i>N</i> , <i>N</i> , dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato
$[H_2(TPP)]$	- 5, 10, 15, 20 tetrakis-fenilporfirina
$Na_4[H_2(TDFPP)]$	- 5, 10, 15, 20- tetrakis (2,6 – difluorfenil)porfirina
$[H_2(TMPyP)]$	- 5, 10, 15, 20 - tetrakis (<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina
$[H_2(TMAPP)]$	- 5, 10, 15, 20-tetrakis (trimetilaminofenil)porfirina
$[H_2(TPPS_4)]$	- 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-sulfonatofenil)porfirina
$Na_4[H_2(TDFSPP)]$	- 5, 10, 15, 20 tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirina de sódio
$[H_2(TDFPF_8P)]$	- 5, 10, 15, 20 tetrakis – (2,6 - difluorfenil-octafluor)porfirina
$[H_2(TNBP_yP)]Br_4$	- Brometo de 5, 10, 15, 20 – tetrakis(<i>N</i> -4-nitrobenzil-4-piridil)porfirina
LED	- diodo emissor de luz (do termo em inglês: <i>light emitting diode</i>)
LUMO	- orbital molecular desocupado de mais baixa energia (do termo em inglês: <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
mW	- miliwatts
NADH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo

nm	- nanômetros
ns	- nanosegundos
O_2^-	- ânion superóxido
1O_2	- oxigênio singlete
PBG	- porfobilinogênico
pH	- potencial hidrogênionico
Pp IX	- protoporfirina IX
S_0	- estado singlete fundamental
S_1 / S_2	- estados singlete excitados
TFD	- Terapia Fotodinâmica
TSA	- tripticasse soy Agar
UV	- ultravioleta
UFC	- número de unidades formadoras de colônias
$Na_4 [Zn(TDFPP)]$	- 5, 10, 15, 20 tetrakis (2,6-diflorofenil)porfirinato zinco (II) de sódio
$Na_4 [Zn(TDFSPP)]$	- 5, 10, 15, 20 tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirinato zinco (II) de sódio
$Na_4 [Zn(TPPS_4)]$	- 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-sulfonatofenil)porfirinato zinco (II) de sódio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Porfirinas.....	19
1.1.1	Nomenclatura.....	21
1.1.2	Características Espectrais.....	23
1.1.3	Metaloporfirinas.....	24
1.2	Fototerapia.....	25
1.2.1	Aspetos Históricos da Terapia Fotodinâmica.....	27
1.2.2	Terapia Fotodinâmica.....	30
1.2.3	Mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica.....	32
1.2.4	Fontes de luz na Terapia Fotodinâmica.....	34
1.3	Fotossensibilizadores.....	35
1.3.1	Interações de Fotossensibilizadores com Tecidos e Células.....	36
1.4	Fluorescência.....	37
1.5	Agregação.....	42
1.6	Ensaio <i>in vitro</i> da TFD.....	45
1.7	Metaporfirina [ZnTPPS ₄].....	47
2	OBJETIVOS	
2.1	Objetivo Geral.....	50
2.2	Objetivos Específicos.....	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1	Materiais e Equipamentos.....	51
3.2	Métodos	

3.2.1	Determinação do Coeficiente de Absortividade Molar (ϵ) dos compostos em água e etanol.....	53
3.2.2	Análise da capacidade de agregação em sistema água/etanol através da absorção e fluorescência.....	54
3.2.3	Reações de fotobranqueamento	54
3.2.4	Avaliação da atividade fotodinâmica através do teste do ácido úrico.....	55
3.2.5	Ensaio Biológico <i>in vitro</i>	
3.2.5.1	Toxidade frente à <i>Artemia Salina</i>	56
3.2.5.2	Ensaio biológico com culturas de micro-organismos <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1	Determinação do Coeficiente de Absortividade Molar (ϵ) dos Compostos em Água e Etanol.....	59
4.2	Análise da Capacidade de Agregação no UV – Visível e por Fluorescência.....	65
4.3	Reações de Fotobranqueamento.....	72
4.4	Avaliação da atividade fotodinâmica através do teste do ácido úrico.....	80
4.5	Ensaio Biológicos <i>in vitro</i>	
4.5.1	Toxicidade frente à <i>Artemia Salina</i>	89
4.5.2	Cultura de micro-organismo: <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	94
5	CONCLUSÕES.....	105
	REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

Um tumor caracteriza-se pelo crescimento anormal de tecidos e células, pode ser considerado como maligno (câncer) ou benigno. As espécies de câncer mais comum no Brasil são câncer de mama, colo uterino, cólon e reto, próstata, pulmão e esôfago (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

Tratamentos e terapias tradicionais, como radioterapia, quimioterapia e cirurgia são utilizados para o tratamento dessas doenças, sendo tratamentos invasivos com geração de efeitos colaterais. Dessa forma, a Terapia Fotodinâmica (TFD) vem se tornando uma ferramenta muito útil no tratamento de diversos tipos de câncer e outras doenças não-malignas, como inativação de vírus, bactérias e fungos (MARTINEZ, 2007).

A TFD é uma técnica minimamente invasiva que consiste na administração tópica ou sistêmica de um fotossensibilizador, que normalmente concentra-se nas células afetadas, seguido de exposição à radiação na faixa de 600 a 750 nm, o que promove a destruição de tecidos anormais em regiões localizadas, gerando espécies altamente reativas, como oxigênio singlete, provocando a morte celular. Os efeitos tóxicos da TFD ficam restritos apenas na região irradiada, diferentemente dos tratamentos tradicionais, como a intervenção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia (HILL, 1992; FREITAS, 1991).

O estudo de porfirinas como fármacos e fotossensibilizadores, tem aumentado devido às suas propriedades como afinidade por tecidos tumorais, atividade fotodinâmica e absorção espectral em regiões onde tecidos biológicos são relativamente transparentes (ENGELMANN, 2005).

As porfirinas são estruturas que se encontram associadas a diversas proteínas atuando em sistemas biológicos. Em seres vivos, inúmeros processos bioquímicos são realizados por proteínas associadas a porfirinas. A biossíntese de porfirinas, para a qual a glicina é precursora, é de extrema importância devido ao papel do núcleo de porfirina em proteínas heme, como a hemoglobina e a mioglobina, nas quais o íon Fe^{2+} tem a função de ligar uma molécula de O_2 ,

possibilitando o seu transporte na corrente sanguínea (MURRAY; GRANNER; RODWELL, 2003).

1.1 Porfirinas

As porfirinas encontram-se em vários sistemas bioquímicos, distribuídas pelo reino animal e vegetal, onde são formadas a partir de substâncias relativamente simples. São responsáveis por processos vitais como transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), respiração celular, cadeia de transporte de elétrons (citocromo C), catálise de reações de hidroxilações e epoxidações (citocromo P-450). As porfirinas estão presentes na natureza principalmente na forma combinada, ocorrendo em pequenas quantidades na forma livre (STERNBERG; DOLPHIN, 1998).

A estrutura de macrociclos das porfirinas foi proposta, pela primeira vez, por Kuster em 1912 e, posteriormente, Hans Fischer (pai da Química Moderna das porfirinas), em 1929 (MILGROM, 1997).

As porfirinas são constituídas essencialmente por quatro anéis pirrólicos ligados entre si, através de uma ponte metínica, ocasionando a formação de um macrociclo (Figura 1) (STERNBERG; DOLPHIN, 1998).

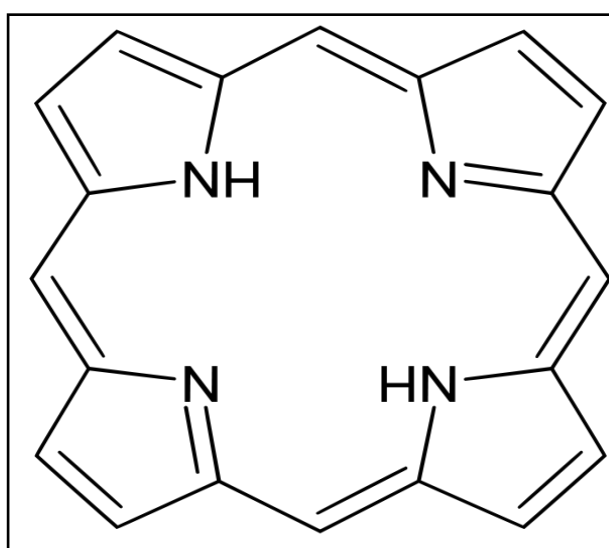


Figura 1 - Estrutura do anel porfirínico.

As diferenças estruturais dos derivados porfirínicos são decorrentes do número de insaturações nos anéis, como também da composição das cadeias laterais que se encontram junto aos anéis pirrólicos (STERNBERG; DOLPHIN, 1998).

Duas classes importantes de derivados de porfirinas são as clorinas e as bacterioclorinas. As clorinas apresentam um dos anéis pirrólicos reduzido, enquanto nas bacterioclorinas têm-se dois anéis reduzidos, conforme apresentado na Figura 2 (STERNBERG; DOLPHIN, 1998).

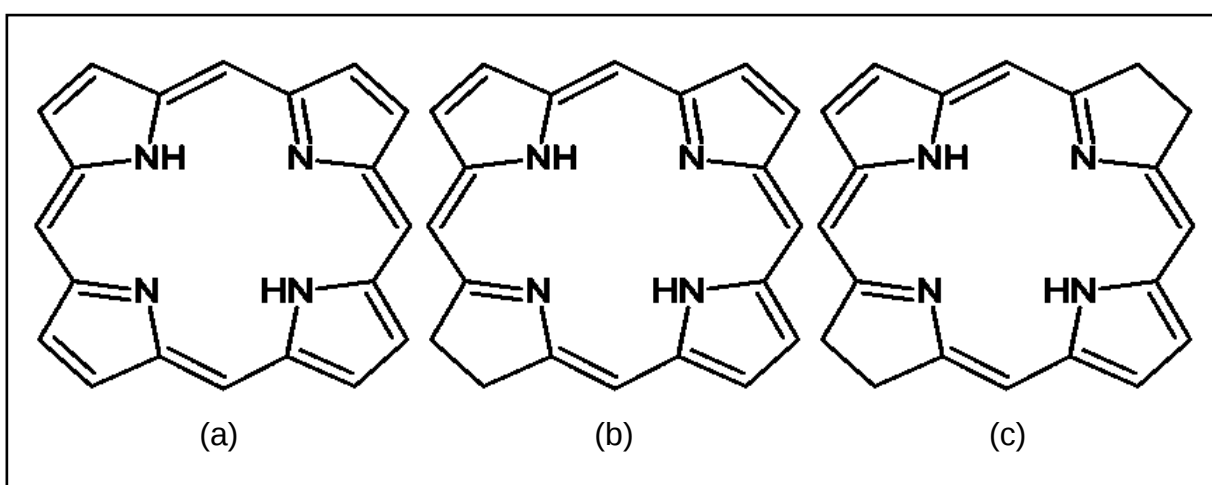


Figura 2 - Estrutura do anel porfirínico (a) da clorina (b) e da bacterioclorina (c).

A diferença no número de insaturações do anel porfirínico faz com que as clorinas e bacterioclorinas possuam alta absorção de luz na região de 600 nm, região de banda de absorção proibida por simetria nas porfirinas (SOARES, 2006).

Alguns compostos porfirínicos possuem uma alta hidrofobicidade, sobretudo na forma base livre, sendo interessante sua utilização para a TFD, pois a menor compatibilidade com a água implica geralmente, maior afinidade por tecidos celulares. Por outro lado, tal propriedade faz com que ocorra grande tendência a esses compostos se autoagregarem em soluções aquosas (DEDA; IMASATO; TOMINAGA, 2006). A autoagregação de porfirinas gera espécies pequenas, chamadas de dímeros e trímeros e também agregados grandes, chamados poliméricos. Esse estado afeta as propriedades energéticas e espectrais, ocasionando a redução no tempo de vida dos estados excitados e o rendimento

quântico de formação de oxigênio singleto, consequentemente reduzindo a eficácia em Terapia Fotodinâmica. Também essa agregação pode ocasionar a precipitação do fármaco utilizado com perdas de materiais e até mesmo ocorrer obstrução de artérias do corpo humano. Por esse motivo, a autoagregação de fármacos deve ser evitada em aplicações de Terapia Fotodinâmica (BONNETT, 1995).

1.1.1 Nomenclatura

As porfirinas apresentam um macrociclo central com 20 átomos de carbono e 4 átomos de nitrogênio, além de grupos substituintes ao redor do anel. A nomenclatura da IUPAC numera todos os átomos, incluindo os átomos de nitrogênio, foi introduzida em 1979 e concluída em 1987 (Figura 3) (MILGROM, 1997).

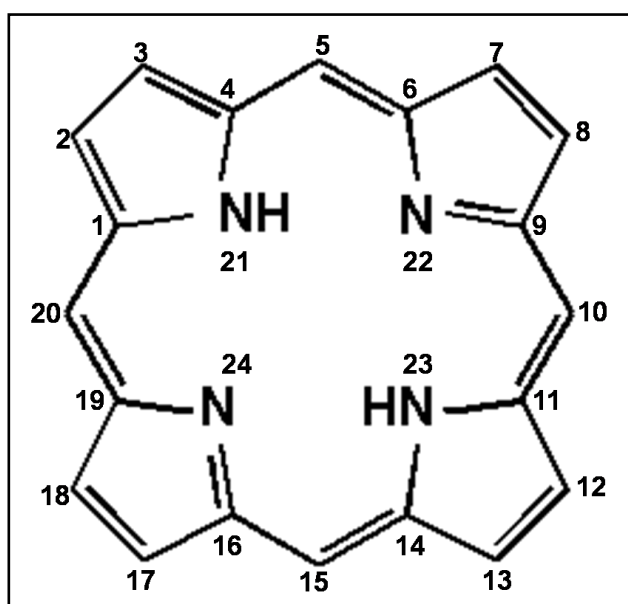


Figura 3 - Estrutura do anel porfirínico com numeração, segundo a IUPAC.

As posições 5, 10, 15 e 20 correspondem aos carbonos metínicos e são denominados “carbonos em posição *meso*”. Os átomos das posições 2 e 3; 7 e 8; 12 e 13; 17 e 18 recebem a denominação de “carbonos nas posições β -pirrólicas”. Uma

porfirina sintética com quatro substituintes em todas as posições *meso* é chamada de *meso- $\alpha,\beta,\gamma,\delta$* (Figura 4) (MILGROM, 1997).

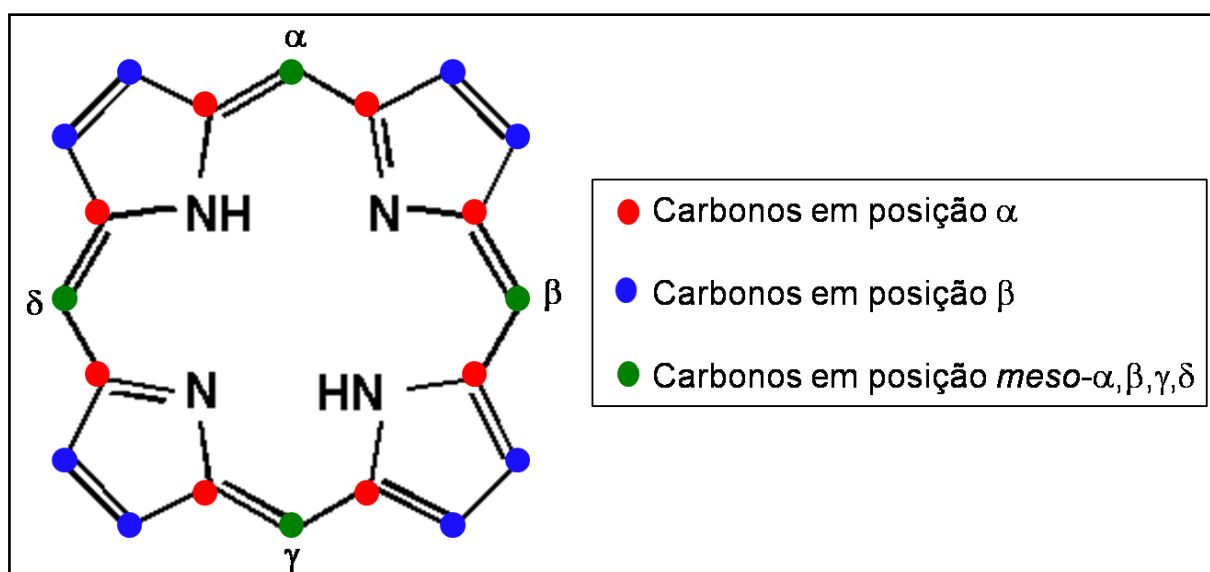


Figura 4 – Sistema de numeração do anel porfirínico de Fisher.

Porfirinas, as quais apresentam átomos de hidrogênio ligados aos de nitrogênios nas posições 21 e 23, chamam-se “bases livres”. A adição de prótons aos nitrogênios das posições 22 e 24 da origem a forma diácida e a remoção dos hidrogênios das posições 21 e 23 da origem a forma dibásica. As porfirinas que apresentam a substituição desses hidrogênios por um metal coordenado pelos quatro nitrogênios são chamadas de metaloporfirinas (MILGROM, 1997).

Nas porfirinas naturais, geralmente, ocorre a substituição de átomos de hidrogênio por resíduos de metil, etil, vinil, acetil e propionil, ligados nas posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18. Em seres vivos, geralmente as porfirinas são encontradas na forma de metalocomplexos, onde o íon Fe^{2+} é o centro metálico mais comumente encontrado. As porfirinas que apresentam substituintes do tipo alifáticos são denominadas alquilporfirinas e se os substituintes forem aromáticos, recebem a denominação de arilporfirinas (KOOLMAN; ROEHM, 2005; DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997).

O prefixo “tetrakis” é utilizado quando as porfirinas possuem quatro substituintes iguais nas posições *meso* do anel (5, 10, 15, e 20), se esses substituintes forem aromáticos, eles podem possuir heteroátomos como substituintes nas posições *orto*, *meta* e *para* (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997; MILGROM, 1997).

1.1.2 Características espectrais

As porfirinas apresentam-se como macrociclos aromáticos, que apresentam, em sua estrutura dezoito elétrons π ressonantes e quatro anéis pirrólicos planares (ESSIAS, 1986).

As porfirinas, de forma geral, possuem baixa solubilidade em água e solventes orgânicos. A insolubilidade relativa é atribuída à nuvem π , e a solubilidade em solventes orgânicos pode ser elevada, inserindo-se grupos alquila ao redor do anel porfirínico. A solubilidade em água pode ser elevada, inserindo-se grupos polares. As forças de Van der Waals podem levar a autoagregação (DOVIDAUSKAS, 2001; PARKER, 1968).

As porfirinas apresentam transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ que originam uma banda de absorção na região de 400nm a 440nm, que é conhecida como banda Soret ou banda B e usualmente quatro bandas Q na região do visível. A banda Soret pode ser atribuída a transição do orbital molecular de alta energia (HOMO), a_{1u} , para o orbital desocupado de menor energia (LUMO) sendo e_g . As bandas Q para simetria D_{4h} são atribuídas as transições do orbital a_{2u} para os níveis vibracionais 0 e 1 do orbital excitado e_g , resultando em duas bandas Q. As bandas Q são representadas na ordem decrescente de energia, $Q_y(1,0)$; $Q_y(0,0)$; $Q_x(1,0)$; $Q_x(0,0)$ são originadas na transição $\pi \rightarrow \pi^*$ com simetria das bases livres (D_{2h}) (GOUTERMAN, 1961).

As outras bandas apresentam máximos de absorção na região de 500 nm a 650 nm, que apresentam absorvidades em torno de dez vezes menores que a banda Soret. As bandas Q são menos intensas devido às transições proibidas e são divididas nas transições Q_x e Q_y e seu comportamento está associado com a estrutura vibracional. Nas porfirinas coordenadas a metais divalentes, as bandas Q são convertidas em duas bandas α e β (DOVIDAUSKAS, 2001; PARKER, 1968; KAIM; SCHWEDERSKI, 1994).

As metaloporfirinas e as porfirinas diprotonadas possuem simetria (D_{4h}) e um número menor de bandas Q, sendo $Q(1,0)$ e $Q(0,0)$ em ordem decrescente de energia. As bandas Q para simetria D_{4h} são atribuídas às transições do orbital a_{2u}

para os níveis vibracionais 0 e 1 do orbital excitado e_g resultando em duas bandas Q (ESSIAS,1986).

Quando são inseridos íons metálicos pouco eletronegativos no anel porfirínico, como Zn (II), ocorre deslocamento batocrômico da banda Soret. A caracterização de porfirinas e metaloporfirinas são realizadas por espectroscopia eletrônica na região do UV-Visível (KAIM; SCHWEDERSKI, 1994). A Figura 5 apresenta o perfil espectral da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ base livre e metalada com Zn, com suas respectivas bandas de energia.

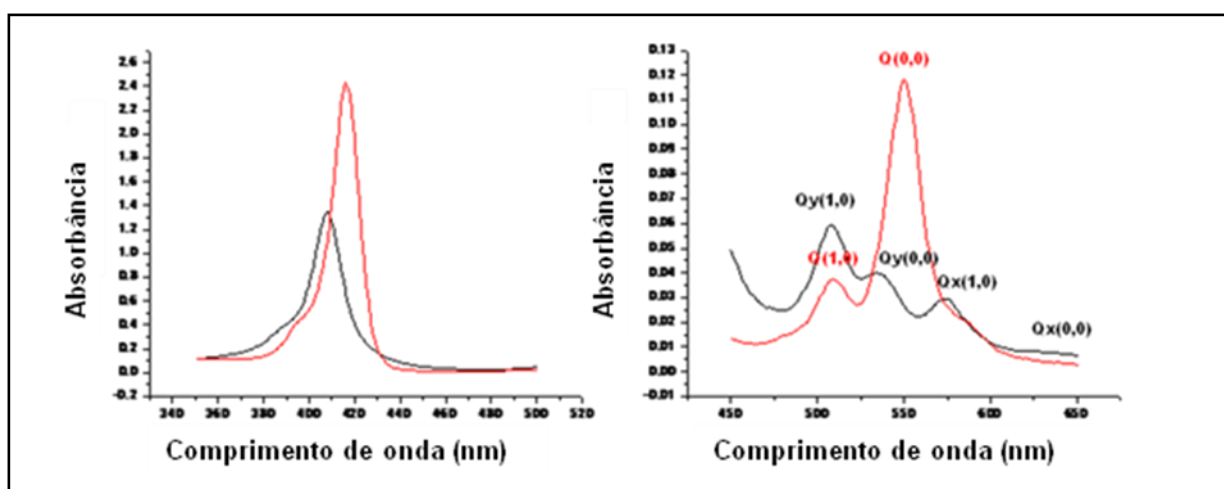


Figura 5 - Espectros eletrônicos da $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (----) e da $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (----) em água.

1.1.3 Metaloporfirinas

As porfirinas possuem a propriedade de se complexarem com um cátion metálico no centro do anel porfirínico, sendo conhecido como processo de metalação e durante esse processo ocorre uma mudança significativa na simetria do anel porfirínico, formando quelatos ou complexos muito estáveis. Dessa forma, os pigmentos pirrólicos exercem suas funções mais importantes nos organismos vivos (KAIM; SCHWEDERSKI, 1994).

As metaloporfirinas biologicamente importantes utilizam os íons ferro, magnésio e cobalto, dentre outros presentes na natureza. O ferro está presente na hemoproteína, onde os complexos de ferro são conhecidos como grupo heme. O

magnésio pode ser encontrado na clorofila e o cobalto presente na vitamina B12 (DOLPHIN, 1997).

A porfirina metalada perde a planaridade e passa a ter conformação em forma de cela. As metaloporfirinas apresentam atividade catalítica e atuam em reações de oxidação e redução, desempenham importantes papéis como catalisadores em sistemas biológicos, como o citocromo P450, que metaboliza diferentes substratos e processa materiais xenobióticos gerando metabólitos hidroxilados, que são mais facilmente excretados (PAULA; WALTERS, 1995).

A incorporação de um átomo de metal, no centro do núcleo porfirínico, altera suas propriedades, que podem ser verificadas no espectro de absorção, fluorescência e solubilidade das porfirinas e respectivos complexos metálicos (PAULA; WALTERS, 1995).

A conformação do anel e a estabilidade da metaloporfirina são influenciadas pelo tamanho do cátion, o raio dos íons vanadilo, ferro (III) e cobre (II) são 60 pm, 65 pm e 73 pm, respectivamente. Os íons vanadilo e ferro são considerados de tamanho ideal para a formação de metaloporfirinas que podem ser encontradas em sistemas naturais. Metaloporfirinas de cobre apresentam raio consideravelmente grande, e não são encontradas na natureza (KAIM; SCHWEDERSKI, 1994).

1.2 Fototerapia

A fototerapia utiliza a luz visível ou de uma região próxima do visível em terapias, podendo ser subdividida em direta, ou seja, sem administração de um sensibilizador, e indireta, que ocorre com administração de um sensibilizador. Na fototerapia direta, a absorção de luz por moléculas do organismo, podem conduzir a reações bioquímicas específicas ou podem afetar todo o metabolismo celular. A fototerapia indireta trata-se de uma modalidade de tratamento que emprega a combinação da luz e um fotossensibilizador para obter um efeito citotóxico esperado (CARLOS, 2007).

A fototerapia direta ocorre quando moléculas biológicas absorvem luz e sofrem alterações, dentre as quais proteínas e ácidos nucleicos. A ocorrência de absorção de luz pelo DNA pode ocasionar mudanças com consequente regulação de suas

funções biológicas. As mudanças provocadas pela absorção de luz UV nas estruturas secundária e terciária são induzidas pela variação das bases que constituem o DNA. A variação da densidade super-helicoidal do DNA é decorrente da afinidade entre o DNA e as proteínas em uma sequência de interações específicas, dessa forma a modificação de parâmetros como conformação helicoidal ou ângulo entre as bases são importantes na regulação de funções biológicas das proteínas (SOARES, 2005; CARLOS, 2007; STERENBORG et al., 1996).

A fototerapia indireta ocorre quando efeito é ocasionado por um fotossensibilizador, que atua como absorvedor efetivo da luz empregada no tratamento fototerápico. Após a ocorrência da absorção da luz pelo fotossensibilizador, tem-se a formação de um estado excitado, que é o estado reativo responsável pelo efeito terapêutico. A desativação do estado excitado ocorre através de vários processos, com a ocorrência de transformação do próprio fármaco ou através de reações de transferência de elétrons ou energia com moléculas endógenas (STERENBORG et al., 1996).

Outro aspecto importante da fototerapia indireta é a utilização de fotossensibilizadores para o diagnóstico de tumores através da emissão de fluorescência, sendo uma técnica baseada na propriedade de acumulação seletiva em tecidos tumorais de fotossensibilizadores, que interagem com os tecidos e apresentam emissão de fluorescência, como ocorre com algumas porfirinas. A Terapia Fotodinâmica é um tipo de fototerapia indireta que faz uso de um fotossensibilizador e luz visível (STERENBORG et al., 1996).

Para cada tipo de tratamento é necessário a análise do efeito fotobiológico da radiação utilizada durante o diagnóstico e o tratamento através da fototerapia, sendo necessário um conhecimento exato da sensibilidade espectral do meio biológico e do efeito fotobiológico no tratamento (ROVERS et al., 1999).

Em seres humanos, encontram-se várias moléculas capazes de absorver luz, sendo o motivo pelo qual deve-se ter um controle exato da luz que está sendo absorvida pelas moléculas, evitando uma possível ocorrência de reações de transferência de elétrons ou de energia indesejáveis. Um exemplo de molécula que absorve luz na região UV podendo ocasionar a clivagem de suas ligações e consequentes mutações é o DNA (ROVERS et al., 1999).

1.2.1 Aspectos históricos da TFD

As civilizações antigas, como as do Egito, Índia e China, utilizavam a ação fotodinâmica pela ingestão das plantas que continham psoralenos (substâncias que tornam a pele muito mais sensível aos efeitos da luz ultravioleta) com posterior exposição à luz solar para tratar lesões despigmentadas na pele, conhecidas como vitiligo. Como resultado, as lesões eram pigmentadas semelhantes, como acontece com uma queimadura solar (ROBERTS; CAIRNDUFF, 1995; STENBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998).

Em 1903, Tappeiner e Jesionek realizaram a primeira aplicação clínica, utilizando-se a eosina (Figura 6), também foram os primeiros a utilizarem eosina no tratamento de carcinomas em humanos. No ano seguinte, utilizaram, pela primeira vez, o oxigênio, após verificarem a necessidade de sua utilização no processo (ROBERTS; CAIRNDUFF, 1995; STENBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998; MACHADO, 2000).

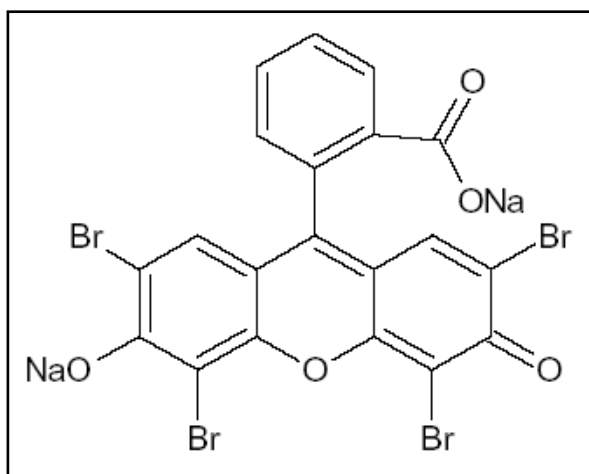


Figura 6 - Estrutura da Eosina Y.

Em 1905, esses cientistas descreveram os resultados de seu primeiro tratamento em 6 pacientes com carcinoma basocelular facial. Para o tratamento utilizou-se 1% de eosina e exposição solar. Como resultado, quatro pacientes

apresentaram remoção total dos tumores em um período de 12 meses de tratamento (LIPSON; BALDES, 1960).

Witt Hausmann, em 1908, deu início aos primeiros experimentos realizados com camundongos albinos, ao qual foi injetado hematoporfirina IX (Figura 7) e expostos à luz solar, ou seja, utilizando-se a fotocitotoxicidade com hematoporfirina IX (Hp IX). O principal efeito foi associado aos danos da vascularidade tumoral (LIPSON;BALDES,1960).

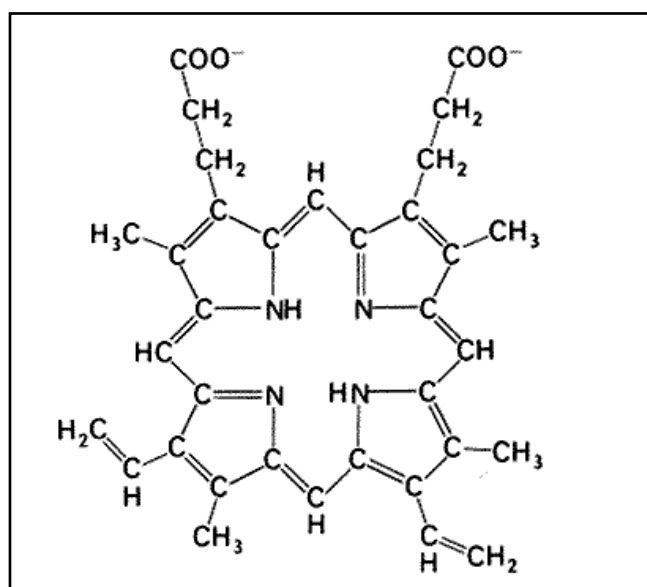


Figura 7 – Estrutura da hematoporfirina IX.

Em 1909, Hasselbach demonstrou o aumento da constante de fotorreação em presença de oxigênio. Em 1912, ocorreu a primeira demonstração de TFD por Hp IX em humanos. Friedrich Meyer-Betz realizou a sua experiência em si mesmo em 12 de outubro de 1912. Ele autoinjetou 200 mg de Hp IX dissolvido em 10 mL de NaOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$ e diluído em 300 mL de soro fisiológico, manteve-se dois dias sem exposição à luz, não apresentou nenhum efeito dermatológico e, após dois dias, foi exposto à luz solar. Friedrich Meyer-Betz sofreu os efeitos da TFD (Figura 8), apresentou fotossensibilidade prolongada, que persistiram por alguns meses, também constatou que, protegendo o lado esquerdo da face, os efeitos ficam restritos ao lado direito (LIPSON; BALDES, 1960).

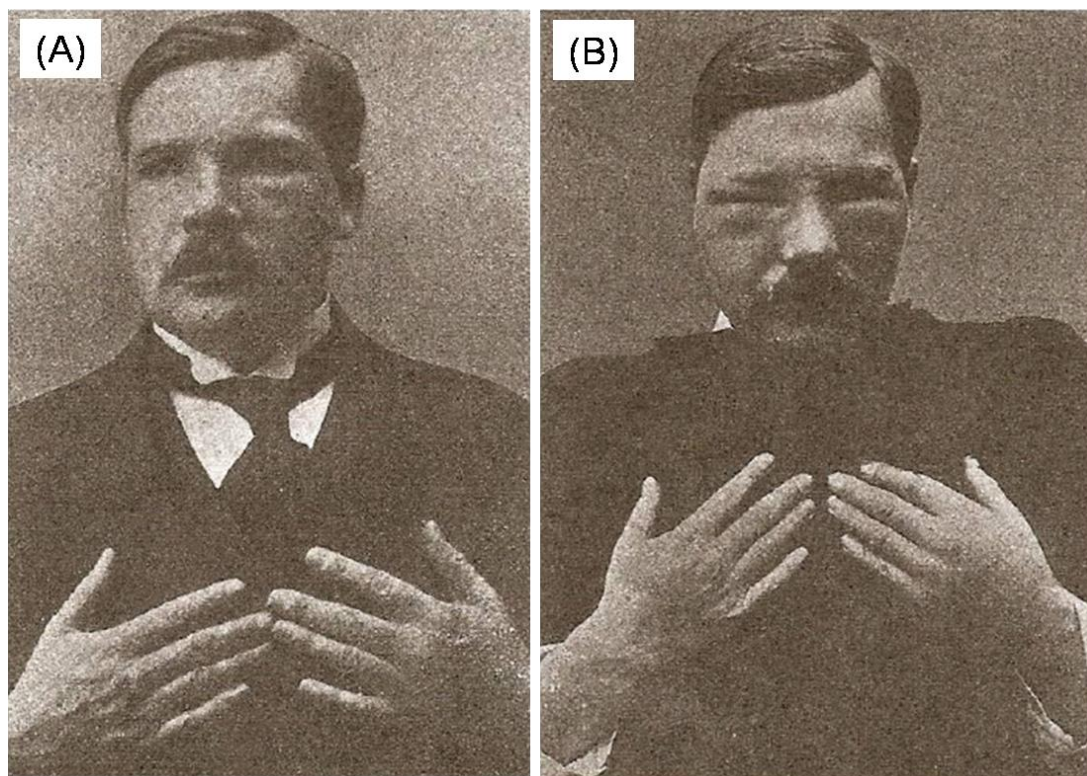


Figura 8 - Friedrich Meyer-Betz antes (A) e após (B) aplicação de HP IX e exposição à luz solar (FERNANDES, 2007).

Frank Figge, em 1948, com colaboradores propuseram que porfirinas deveriam ser utilizadas no tratamento de câncer. Demonstraram através de estudos com animais de laboratório que apresentam alta divisão celular (como células malignas, embrionárias e células regenerativas) (STENBERG et al.,1998).

Em 1954, realizou-se um tratamento em 11 pessoas com câncer com a introdução intravenosa de Hp IX e irradiação com luz ultravioleta durante a cirurgia, concluindo-se que a Hp IX poderia ser utilizada no diagnóstico de tumores (ROBERTS;CAIRNDUFF,1995;STENBERG et al.,1998).

Posteriormente, Schwartz, demonstrou que o princípio ativo do experimento de Friedrich Meyer-Betz não correspondia a Hp IX, pois é um composto facilmente eliminado pelo organismo, conclui-se então que se tratava de uma mistura de diversos oligômeros da Hp IX resultante do método de separação, que foi enriquecida e chamada de Derivado de Hematoporfirina (HpD) (ROBERTS;CAIRNDUFF,1995).

Em 1960, Lipson realizou estudos em cobaias através do acúmulo preferencial da droga em tumores e sua redução com exposição à irradiação. Ao

obter resultados positivos, ele tratou um câncer de mama através do uso de HpD e irradiação seletiva do tumor, sendo um fato que marcou o início da TFD como terapia clínica para o tratamento de câncer (LIPSON;BALDES; OLSEN,1961).

Em 1970, ocorreu o surgimento de vários derivados porfirínicos, ocasionando o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores (FS) e ao desenvolvimento do HpD, o qual foi denominado Photofrin II (LIPSON;BALDES; OLSEN,1961).

Dougherty e Kelly, em 1975, utilizaram a TFD para o tratamento de câncer de pele. Em 1980, o derivado de Hematoporfirina (HpD) foi otimizado, sendo aprovado nos Estados Unidos (EUA) para tratamento de câncer por TFD em 1988 (LIPSON;BALDES; OLSEN,1961).

O número crescente de pesquisas realizadas para o desenvolvimento de fontes luminosas, fotossensibilizadores e mecanismos de ação possibilitam um maior número de tratamento com a utilização da TFD (MILGROM, 1997).

1.2.2 Terapia Fotodinâmica

A TFD refere-se ao uso terapêutico de reações fotoquímicas, é uma modalidade de tratamento minimamente invasivo, capaz de eliminar preferencialmente células neoplásicas e lesões pré-cancerosas. Não sendo uma técnica recente, pois é considerada promissora no tratamento de afecções desde o começo de 1980, a Terapia Fotodinâmica fundamenta-se no uso associado de substâncias fotorreagentes, ou seja, que respondem de maneira conhecida quando expostas a aparelhos especiais que emitem luzes polarizadas (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A TFD está sendo estudada para o tratamento de diversas afecções que apresentam, como característica, o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo apresentar metástase para outras regiões do corpo, pode ser observado (Figura 9). Uma destas afecções mais comuns é o câncer, o qual é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células (JAMNIK et al., 2009; SOARES, 2006; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

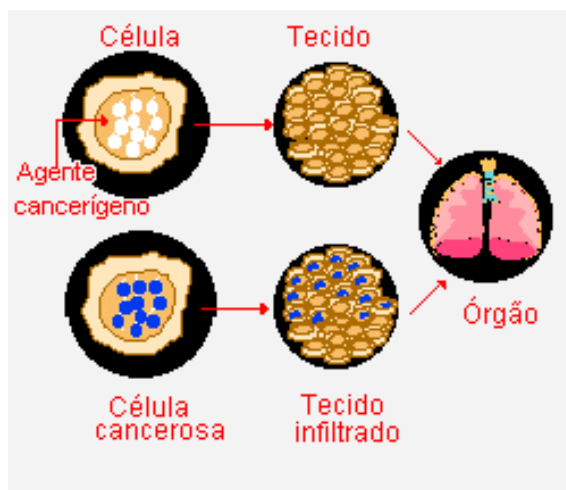


Figura 9 - Caminho de célula e agente cancerígeno aos órgãos (JAMNIK, 2009).

Diversas técnicas convencionais são utilizadas no tratamento de câncer, as quais oferecem melhoria significativa para os pacientes e, em alguns casos, a sua cura, dentre as quais, a radioterapia, cirurgia e a quimioterapia (MURRAY; GRANNER; RODWELL, 2003).

A Terapia Fotodinâmica é um método eficiente, não é invasivo, sendo seletivo na destruição do tecido doente, sem danificar os tecidos saudáveis próximos, provocando a desativação do vírus, como também destruição de bactérias e fungos (SOARES, 2006).

O tratamento com a TFD inicia-se com a administração do corante fotossensibilizador (agente fototerapêutico) no paciente. Quando a concentração do corante atinge seu máximo no tecido doente inicia-se a exposição do tumor a radiação visível de comprimento de onda adequado para ocorrer à excitação do agente. Normalmente essa radiação é fornecida por um laser ou fonte de luz visível (MACHADO, 2000).

Um estudo realizado em 1924 constatou-se que porfirinas poderiam ser encontradas em altas concentrações em tumores malignos. Tais porfirinas não apresentam toxicidade, mas quando, em presença de luz visível e oxigênio, podem tornar-se tóxicas aos tecidos celulares (MACHADO, 2000).

Em estudos posteriores, constatou-se que o oxigênio singlete, obtido por processos de sintetização, considerando a transferência de energia do agente fototerapêutico no estado excitado triplete para o oxigênio molecular em seu estado

fundamental era o agente citotóxico responsável pela desativação de células tumorais (MACHADO, 2000; PERUSSI, 2007).

1.2.3 Mecanismo de ação da TFD

A excitação eletrônica é a fase inicial no processo de fotossensibilização, sendo importante que um fotossensibilizador utilizado em TFD seja excitado em comprimentos de onda de maior penetração no tecido biológico (BONNETT, 2000).

Os fotossensibilizadores, que absorvem na região do infravermelho próximo permitem o tratamento em tecidos mais profundos até um centímetro, o que possibilita o tratamento de tumores mais internos (BONNETT, 2000).

A Figura 10 apresenta um diagrama de penetração da radiação na faixa do visível e infravermelho próximo no tecido em função do comprimento de onda. Pode-se observar que a penetração é mais intensa na região do vermelho e do infravermelho próximo (BONNETT, 2000).

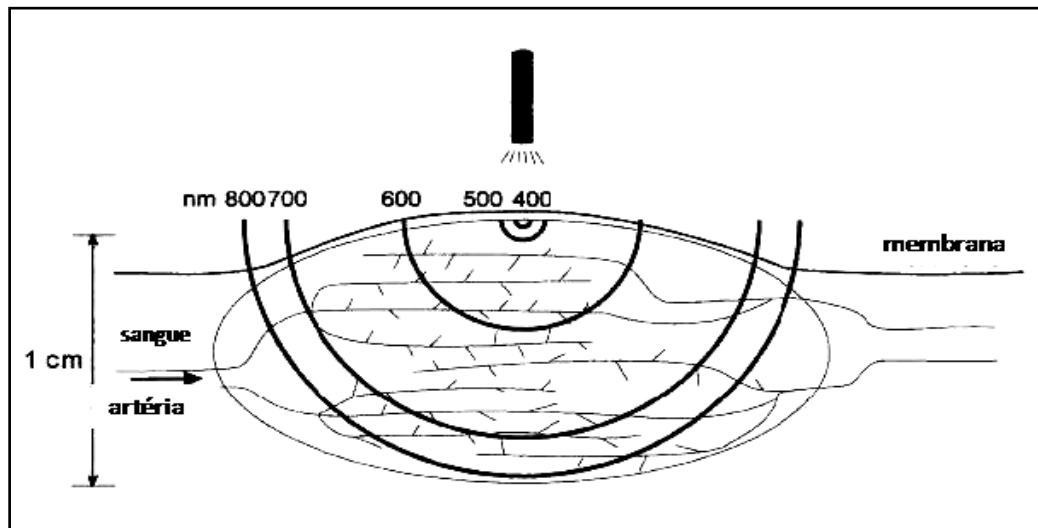


Figura 10 - Profundidade de penetração da luz no tecido em função do comprimento de onda (BONNETT, 2000).

Existem dois caminhos que levam à morte celular pelo processo de fotootoxidação, definidos como mecanismo Tipo I e mecanismo Tipo II (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; MACHADO, 2000).

O mecanismo tipo I envolve a transferência de elétrons do fotossensibilizador em estado excitado, gerando radicais livres que apresentam a tendência de reagirem com o oxigênio no estado fundamental, o que resulta produtos oxidados (Figura 11), o fotossensibilizador é representado por S e a molécula, que será oxidada, por A (MACHADO, 2000; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

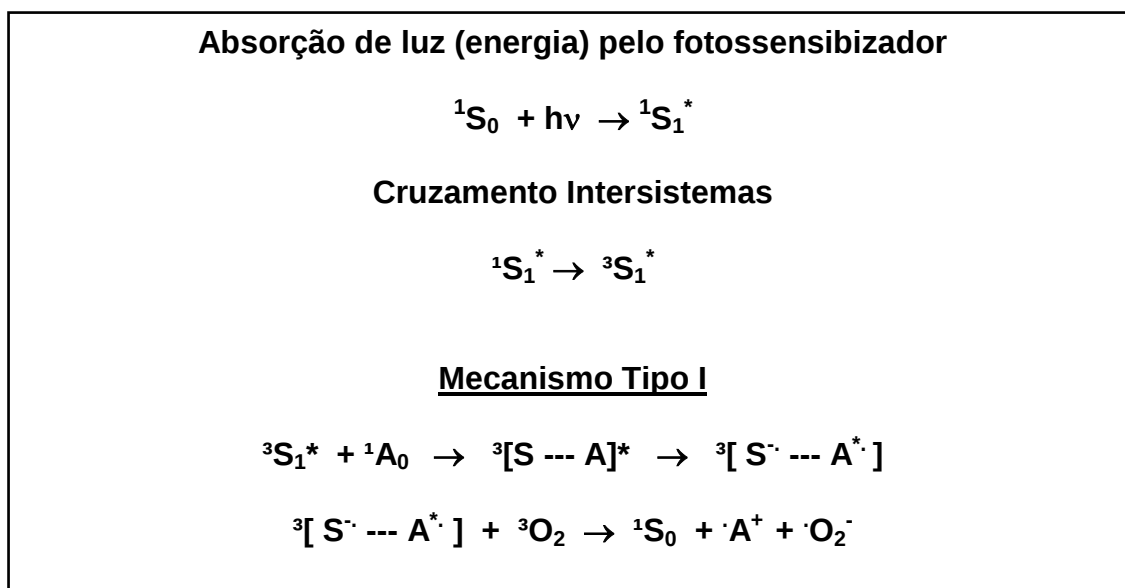


Figura 11 - Mecanismo Tipo I da TFD.

No mecanismo Tipo I, a substância fotossensibilizante ativada pela luz interage com alvos biológicos e, em combinação com o O₂ do meio, gera o ânion radical superóxido ($\cdot O_2^-$) (HADJUR, 1995).

O mecanismo Tipo II, envolve a transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete, com a formação de oxigênio no estado singlete que, por sua vez, atua nos alvos biológicos (Figura 12), o qual é um agente altamente citotóxico (HADJUR, 1995; PERUSSI, 2007).

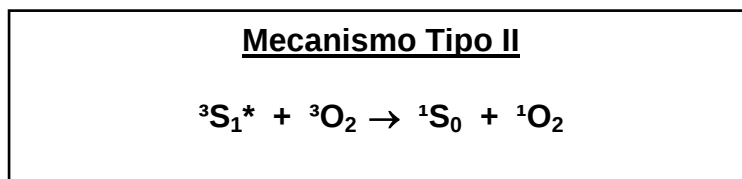


Figura 12 - Mecanismo Tipo II da TFD.

O mecanismo do Tipo II destrói muitos compostos fora e dentro da célula, enquanto o Tipo I necessita da penetração do fotossensibilizador no meio celular (HADJUR, 1995).

Um agente fototerapêutico adequado deve possuir um tempo de vida do estado tripleto longo (≥ 500 ns) podendo reagir de forma eficiente com o oxigênio e com moléculas próximas. É necessário apresentar absorvidade molar alta na região entre 600-800 nm, região na qual a membrana celular apresenta apreciável transparência à radiação eletromagnética, sendo possível uma considerável penetração de luz superior a 2 ou 3 cm em tecidos que apresentam baixa pigmentação (MACHADO, 2000).

1.2.4 Fontes de luz na Terapia Fotodinâmica

A utilização de laser em TFD desencadeou o desenvolvimento de laser de diodos, que possuem alta potência, particularmente, na região do infravermelho, e são de custo inferior ao de sistemas laser convencionais. Essas fontes tornam-se mais atraentes para utilização em TFD pela sua facilidade de utilização e potência, como também sua emissão em um único comprimento de onda e a possibilidade de acoplamento a fibras óticas, o qual é essencial para o tratamento de enfermidades em órgãos internos. Tais propriedades tornam o laser mais efetivo que a utilização de lâmpadas convencionais (MANG, 2004; AVELINE; HASAN; REDMOND, 1995).

Os sistemas de LED são uma categoria de fonte de luz fria que emitem radiação em uma longa faixa do espectro, e com um comprimento de onda predominante, apresentam emissão de luz espontânea, não coerente e com certo espalhamento. Os LED apresentam baixo custo e uma tecnologia mais simples que o laser, e tem-

se apresentado como um facilitador para utilização em TFD (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

1.3 Fotossensibilizadores

Um corante fotossensível é considerado o principal agente ativador no processo fotodinâmico, por possuir diversas propriedades físico-químicas, fotobiológicas e farmacológicas, que também apresenta efeitos colaterais mínimos (MACHADO, 2000).

As características necessárias a um fármaco com aplicação em Terapia Fotodinâmica são:

- alta estabilidade;
- baixa toxicidade no escuro;
- alta seletividade;
- facilidade de obtenção;
- simplicidade na formulação;
- favorável farmacocinética de obtenção;
- alta absorção de luz na região de 600 a 800 nm;
- alto rendimento quântico de formação de $^1\text{O}_2$ (para o mecanismo do Tipo II).

As porfirinas e seus derivados são compostos de interesse para aplicação em Terapia Fotodinâmica, devido à presença de características favoráveis a técnica (MACHADO, 2000).

O Photofrin[®] foi a primeira formulação aprovada pelas autoridades de saúde dos Estados Unidos em 1998, para o tratamento de câncer através da TFD, trata-se de uma formulação polimérica de hematoporfirina IX (Hp IX) de constituição indefinida (MACHADO, 2000).

A Hp IX é derivada da hematoporfirina IX (Pp IX), que é de origem natural que constitui biomoléculas. Quando ocorre acúmulo de compostos porfíricos em tecidos cutâneos, gera reações indesejáveis de fotossensibilização, sendo limitado o uso da Pp IX. A Figura 13 representa a estrutura da Pp IX com posições numeradas e a rota biossintética simplificada. O Photofrin[®] apresenta formulação indefinida e

está propenso a formação de estados agregados, tornando sua formulação mais complexa (BYRNE; MARSHALLSAY; WARD, 1990).

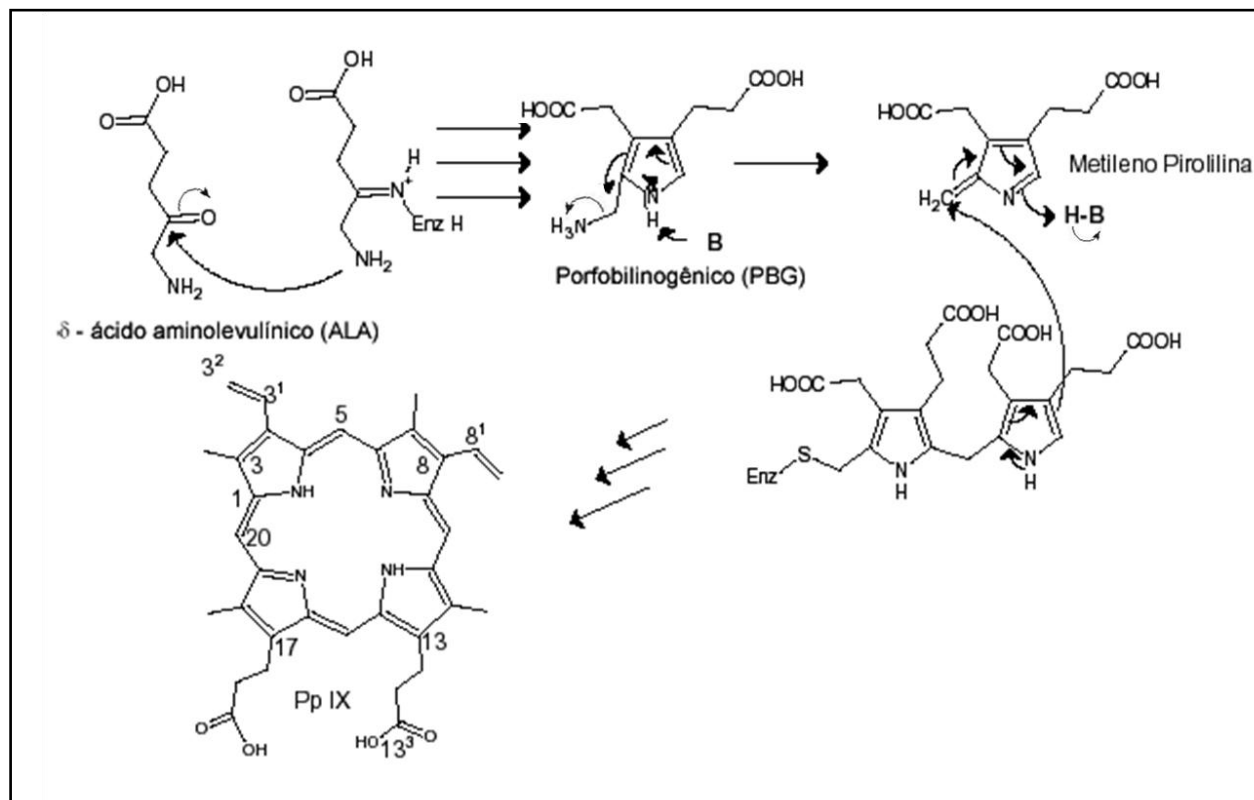


Figura 13 - Rota Biossintética da Pp IX a partir do ácido α -aminolevulínico (BYRNE; MARSHALLSAY; WARD, 1990).

O Photofrin[®] apresenta farmacocinética desfavorável e, embora se acumule em tumores, ele é de difícil eliminação, o que causa uma atividade prolongada no paciente (BYRNE; MARSHALLSAY; WARD, 1990).

1.3.1 Interações de fotossensibilizadores com tecidos e células

As propriedades fotoquímicas e farmacocinéticas dependem da solubilidade do fotossensibilizador. Uma das propriedades esperadas do fotossensibilizador é que este, quando injetado, permeie as membranas celulares e possa aderir ao tecido, preferencialmente, ao tecido tumoral (HUTENER; SANDERS, 1990).

É importante que os fotossensibilizadores possuam grupos polares ou iônicos que proporcionem hidrossolubilidade e cadeias carbônicas longas para que sejam lipossolúveis (HUTENER; SANDERS, 1990).

A eficácia de um fotossensibilizador é dependente da interação com componentes do plasma sanguíneo, como lipoproteínas e albumina. Alguns compostos porfirínicos possuem a tendência em acumular-se nas membranas e células, tornando uma condição favorável a TFD. A incorporação de um fotossensibilizador no tecido é de importância relevante, pois depende da interação com sistemas biológicos, como as membranas, sendo a incorporação um fator mais importante que a formação de oxigênio singlete (ENGELMANN et al., 2007).

1.4 Fluorescência

Com a absorção de luz, o estado excitado pode retornar ao estado fundamental por vários caminhos com a formação de um composto mais estável e com menor energia. Os elétrons em temperatura ambiente encontram-se preferencialmente no estado vibracional mais baixo do estado fundamental singlete (S_0) e com absorção de energia ocorrem transições para níveis vibracionais mais altos (1, 2,..., n) dos estados excitados singlete (S_1 , S_2 ,... S_n). Posteriormente, a energia térmica é dispersa, atinge um nível vibracional mais baixo do estado excitado S_1 através do processo de conversão interna. A desativação do estado excitado ocorre em duas etapas, sendo uma não-radioativa, ou seja, a conversão interna $S_0 \rightarrow S_1$ e uma emissão radioativa com emissão de luz $S_1 \rightarrow S_0$ sendo chamada de fluorescência, esta transição pode ocorrer para um nível vibracional do estado fundamental diferente de zero, o que gera diferentes bandas no espectro de emissão (TURRO; BALZANI; SCANDOLA, 1978).

Também pode ocorrer uma transição proibida, ou seja, entre estados de multiplicidades diferentes, geralmente $S_1 \rightarrow T_1$, etapa denominada como cruzamento intersistemas (DOVIDAUSKAS, 2001; PARKER, 1968).

Transições entre dois estados de mesma multiplicidade são permitidas, sendo que a transição entre estados singlete e triplete é possível desde que uma

perturbação interna ou externa de origem a uma mistura dos estados envolvidos, dando origem a estados singlete e triplete impuros, que são originadas de interações magnéticas entre o movimento orbital do elétron e o momento magnético do spin, sendo denominado de acoplamento spin-órbita (LACOWICZ, 1986; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

O diagrama de Jablonski simplificado, (Figura 14) representa as possíveis transições eletrônicas após excitação por $h\nu$ (1), representando o decaimento não radiativo $S_n \rightarrow S_1$ (2); emissão de fluorescência $S_1 \rightarrow S_0$ (3); decaimento não radiativo $S_1 \rightarrow S_0$ (4) e $T_1 \rightarrow S_0$ (8); cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$ (5) e emissão de fosforescência $T_1 \rightarrow S_0$ (7).

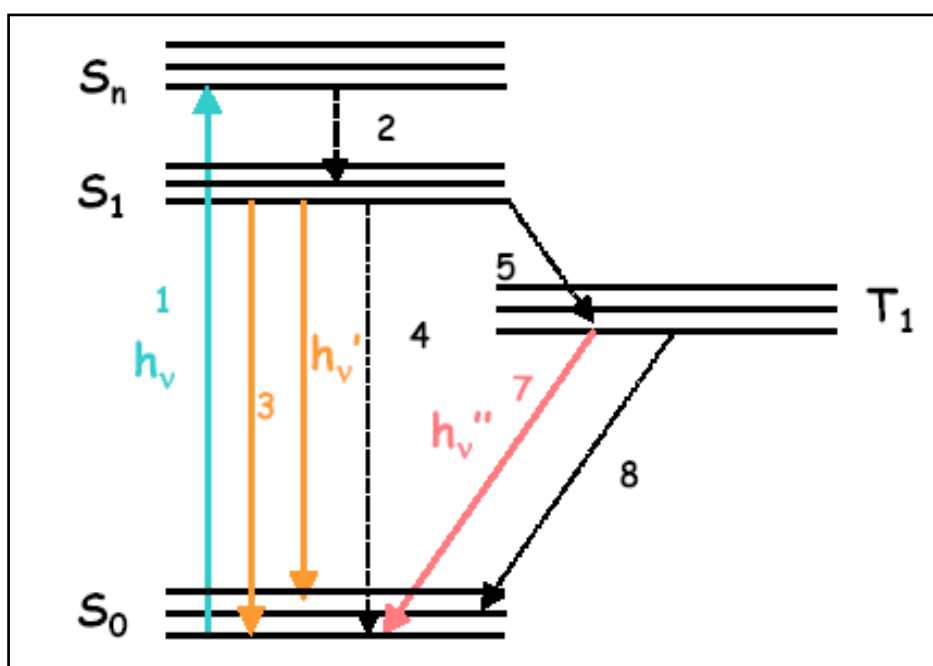


Figura 14 - Representação do Diagrama de Jablonski – (1) Possíveis transições eletrônicas após excitação por $h\nu$; (2) decaimento não radiativo $S_n \rightarrow S_1$; (3) emissão de fluorescência $S_1 \rightarrow S_0$; (4) decaimento não radiativo $S_1 \rightarrow S_0$; (5) cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$; (7) emissão de fosforescência $T_1 \rightarrow S_0$; (8) cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1$.

Em processos de caracterização que levam a formação e desativação de estados excitados, consideram-se as constantes de velocidade e rendimentos quânticos, sendo que a magnitude destes dois parâmetros determina as

propriedades fotoquímicas intrínsecas da molécula (LACOWICZ, 1986; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Quando um material é fotoexcitado, a energia recebida na forma de fótons faz com que os elétrons sejam transferidos de uma camada de menor energia para uma de maior energia, onde os elétrons excitados retornam a camada de menor energia, sendo esse processo denominado de fluorescência (GEORGAKOUD, 2003).

A intensidade da fluorescência para determinadas porfirinas depende de vários fatores, como natureza do solvente, temperatura, pH do meio, concentração dos eletrólitos. A excitação de fluorescência das porfirinas e seus sais correspondem, no respectivo comprimento de onda, à situação das bandas de absorção, na região visível e ultravioleta, dos pigmentos tetrapirrólicos (LASCELLES, 1964; FALK, 1963).

A fluorescência é caracterizada como a emissão de radiação que resulta do decaimento da molécula de um dos estados excitados singleto (S_1 e S_2) para o estado fundamental (S_0). O tempo de vida de fluorescência é da ordem de 10^{-7} a 10^{-9} segundos, portanto o fenômeno da fluorescência ocorre após 10^{-8} segundos da absorção da luz. Durante esse período, alguns processos podem ocorrer como reações fotoquímicas, o que pode afetar características espectrais do composto fluorescente (RAMANUJAM, 2000; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

A fluorescência é proveniente do menor nível vibracional do estado eletrônico excitado, em que a energia do fóton emitido será menor que a energia do fóton absorvido e a fluorescência é deslocada em direção à região do vermelho do espectro eletromagnético, considerando a absorção. O espectro de emissão resultante da fluorescência reflete os níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental, dessa forma pode ser utilizado para caracterização e identificação de moléculas (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Trata-se de uma técnica de grande sensibilidade, podendo trabalhar com soluções da ordem de 10^{-5} e 10^{-7} mol .L⁻¹ e também devido à escala de tempo da técnica. A fotodetecção por fluorescência é apontada como uma técnica para diferenciar tecidos biológicos, além de diagnosticar lesões tumorais e investigar alterações no metabolismo de células (BORGES, 1994).

As técnicas de fluorescência são importantes para o estudo de fenômenos relacionados a propriedades de moléculas biológicas, o que proporcionam informações sobre posição espectral de bandas, rendimento quântico de fluoróforos e medidas com resolução temporal que fornecem o decaimento da intensidade e da

anisotropia de fluorescência (RAMANUJAM, 2000; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009).

Os cromóforos presentes em tecidos biológicos são de três tipos: os fluoróforos, que são grupos químicos que podem converter a luz absorvida em fluorescência; absorvedores, que são grupos químicos que absorvem luz e não produzem fluorescência e os espalhadores, que possuem estruturas que alteram a direção do fóton incidente, mas conservam a sua energia (DaCOSTA; ANDERSON; WILSON, 2003).

As propriedades ópticas de cada cromóforo dependem do comprimento de onda de excitação e do tipo de tecido, sendo que a maioria dos cromóforos são sensíveis ao ambiente que se encontram e principalmente ao estado metabólico dos tecidos. Em tecidos biológicos, os fenômenos de espalhamento e absorção apresentam maior probabilidade de ocorrer do que o processo de conversão em fluorescência. A luz monocromática incidente na superfície do tecido é espalhada intersticialmente, podendo ser absorvida ou refletida de forma difusa. A luz absorvida pode-se converter para fluorescência, que pode ser espalhada, reabsorvida ou reemitida pela superfície do tecido (DaCOSTA; ANDERSON; WILSON, 2003).

A fluorescência poder ser utilizada para a obtenção de uma imagem ou avaliação espectroscópica. No caso de obtenção de imagem, é possível visualizar uma imagem macroscópica de uma lesão, podendo-se obter a delimitação com o tecido sadio (DaCOSTA; ANDERSON; WILSON, 2003).

As porfirinas são comumente citadas na fotodetecção em tecidos tumorais como um dos principais responsáveis pela fluorescência vermelha que é emitida. Esse fato é explicado devido à maior concentração das porfirinas em tecidos neoplásicos, quando comparado com tecidos normais (MULLER et al., 2003).

A espectroscopia de fluorescência realiza uma análise com maiores detalhes da luz emitida, obtendo-se a intensidade de cada comprimento de onda, investigando-se o ponto analisado, sendo utilizado um sistema composto por um laser de excitação, ponteira de aplicação e coleta da luz e um monocromador. Em análises da autofluorescência para determinação de tecidos neoplásicos e normais, os principais fluoróforos endógenos utilizados como biomarcadores são as porfirinas, NADH, flavinas e colágeno (DaCOSTA; ANDERSON; WILSON, 2003).

A fluorescência possui várias vantagens em relação à absorbância, entre as quais, podem-se destacar a maior sensibilidade, a maior seletividade e a maior dependência do meio circundante (OHWEILER, 1974).

A sensibilidade da fluorescência é aproximadamente duas ordens logarítmicas maior do que a absorbância. Quanto à seletividade, é interessante mencionar que um composto fluorescente geralmente possui mais de um espectro de emissão, cada qual para certo comprimento de onda de excitação, fazendo com que esse método também seja melhor do que a absorbância para a determinação qualitativa do composto (OHWEILER, 1974).

Além dessas vantagens, a fluorescência é extremamente sensível ao meio em que se encontra o composto. Existem várias substâncias que suprimem a emissão de fluorescência, dentre os quais se podem citar o O_2 (OHWEILER, 1974).

Um grande número das porfirinas bases livres e metaloporfirinas são luminescentes, e são classificadas como fluorescentes ou fosforescentes de acordo com a magnitude dos rendimentos quânticos. Porfirinas bases livres e metaloporfirinas com metais de camada cheia são fluorescentes, sendo observado esse efeito à temperatura ambiente, ao passo que a fosforescência é observada a baixas temperaturas e em meio congelado, diminuindo-se a conversão interna $T_1 \rightarrow S_0$. As metaloporfirinas de elementos de transição não apresentam fluorescência devido à formação de novos estados gerados pelos orbitais d, o que permite vias de decaimento não-radiativo (LACOWICZ, 1986; SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2009). A Figura 15 apresenta um espectro de emissão da tetrafenil porfirina (TPP) em clorofórmio.

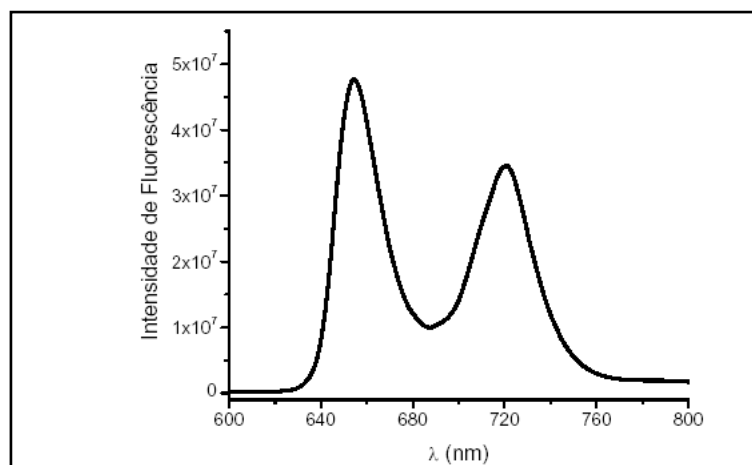


Figura 15 - Espectro de emissão da 5, 10, 15, 20 - tetrafenilporfirina H_2 (TPP) em clorofórmio (SOARES, 2005).

Parâmetros de emissão de porfirinas aquossolúveis TMPyP, TPPS, TMAPP e seus metalo derivados foram estudadas na década de 80, como parte da caracterização de fotossensibilizadores em sistemas de conversão de energia. A Tabela 1 apresenta valores de rendimento quântico de fluorescência e o tempo de vida de algumas porfirinas (SOARES, 2005).

Tabela 1 – Parâmetros fotofísicos de porfirinas meso substituídas e seus metalo complexos

<i>Porfina</i>	Φ_F	$\tau_S (ns)$	Φ_T	$\tau_T (ms)$
H ₂ TPPS	0,08	10,4	0,78	0,42
H ₂ TMAPP	0,07	9,3	0,80	0,54
H ₂ TMPyP	0,047	6,0	0,95	0,17
ZnTMAPP	---	1,75	0,82	1,2

Φ_F : rendimento quântico de fluorescência; τ_S : tempo de vida do estado singleto; Φ_T : rendimento quântico de formação do estado tripleto; τ_T : tempo de vida do estado tripleto (SOARES, 2005).

As metaloporfirinas que contêm íons metálicos com orbitais d semipreenchidos são fosforescentes. Metaloporfirinas de Pd (II), Sn (II) e Zn (II) dos derivados meso substituídos aquossolúveis apresentam tempo de vida longo do estado tripleto e um alto rendimento quântico de formação do estado tripleto, sendo propriedades importantes na aplicação como fotossensibilizadores (SOARES, 2005).

1.5 Agregação

Os agregados podem ser considerados como aglomerados de algumas partículas ou moléculas que se juntam sem ligações químicas é um fator importante, por ser comum entre as moléculas de fotossensibilizadores em meio fisiológico. Um aglomerado é caracterizado por sua estrutura espacial, ou seja, posição relativa de partículas dentro do agregado e pelo número de agregação n , sendo o número de partículas no agregado. O tamanho desses sistemas pode variar de poucos nanômetros a vários micrometros ou mais (HUTENER; SANDERS, 1990).

O mecanismo de formação dos aglomerados baseia-se na ação de forças intermoleculares, como eletrostática, interações π - π , ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e efeito hidrofóbico. Tais interações são relativamente fracas quando comparadas às ligações covalentes (KASHA; RAWLS, 1965).

Agregados homogêneos são constituídos de moléculas (monômeros) do mesmo composto, que se unem formando agregados de diversos graus de agregação (dímeros, trímeros, etc.). A formação de agregados é um processo comum para os compostos com sistema de conjugação π . As interações do sistema π são as que apresentam maior contribuição para a autoagregação das porfirinas e de outros compostos aromáticos (HUTENER; SANDERS, 1990).

A agregação modifica as características dos estados eletrônicos dos fotossensibilizadores, alterando características espectrais e energéticas, o que leva à redução dos rendimentos quânticos e tempo de vida dos estados excitados singlete e tripleto. Esse processo reduz a produção de oxigênio singlete e, conseqüentemente, a atividade fotodinâmica do fotossensibilizador (KASHA; RAWLS, 1965).

A formação de agregados pode alterar o espectro eletrônico, o que pode levar ao alargamento das bandas, redução do ϵ e o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$. A formação de agregados também leva a um decréscimo na fluorescência (FERNANDES, 2007).

As porfirinas hidrofóbicas presentes em meios aquosos podem formar dímeros ou agregados maiores, sendo a hidrofobicidade um fator importante no processo de agregação. A Figura 16 faz uma representação esquemática, em que as ligações π - π são repulsivas para faces paralelas, as ligações σ - π são atrativas para interações laterais e face lateral e a ligação σ - π são predominantemente atrativas para interações com faces paralelas deslocadas (KASHA; RAWLS, 1965).

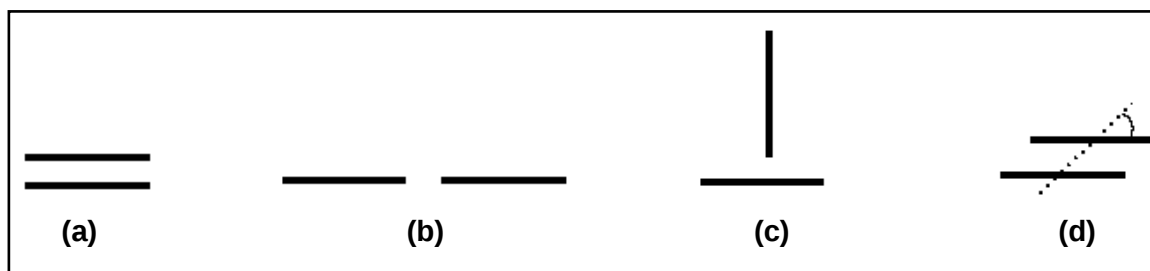


Figura 16 - Representação das formas de agregação (KASHA; RAWLS, 1965).

A formação de agregados é um processo reversível que normalmente está em equilíbrio, o qual é afetado por alguns fatores físicos que podem favorecer a formação do produto de agregação (KASHA; RAWLS, 1965).

A Figura 17 demonstra uma comparação entre energia de transição de um monômero, dímeros lineares e paralelos (FERNANDES, 2007).

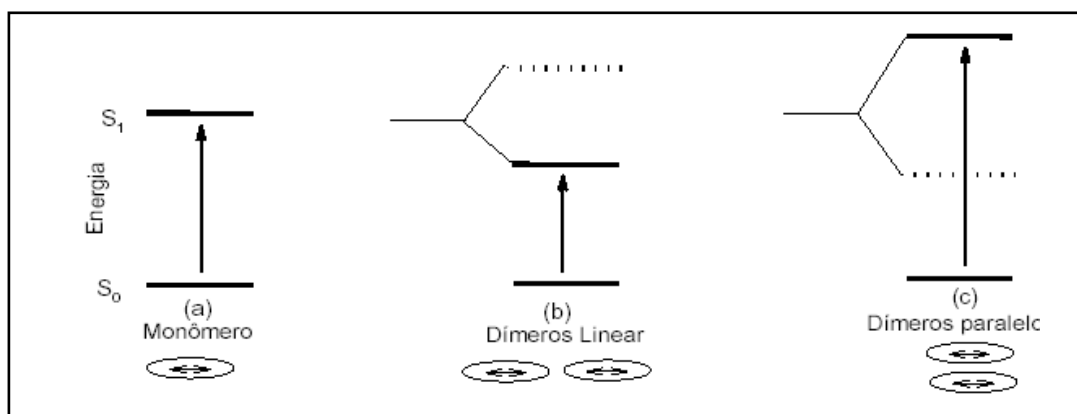


Figura 17 - Excitação Eletrônica para porfirinas monoméricas (a) agregada de forma linear (b) paralela (c) (FERNANDES, 2007).

Para os dímeros lineares ocorre uma diminuição na variação de energia HOMO-LUMO e um aumento para os dímeros paralelos, ocasionando um deslocamento batocrômico no dímero linear e um deslocamento hipsocrômico no dímero paralelo (AGGARWAL; BORISSEVITCH, 2006).

Entre os agregados lineares e paralelos, podem existir duas classes que possuem arranjo altamente ordenado das moléculas que constituem. São conhecidos como agregados J e H. Os agregados J são representados por um arranjo de moléculas dispostas lado a lado e os agregados H estão dispostos face a face. Também é possível serem observados agregados HJ, nos quais o contato face a face não é completo (Figura 18) (AGGARWAL; BORISSEVITCH, 2006).

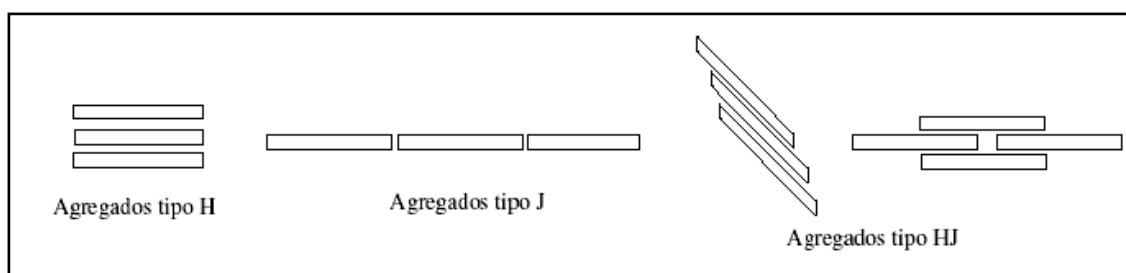


Figura 18 - Geometria de agregados (AGGARWAL; BORISSEVITCH, 2006).

A estabilidade dos agregados depende da área de contato entre os monômeros, nos agregados H, as moléculas possuem uma área de contato maior e, portanto, deveriam ser mais estáveis. Porém vários fatores podem atrapalhar a formação de agregados do tipo H, favorecendo a formação de agregados do Tipo J.

Os agregados Tipo H de porfirinas apresentam propriedades físicas e fotofísicas diferentes das propriedades de seus monômeros de origem, dentre as quais está a solubilidade, espectro eletrônico, rendimento quântico de fluorescência baixo e redução no rendimento de formação de tripletes e de geração de oxigênio singleto. A formação de agregados pode ser visualizada pelo fato de ocorrer em desvios da Lei de Beer-Lambert, alargamento dos picos, diminuição do ϵ , deslocamento do máximo de absorção, espalhamento de luz ressonante. Em agregados do Tipo H, tem-se o deslocamento para o azul e, em agregados do Tipo J têm-se deslocamentos para o vermelho (AGGARWAL; BORISSEVITCH, 2006; FERNANDES, 2007).

1.6 Ensaios *in vitro* da TFD

O elevado custo de medicamentos e de equipamentos impede o aumento da aplicabilidade de tratamento com TFD. Como também grandes restrições econômicas, decorrentes de dificuldades de produção e de custo para o desenvolvimento tecnológico. Um dos maiores avanços da Terapia Fotodinâmica é para o tratamento de câncer, mas também é uma alternativa para tratamento de infecções localizadas de acesso facilitado (ITRI, 2002).

Os testes *in vitro* com culturas de micro-organismos, como bactérias e leveduras, apresentam a possibilidade de ser um modelo para mimetizar células

tumorais. As bactérias são micro-organismos que apresentam alta resistência e velocidade de reprodução, relacionando e identificando-se com células doentes, que apresentam maior reprodução do que células normais. Quando determinadas substâncias apresentam atividade frente a esses micro-organismos, elas interferem na síntese protéica, inviabilizando a reprodução celular, processo que poderia ser repetido com células tumorais (ITRI, 2002; PERUSSI, 2007).

Como exemplo de ensaios com micro-organismos, a bactéria *Escherichia coli*, desenvolve-se em ambientes internos ao corpo humano, sendo um modelo para enfermidades em órgãos internos, ao passo que *Staphylococcus aureus*, desenvolve-se bem em superfícies corpóreas, sendo um modelo para doenças na pele (MACRAE; HUDSON, 1988).

O uso indiscriminado de antibióticos pode favorecer o desenvolvimento de bactérias resistentes, e o tratamento prolongado ou inadequado com medicamentos pode levar a uma superinfecção, que resulta na alteração da microbiota residente e ao aumento de patógenos potencialmente prejudiciais (VAN WINKELHOF, RAMS; SLOTS, 1996). O desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica tem possibilitado uma modalidade de tratamento para a redução ou eliminação de micro-organismos, podendo substituir o tratamento com antibióticos (WILSON; DOBSON; SARKAR, 1993).

Staphylococcus aureus, Gram (+) é o agente mais comum de infecções no homem, causando grande variedade de infecções como furúnculos, síndrome da pele queimada, pneumonia, osteomielite, meningite, endocardite, amigdalite, intoxicações alimentares, púlpites e estomatites (WAINWRIGHT, 1998).

A *Escherichia coli*, Gram (-) é uma bactéria que, juntamente com o *Staphylococcus aureus* é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiotes do homem, existem na microbiota normal no intestino em grandes números (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). A *Escherichia coli* causa doenças como gastroenterites, infecções do trato urinário, colecistite, apendicite, peritonite e meningite (VAN WINKELHOF, RAMS; SLOTS, 1996).

A espécie de levedura *Candida albicans* também é causadora de alguns tipos de infecção em humanos. As infecções causadas por esses fungos emergiram como uma das principais causas de morte em pacientes com algum tipo de imunodeficiência (WILSON; DOBSON; SARKAR, 1993). Essa espécie de levedura está entre os muitos organismos encontrados na região bucal e no sistema

digestivo. Sob circunstâncias normais, a *Candida albicans* pode ser encontrada em 80% da população sem que isso implique efeitos prejudiciais à sua saúde, embora o excesso resulte em candidíase (UENO; JORGE, 2006).

A Terapia Fotodinâmica apresenta diversos fatores a favor do tratamento de infecções causadas por micro-organismos patogênicos, incluindo uma ampla faixa de ação (VAN WINKELHOF, RAMS; SLOTS, 1996).

A inativação fotodinâmica de bactérias e fungos depende de alguns fatores como a concentração do fotossensibilizador, a espécie do micro-organismo, fontes de luz e tempo de irradiação. Vários estudos têm usado derivados porfirínicos como fotossensibilizadores para fotoinativação de bactérias (UENO; JORGE, 2006; MACRAE; HUDSON, 1988).

Outro teste utilizado para a TFD é o bioensaio com o microcrustáceo *Artemia Salina*, trata-se de um bioensaio simples e de baixo custo. Analisando a relação da toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades biológicas, entre as quais se destacam a antiviral e antitumoral (MACRAE; HUDSON, 1988).

O microcrustáceo *Artemia salina* é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, utilizado como um bioindicador de toxicidade, sendo utilizado em estudos de citotoxicidade por apresentar capacidade em formar cistos dormentes que fornecem material biológico que pode ficar armazenado por longo período (LIMA, 2009).

1.7 Metaloporfirina $\text{Na}_4[\text{ZnTPPS}_4]$

A ligação de porfirinas e metaloporfirinas em modelos biomiméticos, como micelas de surfactantes, tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, devido à sua presença em processos biológicos e fotoquímicos, como o transporte de oxigênio, oxidação, redução e transporte de elétrons (GANDINI, 2001).

A $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$, 5, 10, 15, 20 - tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinato zinco(II) de sódio, classifica-se como um fotossensibilizador com caráter aniônico. Apresentam em sua estrutura quatro grupos sulfonatofenil que estão ligados ao anel porfirínico, no centro, tem-se um átomo de zinco coordenado aos nitrogênios dos anéis pirrólicos (Figura 19) (GANDINI, 2005).

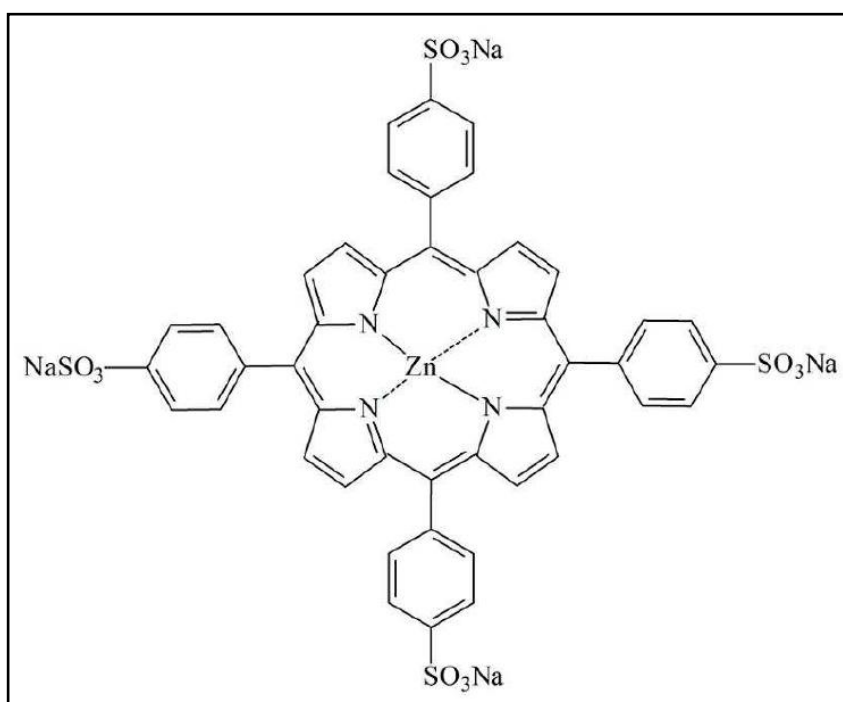


Figura 19 – Estrutura da 5,10,15,20 - tetrakis (4-sulfonatofenil)porfirinato de zinco(II) de sódio – $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$.

Gandini realizou estudos com a $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$ na presença de micelas do surfactante HPS, devido à sua carga negativa interagir com o dipolo do surfactante, o que conduz a um aumento significativo do valor da constante de ligação entre a micela e a porfirina, quando se compara com porfirinas catiônicas em presença do mesmo surfactante (GANDINI, 2005).

Kadish com seus colaboradores estudaram as porfirinas aniônicas TPPS_4 , CuTPPS_4 e $[\text{ZnTPPS}_4]$ em soluções contendo micelas do surfactante HPS (catiônica) e SDS (aniônica), tendo como objetivo o uso da porfirina em TFD, já que a TPPS_4 é conhecida por ter a capacidade de localizar-se em tumores. Kadish, ao analisar a porfirina, constatou mudanças nas suas propriedades espectrais das mesmas, com deslocamento da banda Soret para a região do vermelho e na presença de CTAB, o comprimento de onda máximo da banda Soret que se encontrava em 422 nm em presença de água, variou para 427 nm na presença dos surfactantes. Com este estudo, constatou-se que a adição de surfactante CTAB promove a degradação da porfirina devido a uma proteção que a micela do detergente provoca às moléculas da porfirina e o surfactante SDS não apresentou interação com a porfirina (KADISH et al., 1989).

Devido à ocorrência de mudanças espectroscópicas com a porfirina ZnTPPS₄ por apresentar caráter aniônico, pode-se analisar que a porfirina é afetada pela presença de surfactantes, ocorrendo interação entre essas espécies, concluindo-se que as metaloporfirinas carregadas podem interagir com membranas celulares (KADISH et al., 1989).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo das propriedades fotofísicas e fotoquímicas, analisar a toxicidade da porfirina 5,10,15,20 - Tetrakis(2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirina de sódio, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e do complexo 5,10,15,20 - Tetrakis(2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirinato zinco(II) de sódio, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ investigando a possibilidade de desenvolvimento de um novo sistema para aplicação em Terapia Fotodinâmica.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) dos compostos em diferentes solventes.

Analisar as propriedades fotofísicas e fotoquímicas, através das reações de fotobranqueamento e do teste de ácido úrico.

Verificar a capacidade de agregação dos compostos em meio de água/etanol.

Determinar a toxicidade dos compostos através de ensaios biológicos *in vitro* frente à cultura de micro-organismos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

Para realização do estudo foram utilizados a porfirina 5,10,15,20 - Tetrakis(2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirina de sódio, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e o complexo 5,10,15,20 – Tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirinato zinco(II) de sódio, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (Figura 20). Ambos os compostos foram sintetizados e cedidos para o desenvolvimento deste trabalho pelo grupo de pesquisa da Professora Shirley Nakagaki da Universidade Federal do Paraná.

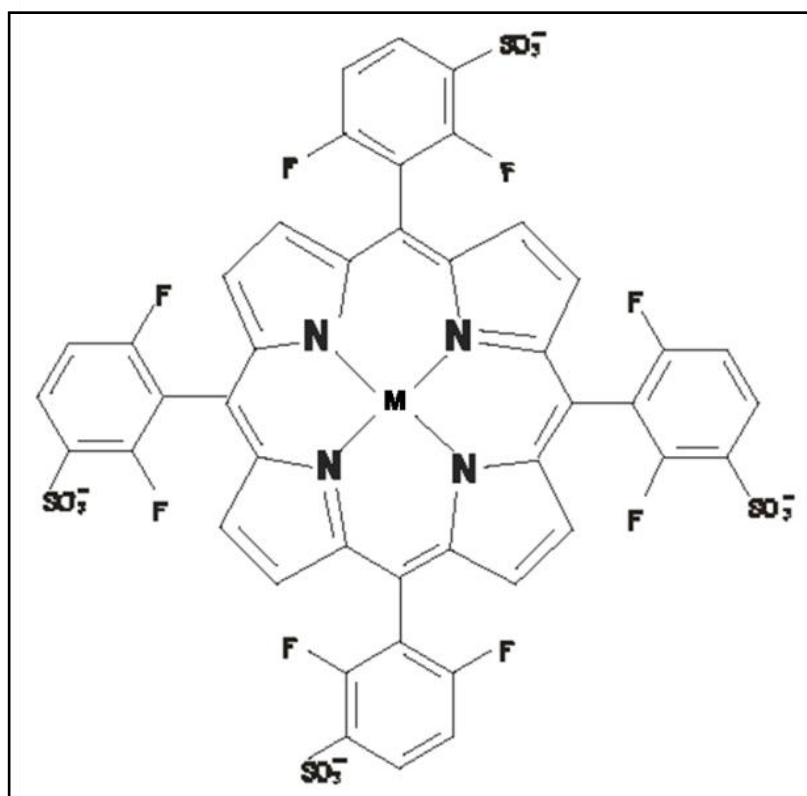


Figura 20 - Estrutura dos compostos $\text{Na}_4[\text{M}(\text{TDFSP})]$, sendo $\text{M} = \text{H}_2, \text{Zn}(\text{II})$

A água utilizada para o preparo das soluções foi destilada e deionizada. O etanol utilizado é de qualidade PA da Vetec. As soluções de porfirinas foram

preparadas na faixa de concentração 10^{-6} mol.L⁻¹, de modo que a absorbância fique próximo a 1,0 na banda Soret. As medidas necessárias de absorção ótica foram realizadas no espectrofotômetro Cary 100 Varian (Figura 21) e de fluorescência no fluorímetro Cary Eclipse Varian (Figura 22). Utilizou-se célula de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm.



Figura 21 - Espectrofotômetro Cary 100 Varian, utilizado para análise de absorção no UV-Vís.



Figura 22 - Fluorímetro Cary Eclipse Varian utilizado para análise de fluorescência.

Foram utilizados sistemas de LED (diodo emissor de luz) em série, cada um com potência equivalente a 5 mW nas cores alaranjado, verde e vermelho (Figura 23), sistema proposto pelo grupo de pesquisa do Prof.Dr. N. Hioka da Universidade Estadual de Maringá (SOARES, 2006).

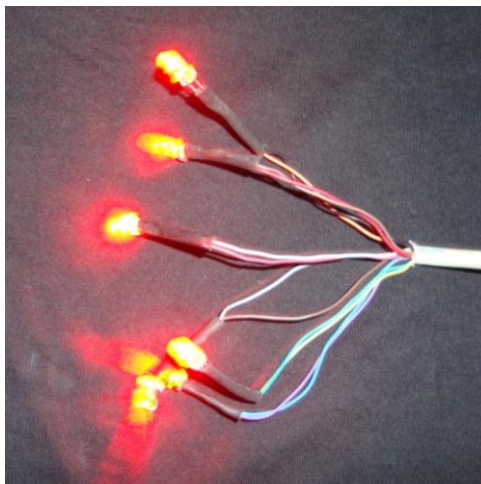


Figura 23 – Sistema de LED (diodo emissor de luz)

Para os testes realizados com micro-organismos também foram utilizados um vórtex Quimis e um colorímetro fotoelétrico Micronal. Utilizaram-se uma estativa e uma câmera digital Sony Cybershot DSC 707, com resolução de 7.2 megapixels, para fotografar as placas de Petri, durante a realização dos testes.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação do coeficiente de absortividade molar (ϵ) dos compostos em água e etanol

Para determinação do ϵ dos compostos prepararam-se soluções dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ nas concentrações de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; $0,5 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $0,1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em água e em etanol.

Obteve-se o espectro de absorção na faixa de 300 nm a 700 nm, para cada solução. Determinou-se o coeficiente de absortividade molar dos compostos para cada solvente, através do tratamento dos valores de absorbância em função da concentração.

3.2.2 Análise da capacidade de agregação em sistema água/etanol através da absorção e fluorescência

Para a análise da capacidade de agregação, foi utilizado o sistema água/etanol através da adição de volumes predeterminados dos solventes, no qual a composição foi expressa na forma de porcentagem de volume de água.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas com a introdução de volumes de solução dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ com três concentrações diferentes em uma célula de quartzo com caminho óptico de 1,00 cm.

O registro do espectro de absorção foi realizado na faixa de 300 a 700 nm para cada mistura e para fluorescência na faixa de 500 a 750 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$), variando-se a porcentagem de água em 0; 20; 30; 40; 50; 60; 80 e 100%.

3.2.3 Reações de fotobranqueamento

Através de soluções aquosas dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ na concentração de $5 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$ estudou-se a existência de reações de decomposição dos compostos em presença de luz. Iluminou-se os compostos com a utilização de sistemas de LED alaranjado, verde e vermelho, registrando-se os espectros de absorção das amostras por um período total de 60 min de exposição à luz na faixa de 300 a 700 nm, monitorando-se o comportamento dos espectros de cada composto de 5 em 5 min.

Para iluminação das soluções, utilizou-se sistema de LED descrito anteriormente (Figura 23) de acordo com a montagem apresentada na Figura 24.

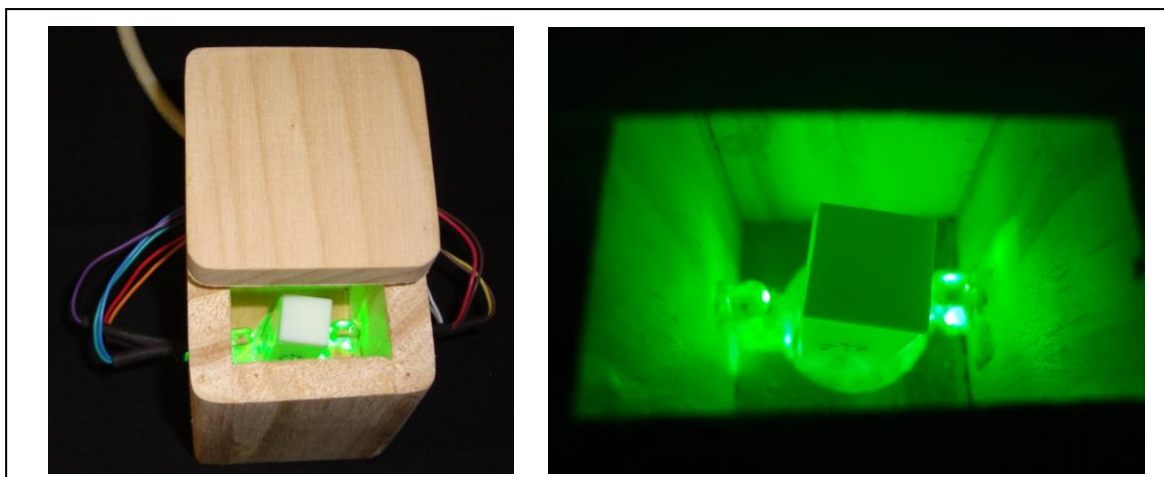


Figura 24 – Sistema de iluminação das soluções utilizado nos testes de fotobranqueamento.

3.2.4 Avaliação da atividade fotodinâmica através do teste do ácido úrico

O teste foi utilizado para verificar a atividade fotodinâmica dos compostos estudados avaliando-se a geração de oxigênio singlete através da reação química do mesmo com o ácido úrico.

Foi preparada uma solução aquosa de ácido úrico na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ e em uma alíquota de 3 mL foi acrescentado 0,3 mL de solução dos compostos, de forma que a concentração das soluções fiquem na ordem de $1,0 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹.

A solução foi transferida para uma célula de quartzo, sendo realizada uma leitura espectroscópica na faixa de 200 a 800 nm. Posteriormente, utilizaram-se os sistemas de iluminação com LED alaranjado, verde e vermelho, sendo registrado um novo espectro a cada cinco minutos de iluminação por um período total de 60 minutos.

Com base no teste do ácido úrico e através dos espectros de absorção obtidos, foi possível avaliar a atividade fotodinâmica das substâncias testadas. A atividade fotodinâmica pode ser calculada através da equação 01, descrita por Hioka e colaboradores com adaptações para sistemas com LED (SOARES, 2006):

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

Equação 01

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;

$AP_{s,irr}$: valor de absorbância do fotossensibilizador em solução de ácido úrico no comprimento de onda da irradiação.

3.2.5 Ensaio biológico *in vitro*

3.2.5.1 Toxicidade frente à *Artemia salina* (TAS)

Para realização deste ensaio, colocaram-se ovos de *Artemia salina* Maramar[®] para eclodir em solução aquosa de NaCl (3,8 g.L⁻¹) no interior de um recipiente, o qual possui uma divisão interna contendo pequenos orifícios entre dois compartimentos (Figura 25). Um compartimento é iluminado com uma lâmpada fria de 14 W para atrair os microcrustáceos eclodidos e o outro compartimento protegido da luz, no qual os ovos são adicionados (SOARES, 2006).

Foram realizados testes para verificar a toxicidade basal das porfirinas, sendo coletados 20 microcrustáceos e distribuídos em tubos de ensaio com soluções dos compostos em diferentes concentrações sem a presença de iluminação. Após 24 horas, analisou-se a percentagem de letalidade dos microcrustáceos.

Após 48 horas, foram coletados 20 microcrustáceos e distribuídos em tubos de ensaio. As amostras foram divididas em quatro grupos, sendo um sem a presença de luz e sem presença de composto (L-P-) um sem a presença de luz e com a presença de composto (L-P+) um com a presença de luz e com a presença de composto (L+P+) e um com a presença de luz e sem a presença de composto. Os sistemas submetidos à iluminação com LED (alaranjado, verde e vermelho)

permaneceram por um período de uma hora com iluminação e após duas horas do término da iluminação, foi realizada a contagem dos microcrustáceos vivos nos tubos de ensaio.

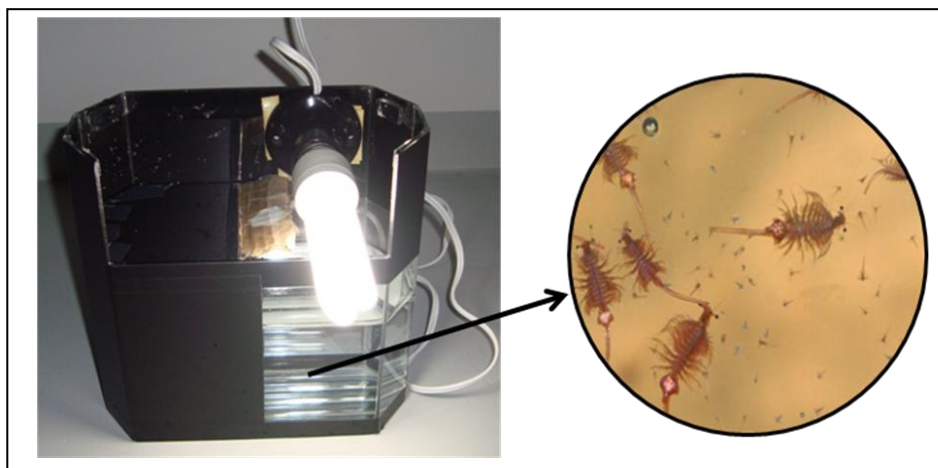


Figura 25 – Recipiente utilizado para eclosão de *Artemia Salina* nos testes de TAS

3.2.5.2 Ensaio biológico com culturas de micro-organismos *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Para realização deste teste foram utilizados os micro-organismos *Candida albicans* (ATCC 10.231), *Escherichia coli* (ATCC 25.923) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25.922).

Foram preparadas suspensões utilizando-se solução salina 0,9 % de NaCl com os micro-organismos, acompanhando a absorbância em um colorímetro Micronal a 580 nm, até que atinjam a absorbância próximo a 0,8, o que corresponde a cerca de 10^8 micro-organismos/mL. A partir dessa suspensão, foi transferida uma alíquota de 10 μ L para tubos de ensaio contendo meio nutritivo Trypticase Soy Agar (TSA) e solução dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$.

Os tubos de ensaio foram separados em dois grupos, sendo um submetido à iluminação de LED alaranjado e vermelho. Para cada sistema de LED, foi utilizado tempo de iluminação de 10 e 30 minutos. Foram preparados controles, que foram subdivididos em três grupos: iluminados e sem composto (L+P-); sem iluminação e

com a presença de composto (L-P+); sem iluminação e sem a presença de composto (L-P-).

Após iluminação, foi realizada homogeneização das soluções em vortéx Quimis, posteriormente foi coletado 5 µL de cada tubo de ensaio e distribuído em placas de Petri (8,3 cm de diâmetro) contendo Agar TSA, que foram incubadas por um período de 24 horas em estufa a 37 °C.

Para realização dos testes foram preparados dois tubos de cada amostra e duas placas de Petri para cada tubo de ensaio. Os testes foram repetidos três vezes.

Após o tempo de incubação, as placas foram fotografadas com uma câmera digital Sony Cybershot DSC 707 e resolução de 7,2 megapixels, para realizar a contagem das colônias de micro-organismos através do programa analisador Image-Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do Coeficiente de Absortividade Molar (ϵ) dos Compostos em Água e Etanol

A medida de quanto uma espécie química absorve luz em um comprimento de onda é dado pelo coeficiente de absortividade molar (ϵ), sendo uma propriedade intrínseca das espécies e está relacionado com as regras de seleção para transições eletrônicas, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Intensidades das transições eletrônicas e as regras de seleção (BARROW, 1962).

$\epsilon/\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	Regra de Seleção	Tipo de Transição
10^{-5} -100	Proibida pela regra de Laporte	d-d
1 - 10^3	Permitida por spin e orbitalmente proibida	Transferência de carga
10^3 - 10^5	Permitida pelas regras de seleção	π - π^*

A lei de Lambert-Beer relaciona o coeficiente de absortividade molar de uma substância, o caminho óptico (b) e a concentração (c), como:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b$$

Equação 02

Onde:

A = absorbância (sem unidades).

ϵ = absortividade molar em unidades de $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

b = comprimento do caminho óptico da amostra.

c = concentração do composto que absorve, na solução, expressando em mol L^{-1} .

A caracterização das porfirinas é realizada por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vís, pois essas apresentam fortes absorções que se estendem da região do ultravioleta próximo até a região da luz visível. Os espectros característicos da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ são apresentados nas Figuras 26 e 27.

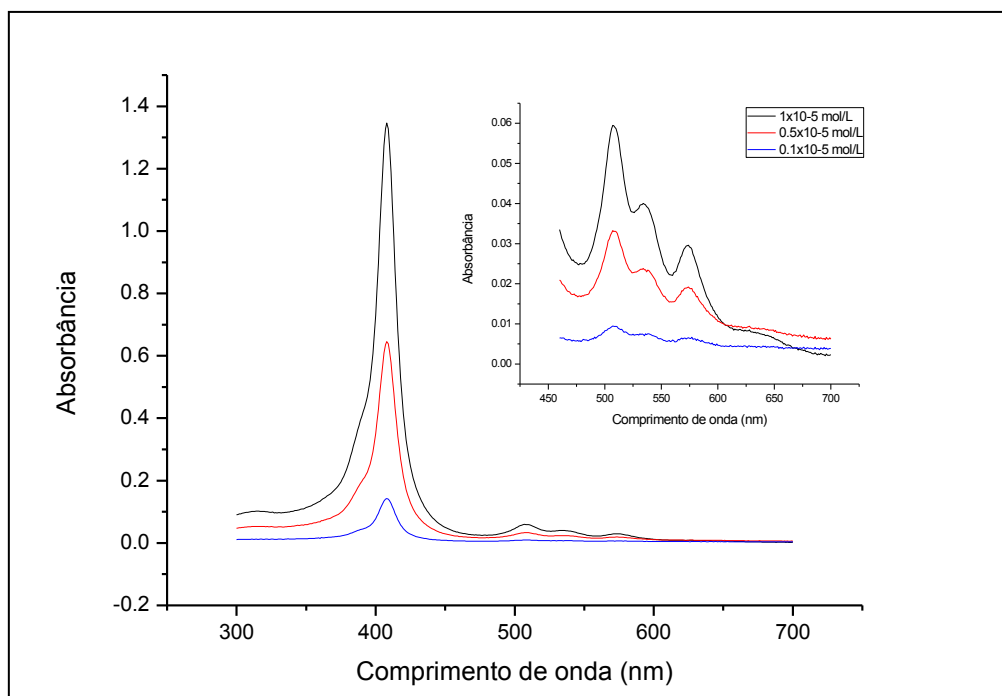


Figura 26 – Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ em água e espectros expandidos da faixa das bandas Q em diferentes concentrações.

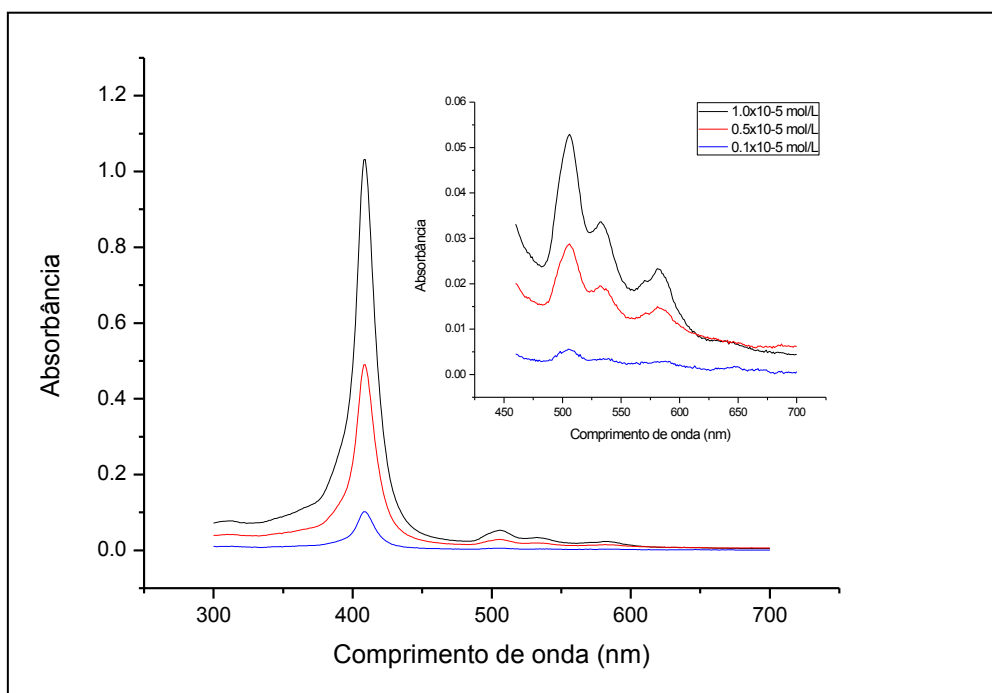


Figura 27 – Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em etanol e espectros expandidos da faixa das bandas Q em diferentes concentrações.

A porfirina base livre $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ apresenta cinco bandas características, sendo que a mais intensa recebe a denominação de banda B ou banda Soret. Observou-se uma banda intensa em 408 nm, banda Soret, nos dois solventes de água e etanol, verificando que o solvente não influenciou na posição do máximo de absorção dessa porfirina. Outras quatro bandas são observadas e são chamadas de bandas Q, as quais possuem comprimentos de onda diferentes para cada solvente. As cinco bandas são observadas devido às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel porfirínico. Em água, os comprimentos de onda máximos das bandas Q são de 507 nm, 534 nm e 574 nm e, em etanol, são de 506 nm, 532 nm e 581 nm.

Para a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, as bandas observadas nos espectros na faixa de 300 a 700 nm são quatro, sendo a banda Soret e três bandas Q (Figuras 28 e 29). Essa redução no número de bandas Q em relação à porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ é resultante do aumento da simetria de D_{2h} para D_{4h} devido à presença do metal Zn coordenado com os átomos de nitrogênio do centro do anel da porfirina.

Quando o metal é coordenado ao anel porfirínico, ocorre interação dos orbitais do metal e os orbitais do nitrogênio da porfirimina e os elétrons dos orbitais π preenchidos podem ser transferidos para os orbitais d do metal. Com a deslocalização das ligações π , ocorre o deslocamento da banda Soret (KAIM; SCHWEDERSKI, 1994).

Os espectros característicos da $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ são apresentados nas Figuras 28 e 29. A $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ apresenta a banda Soret em 416 nm em água e de 420 nm em etanol, logo observou-se que o solvente influenciou na posição do máximo de absorção desses compostos. As bandas Q são observadas em 509 nm, 550 nm e 588 nm para solvente de água e para o etanol são respectivamente de 511 nm, 553 nm e 581 nm.

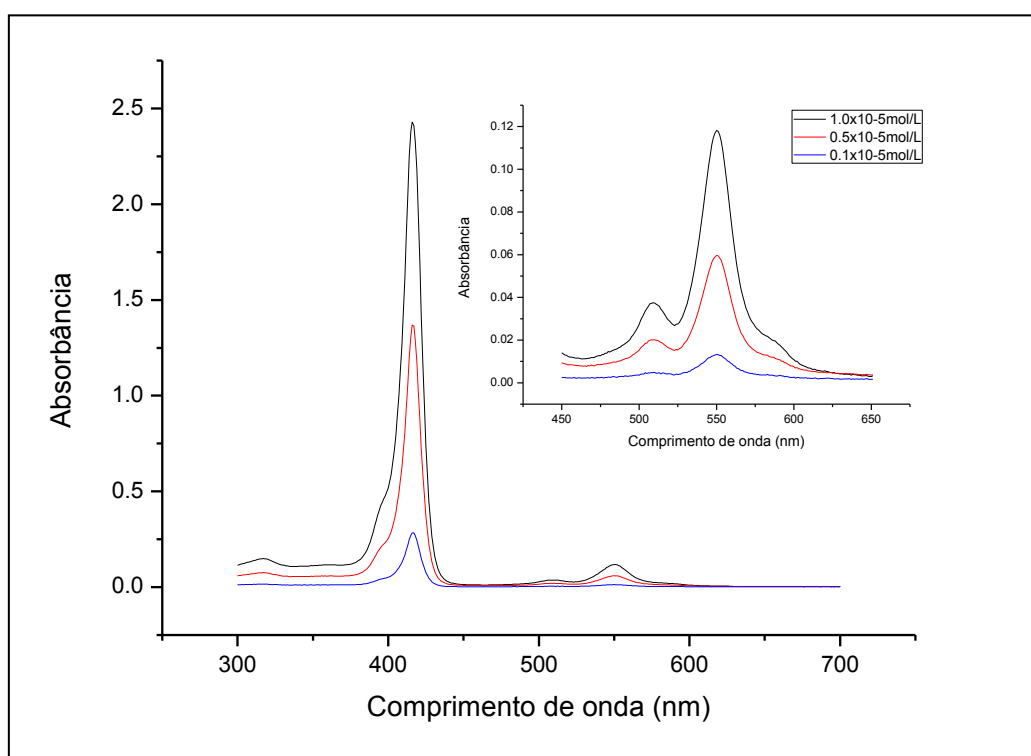


Figura 28 – Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ em água e espectros expandidos da faixa das bandas Q.

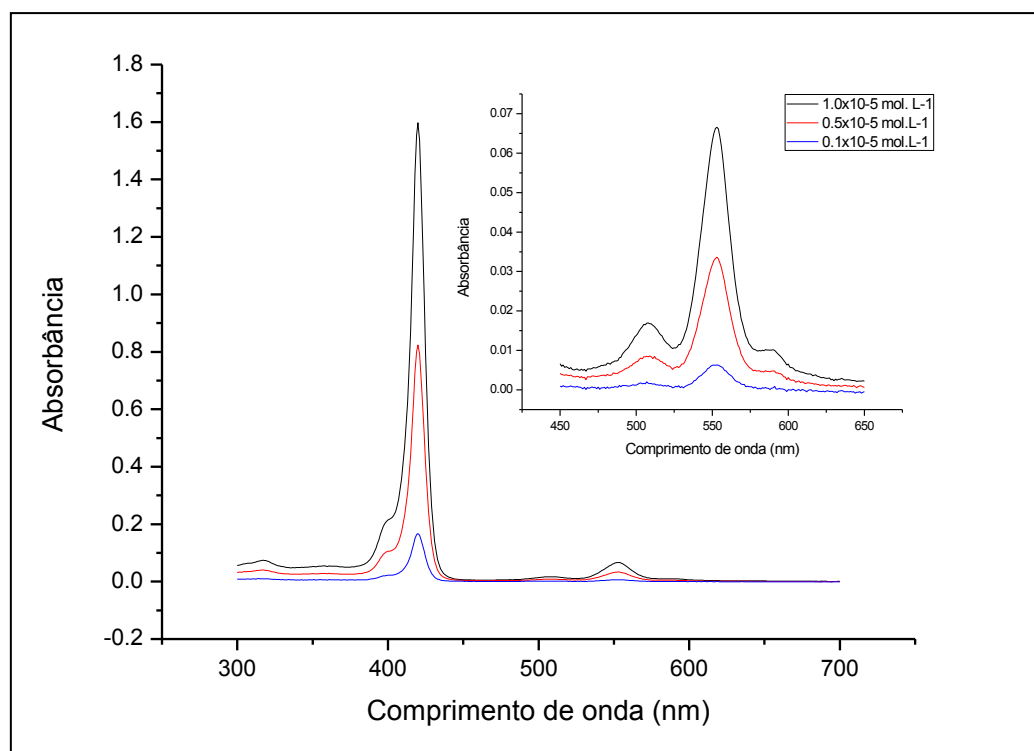


Figura 29 – Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em etanol e espectros expandidos da faixa das bandas Q.

O solvente influenciou na posição do máximo da banda de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, ocorrendo solvatocromismo devido à ocorrência do deslocamento da absorção para uma frequência (energia) mais baixa, ou seja, menor comprimento de onda devido ao aumento da polaridade do solvente (água) em relação ao etanol.

Os valores de absortividade molar (ϵ) das porfirinas foram determinados através da curva de absorbância *versus* concentração. Com a curva de calibração é possível obter o coeficiente de absortividade molar de cada porfirina, através da relação entre a absorbância e concentração. Os valores de (ϵ) estão resumidos na Tabela 3 para os diferentes solventes e para cada comprimento de onda.

Tabela 3 – Valores de comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) e coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para as bandas de absorção dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$.

Composto	Soret	ϵ	Banda Q I	ϵ	Banda Q II	ϵ	Banda Q III	ϵ
Água								
$[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$	408	$1,34 \times 10^5$	507	$5,54 \times 10^3$	534	$3,61 \times 10^3$	574	$2,54 \times 10^3$
$[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$	416	$2,38 \times 10^5$	509	$3,60 \times 10^3$	550	$1,17 \times 10^4$	588	$1,81 \times 10^3$
Etanol								
$[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$	408	$1,04 \times 10^5$	506	$5,19 \times 10^3$	532	$3,31 \times 10^3$	581	$2,22 \times 10^3$
$[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$	420	$1,57 \times 10^5$	511	$1,55 \times 10^3$	553	$3,33 \times 10^3$	581	$1,02 \times 10^3$

Unidade: ϵ ($\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Com os dados obtidos foi possível verificar que o solvente não influenciou somente os máximos de absorção dos compostos, como também os coeficientes de absorvidade molar (ϵ), isso pode ser atribuído a diferença de polaridade dos solventes e à coordenação do metal zinco aos solventes, mas a explicação mais precisa nesse caso é que isso pode indicar a presença de agregação em pequena proporção para ambos os compostos.

Na presença do solvente água, a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ pode apresentar tendência a se agregar quando comparada a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$. Devido a isso, o valor de absorvidade molar é reduzido em todas as bandas observadas. Em etanol, o efeito de agregação não é pronunciado, e a diferença no coeficiente de absorvidade molar ocorre devido à diferença dos sistemas químicos analisados.

Considerando-se a banda Soret, observou-se que a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ apresenta valor de ϵ maior que a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, o que pode indicar também que o composto apresenta maior absorção de luz em

diferentes concentrações e considera-se que baixas concentrações de substâncias com absorvidade molar elevada podem ser facilmente detectadas.

4.2 – Análise da Capacidade de Agregação no UV – Visível e por Fluorescência

A formação de agregados modifica as características dos estados eletrônicos das porfirinas, o que altera características espectrais e energéticas, ocasionando a redução dos rendimentos quânticos e tempo de vida dos estados excitados singlete e triplete. Esse processo reduz a produção de oxigênio singlete e, conseqüentemente, a atividade fotodinâmica dos compostos (KASHA; RAWLS, 1965).

O mecanismo de formação dos agregados baseia-se na ação de forças intermoleculares, como eletrostática, interações π - π , ligações de hidrogênio, forças de van der Waals e efeito hidrofóbico. Tais interações são relativamente fracas, quando comparadas as ligações covalentes (KASHA; RAWLS, 1965).

Os resultados dos experimentos em diferentes misturas água/etanol para avaliar a capacidade de agregação dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ são apresentados nas Figuras 30 e 31, respectivamente.

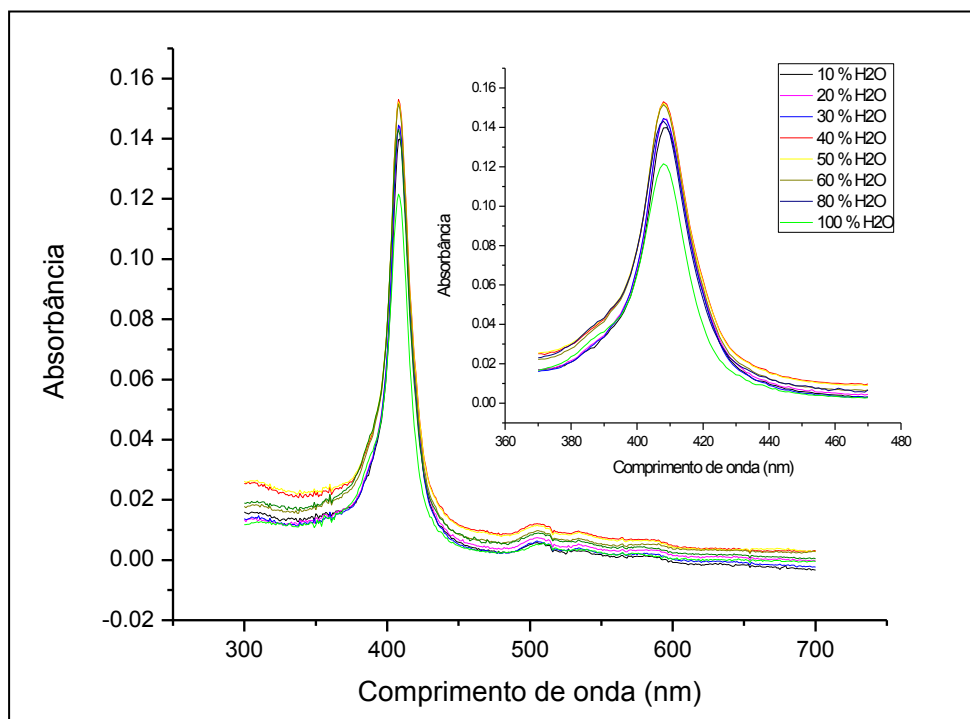


Figura 30 – Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ em diferentes misturas de água e etanol.

Para a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ na Figura 30, foi possível observar que ocorreram mudanças na intensidade da absorbância das bandas de absorção, mas não ocorreu deslocamento no $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos. Não ocorreu a formação de um novo pico o que, em geral, caracteriza a presença de nova espécie e indica a formação de agregados. O menor pico corresponde à condição de 100% de água e o pico maior corresponde à mistura com teor de etanol na faixa de 60% de etanol.

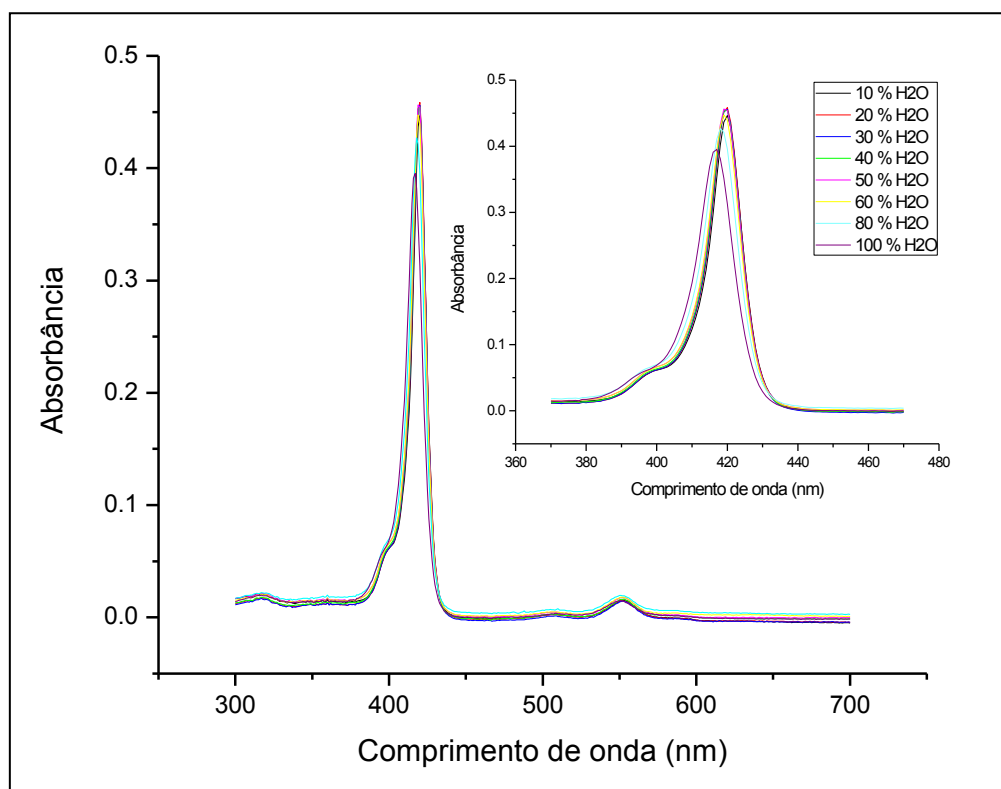


Figura 31 – Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em diferentes misturas de água e etanol.

A zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, apresentou mudanças nas intensidades das bandas de absorção, e também ocorreu deslocamento no $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos (Figura 31). As condições que apresentam maior teor de etanol presente apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ maiores como é o caso do espectro com 90% de etanol, o qual apresenta o maior $\lambda_{\text{máx}}$, esse fenômeno pode ser atribuído ao comportamento das porfirinas em cada solvente, como apresentado na determinação do coeficiente de absortividade molar, onde constatou-se um $\lambda_{\text{máx}}$ de 416 nm em água e 420 nm em etanol (Tabela 3). No caso da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, esse deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ não foi observado.

A princípio, a presença de novos picos seria o principal indicador da presença de uma nova espécie decorrente da agregação, mas ambas as porfirinas não apresentaram a presença de novos picos. Porém a ausência de novos picos não indica necessariamente que não ocorreu o fenômeno de agregação, sendo que a presença ou ausência de novos picos é explicada pela teoria do Exciton Molecular,

através da orientação relativa dos momentos dipolares de transição individual de cada monômero quando compõem o agregado.

Utilizou-se a técnica de fluorescência molecular para ambas as porfirinas, por se tratar de uma técnica mais sensível à presença de agregados.

Através da técnica de fluorescência, analisaram-se ambos os compostos em três concentrações diferentes e nos solventes de água e etanol, obtendo-se os resultados apresentados na Figuras 32 e 33 para $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e nas Figuras 34 e 35 para $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$.

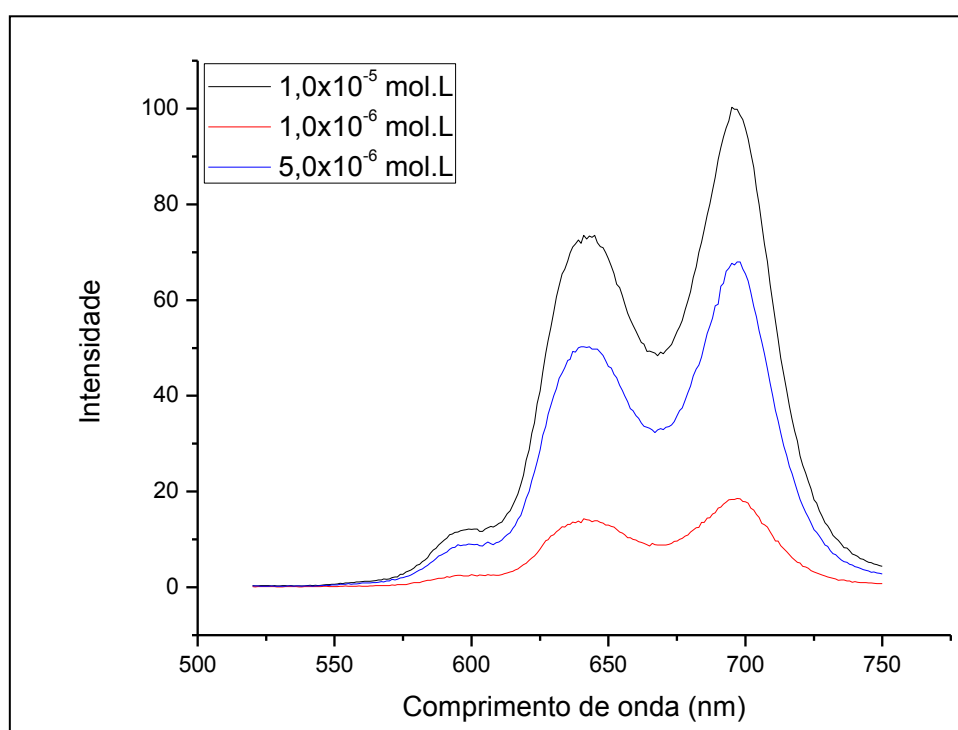


Figura 32 – Espectros de emissão de fluorescência da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ em água com diferentes concentrações e $\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$.

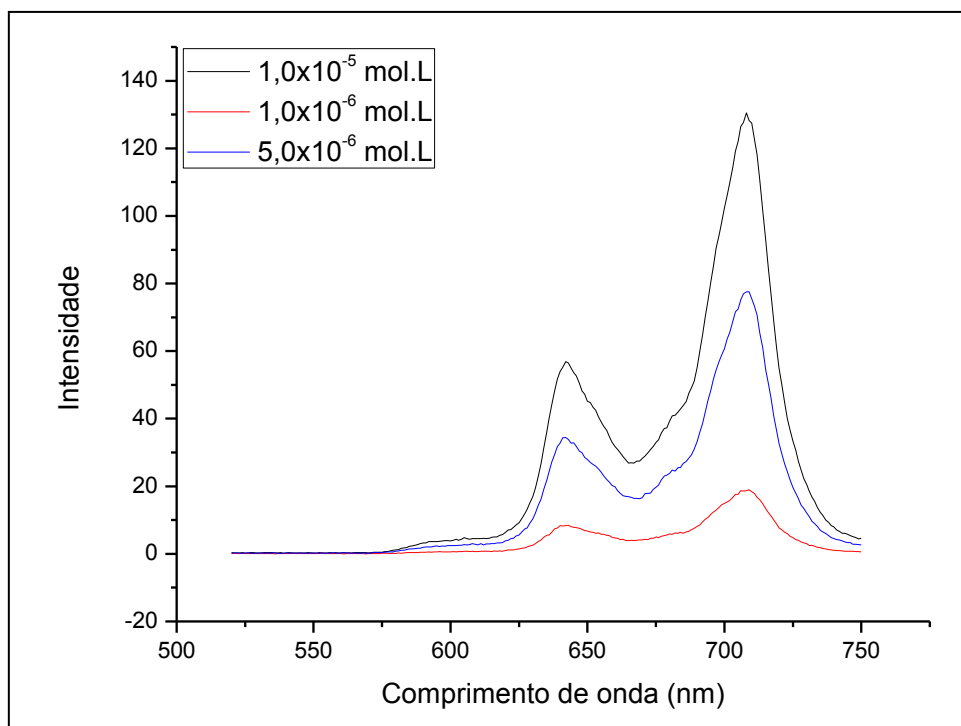


Figura 33 – Espectros de emissão de fluorescência da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em etanol com diferentes concentrações e $\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$.

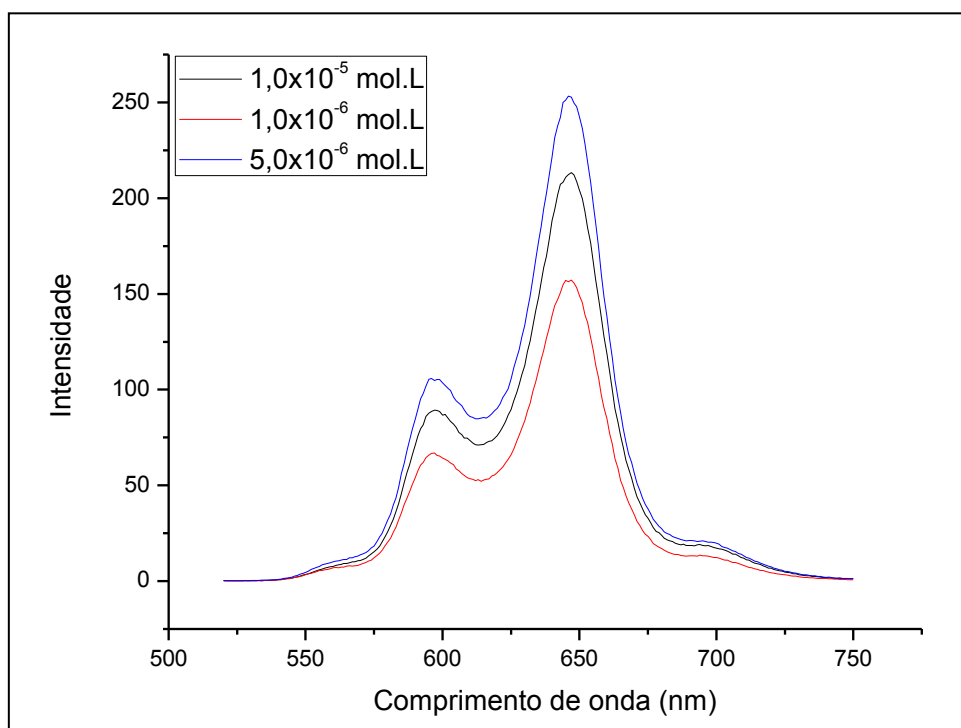


Figura 34 – Espectros de emissão de fluorescência da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em água com diferentes concentrações e $\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$.

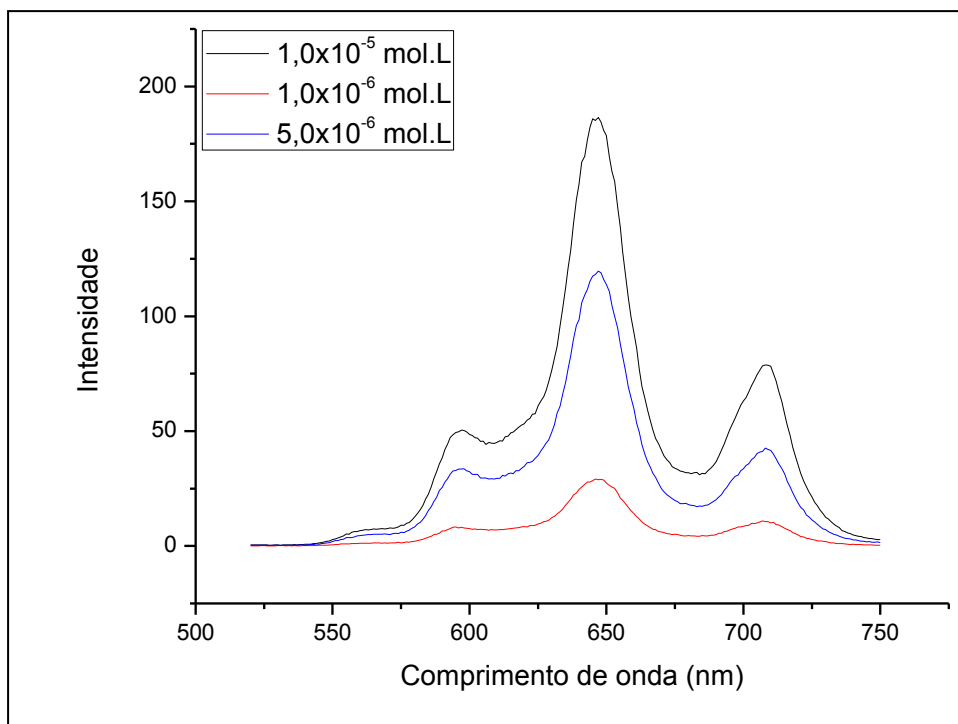


Figura 35 – Espectros de emissão de fluorescência da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ em etanol com diferentes concentrações e $\lambda_{\text{exc}} = 416\text{nm}$.

Analisando-se os espectros de emissão de fluorescência é possível observar que não ocorreu formação de novos picos com o aumento da concentração dos compostos, o que poderia indicar a ocorrência de agregação.

Os resultados dos experimentos em diferentes misturas água/etanol para avaliar a capacidade de agregação dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ através da fluorescência são apresentados nas Figuras 36 e 37, respectivamente.

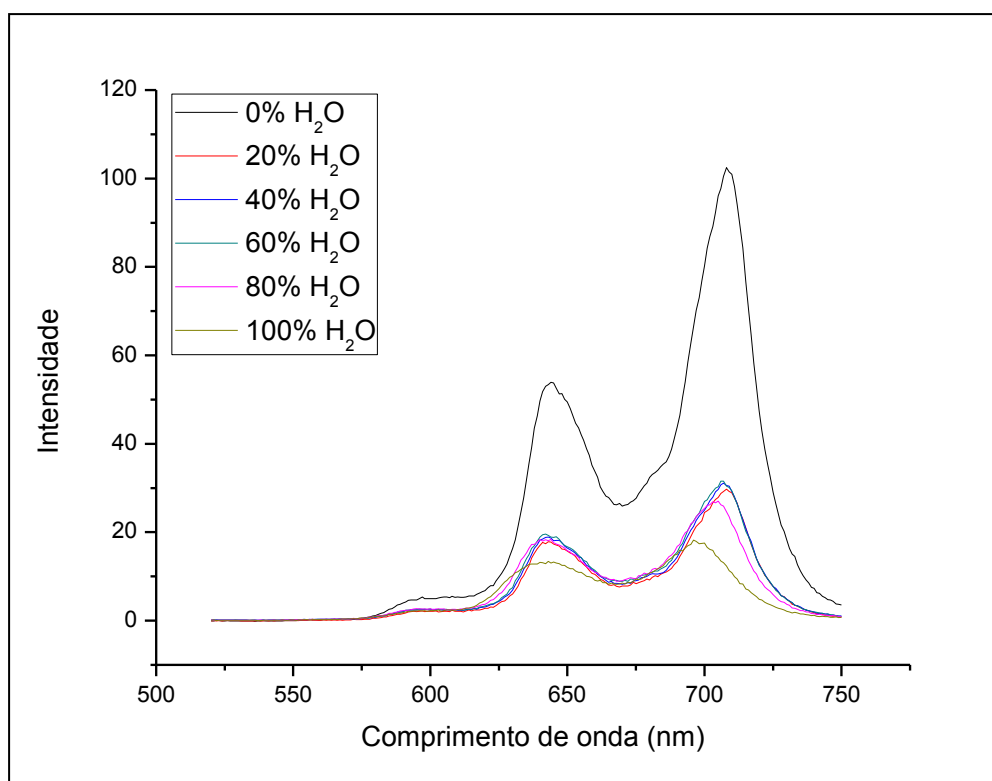


Figura 36 – Espectros de emissão de fluorescência da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ ($10,0 \mu\text{mol/L}$) em diferentes misturas de água e etanol com $\lambda_{\text{exc}} = 416 \text{ nm}$.

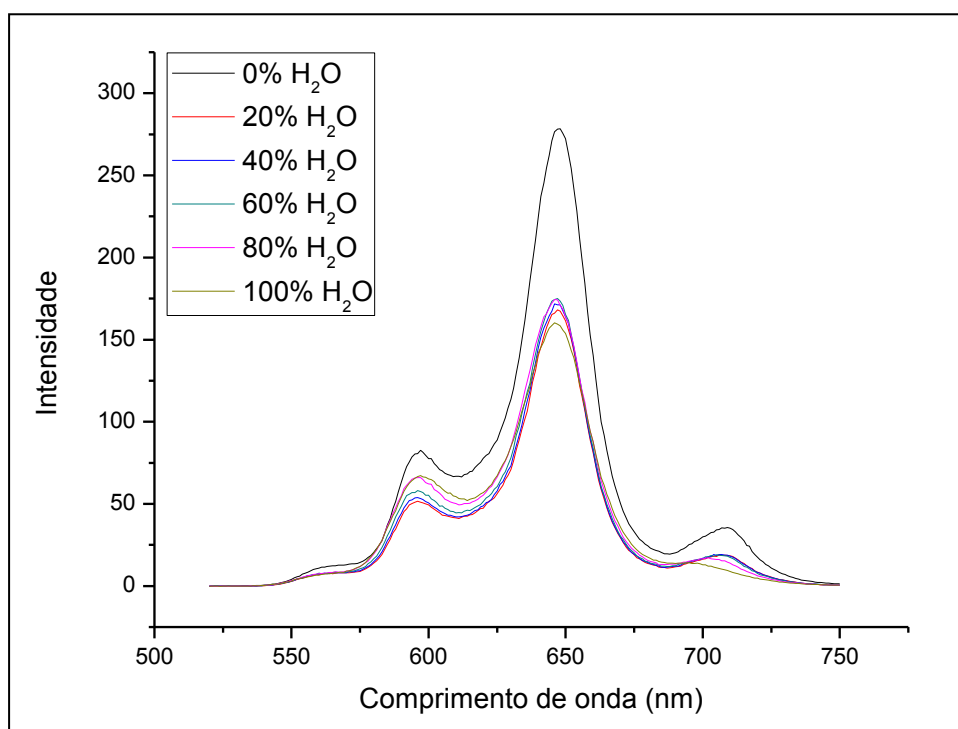


Figura 37 – Espectros de emissão de fluorescência da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ ($10,0 \mu\text{mol/L}$) em diferentes misturas de água e etanol com $\lambda_{\text{exc}} = 416 \text{ nm}$.

De acordo com os espectros de emissão de fluorescência, foi possível verificar que ocorreram variações na intensidade de fluorescência e deslocamentos no $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos para a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ na presença de 80% e 100% de água, mas não é possível afirmar se essa variação esteja relacionada com a formação de agregados. Para a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$, nenhum deslocamento foi observado, portanto, não foi observado presença de agregados para esse composto.

Através das técnicas estudadas de UV-Vísível e emissão de fluorescência, não foi possível concluir se houve ou não formação de agregados para os compostos analisados.

4.3 Reações de Fotobranqueamento

Um dos critérios necessários para que a porfirina seja aplicável como fotossensibilizador em TFD é que deve ser estável na presença de luz não sofrendo reações de fotobranqueamento. A degradação do fotossensibilizador pela luz reduz sua eficiência em aplicações terapêuticas, devido à redução da concentração do fotossensibilizador na região aplicada e redução na absorção de luz do composto degradado.

O oxigênio singlete pode ocasionar a degradação dos fotossensibilizadores, caracterizando-se uma espécie de fotobranqueamento. Quando o fotossensibilizador é irradiado por luz gera oxigênio singlete que pode reagir com as próprias moléculas do substrato que o produziu, ocasionando as reações químicas apresentadas na Figura 38 (SOARES, 2006).

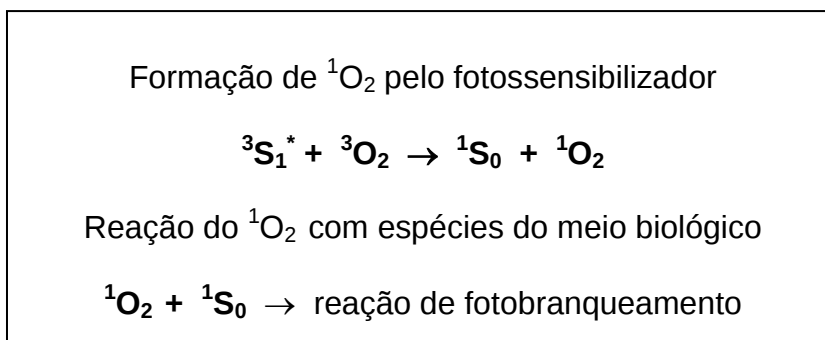


Figura 38 – Reações do oxigênio singlete em meio biológico, reações com moléculas do fotossensibilizador caracterizam uma via de reação de fotobranqueamento.

As faixas de emissão dos sistemas de LED foram analisadas em um monocromador Jarell - Ash 0,5 mm, utilizou-se os sistemas de LED alaranjado que compreende a faixa de emissão de 580 – 605 nm (Figura 39), o sistema de LED verde, que compreende a faixa de emissão de 500 – 560 nm (Figura 40) e o sistema de LED vermelho (Figura 41), que compreende a faixa de emissão de 625 – 650 nm.

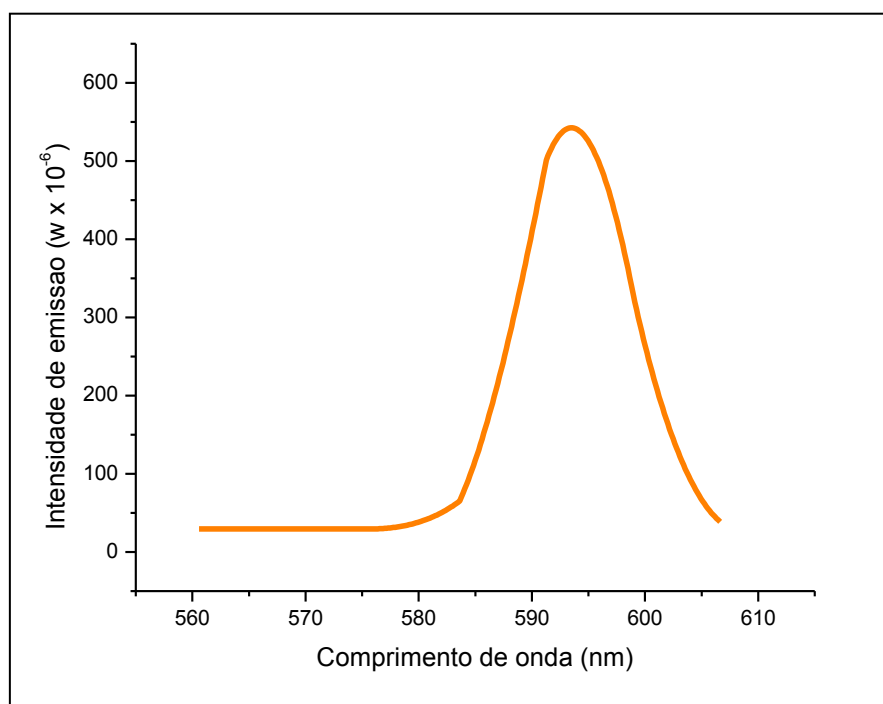


Figura 39 – Espectro de emissão do sistema de LED alaranjado.

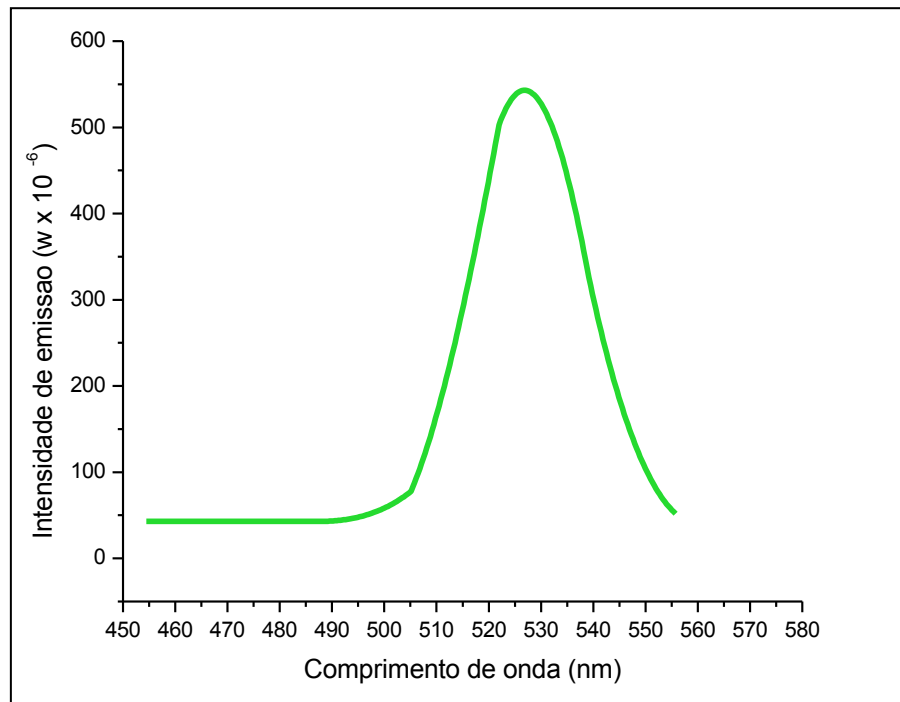


Figura 40 – Espectro de emissão do sistema de LED verde.

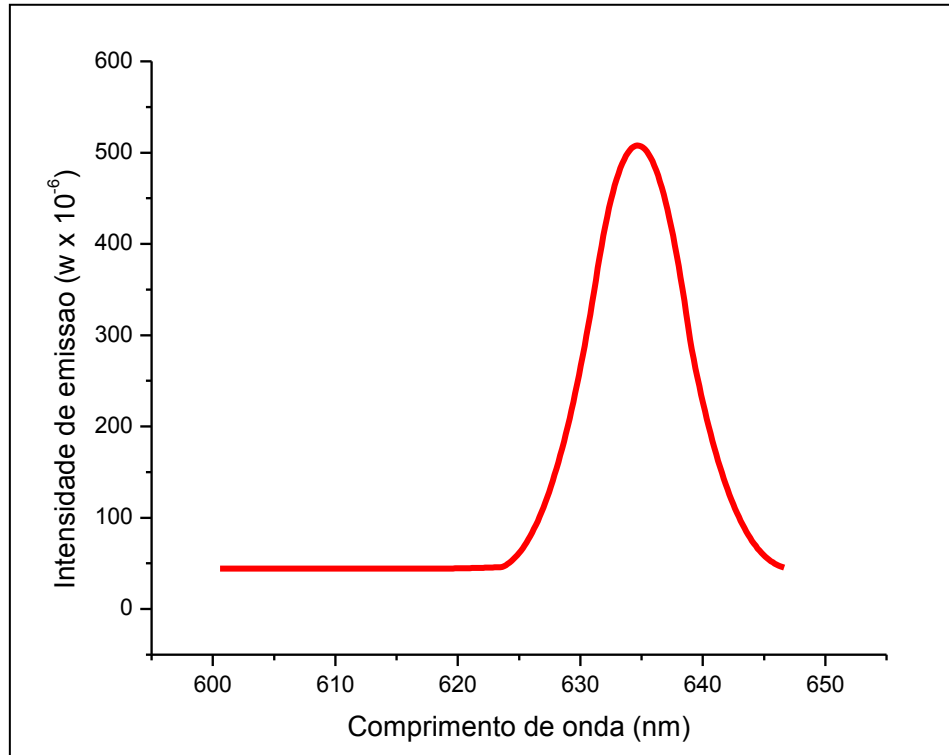


Figura 41 – Espectro de emissão do sistema de LED vermelho.

Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 42 a 44. Observou-se que a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ não apresentou decaimento significativo no máximo de absorção da banda Soret frente à iluminação dos sistemas de LED. Para os três sistemas de iluminação utilizados, constatou-se uma diminuição da absorção da porfirina após período de 60 min de iluminação igual a 1,3 %. Isso demonstra que a estrutura da porfirina não é degradada nessas condições experimentais.

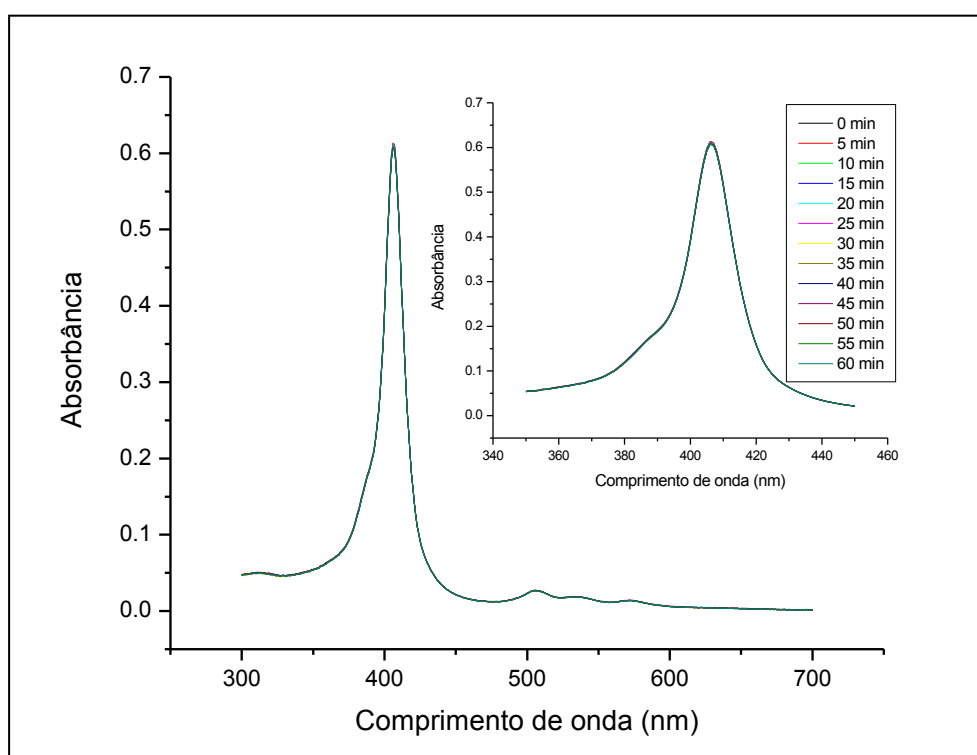


Figura 42 – Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ em água ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$) durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED alaranjado em diferentes tempos de irradiação.

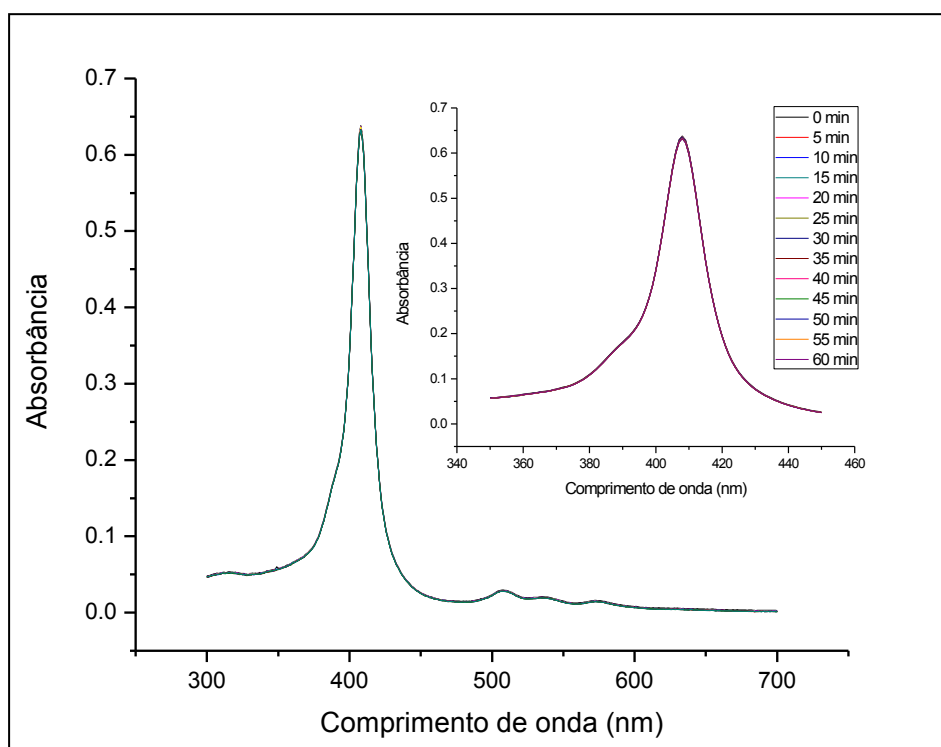


Figura 43 – Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em água ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$) durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED verde em diferentes tempos de irradiação.

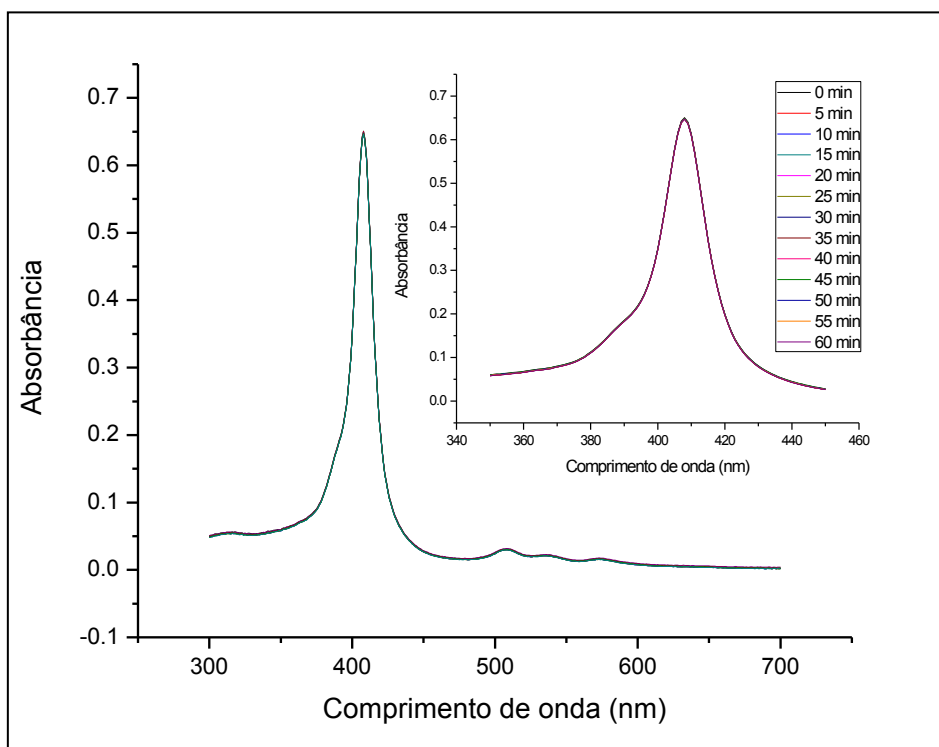


Figura 44 – Espectros de absorção da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em água ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$) durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED vermelho em diferentes tempos de irradiação.

A zinco porfirina também não apresentou decaimento significativo no máximo de absorção da banda Soret frente à iluminação dos sistemas de LED. Analisando os resultados apresentados nas Figuras 45 a 47, observou-se que, para os sistemas de iluminação alaranjado e vermelho, a redução do máximo de absorção do composto por um período de 60 min de iluminação é igual a 0,6 % e, para o sistema de iluminação verde, é de 0,4%, demonstrando que esse composto também não é degradado nessas condições experimentais.

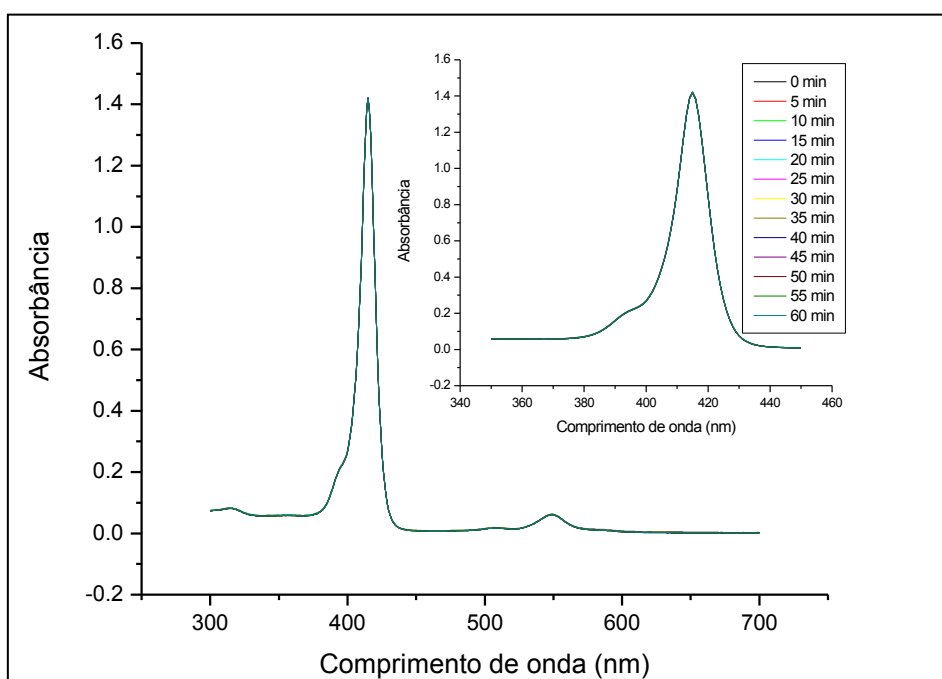


Figura 45 – Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em água ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$) durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED alaranjado em diferentes tempos de irradiação.

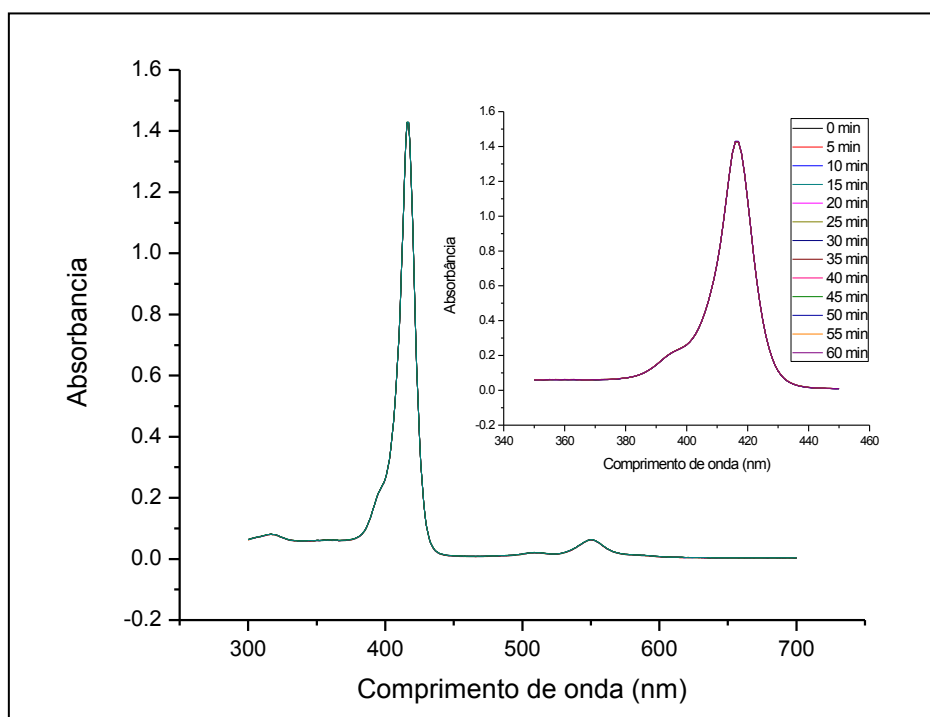


Figura 46 – Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em água ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$) durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED verde em diferentes tempos de irradiação.

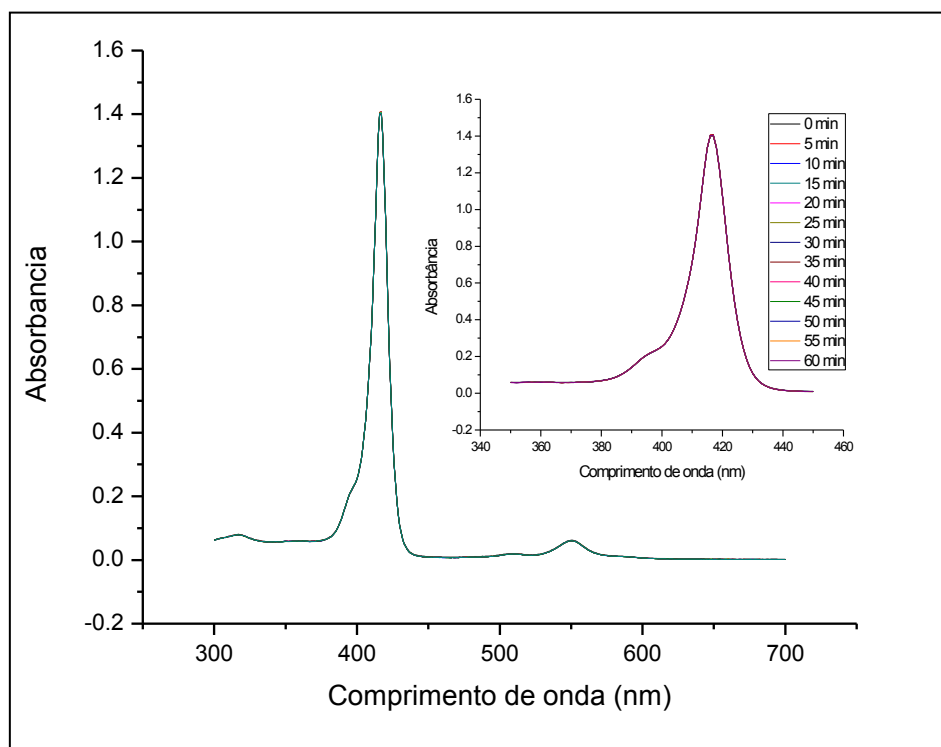


Figura 47 – Espectros de absorção da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em água ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$) durante o teste de fotobranqueamento com sistema de LED vermelho em diferentes tempos de irradiação.

Os valores de percentagem de fotobranqueamento estão resumidos na Tabela 4. De acordo com os dados, é possível observar que a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ apresenta menor percentagem de fotobranqueamento, quando comparada com a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$.

Tabela 4 – Percentagens de fotobranqueamento em sistemas de LED

LED	Composto	
	$\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$	$\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$
Alaranjado	1,3%	0,6%
Verde	1,3%	0,4%
Vermelho	1,3%	0,6%

Compararam-se os dados obtidos com o estudo realizado com os compostos $[\text{H}_2(\text{TNBPyP})]$ e $[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$ nas mesmas condições experimentais.

Para a porfirina $[\text{H}_2(\text{TNBPyP})]$, observou-se um decaimento de 5,2 % no máximo de absorção da banda Soret quando iluminada por LED vermelho e de 3,7 % na presença do LED alaranjado. Para $[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$, quando submetido à iluminação de LED alaranjado, apresentou decaimento de 7,0%, para o sistema de LED verde 13,3% e para o sistema de LED vermelho 2% (DOMARESKI, 2009; MENDES, 2008).

Analisando-se esses dados é possível constatar que os compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ são mais estáveis, quando comparado aos compostos $[\text{H}_2(\text{TNBPyP})]$ e $[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$ submetidos às mesmas condições experimentais, portanto pode-se afirmar que os compostos analisados nesse trabalho não apresentam fotodegradação frente a esses sistemas de iluminação sendo estáveis em condições de iluminação de LED e em presença de espécies como oxigênio singlete, sendo, portanto um indicativo de aplicabilidade em TFD.

4.4 – Avaliação da atividade fotodinâmica através do teste do ácido úrico

Com o teste do ácido úrico é possível constatar a geração de oxigênio singlete, espécie essencial para TFD. O ácido úrico é uma substância aceptora de oxigênio singlete. Esse teste não constata diretamente a geração de oxigênio singlete, mas, sim, a atividade fotodinâmica das porfirinas relacionada com a capacidade de gerar oxigênio singlete (MAESTRIN et al., 2004)

Trata-se de uma metodologia simples, que consiste na solubilização do composto em solução de ácido úrico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, seguida da irradiação com sistema de LED por um período de 60 min. Foram utilizados sistemas de LED alaranjado, verde e vermelho para cada composto.

À medida que ocorre a formação de oxigênio singlete, o mesmo é captado pelo ácido úrico, ocasionando redução na intensidade da banda de absorção do ácido úrico, que é observada na faixa de 280 – 310 nm. Trata-se de uma determinação quantitativa da ação fotodinâmica do fotossensibilizador, quando prevalece o mecanismo de ação do Tipo II na TFD, de acordo com a Figura 48, que apresenta a fotoxidação do ácido úrico (MAESTRIN et al., 2004).

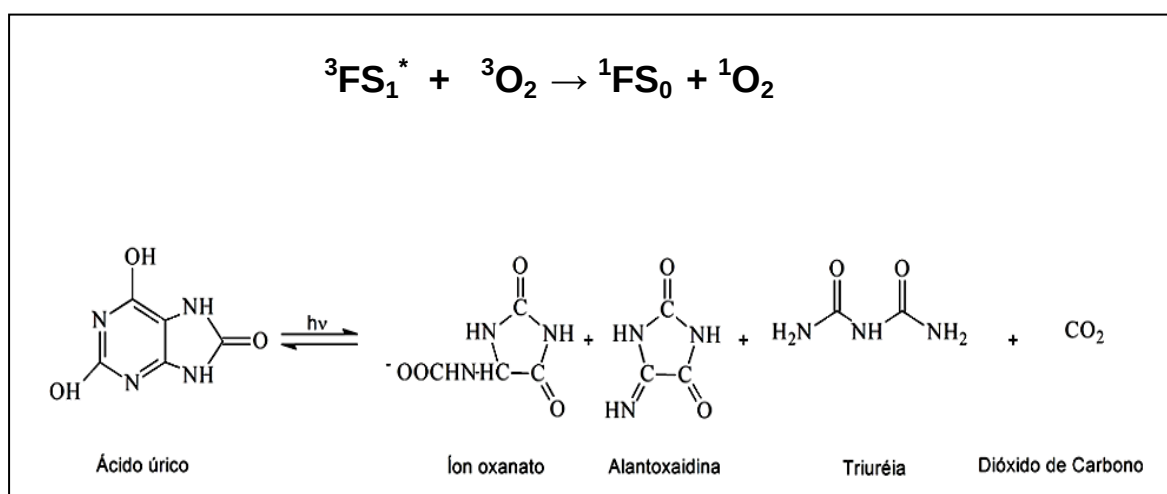


Figura 48 - Fotoxidação do ácido úrico via oxigênio singlete.

Quanto maior a produção de oxigênio singlete dos compostos, maior é o decaimento da banda de absorção do ácido úrico e melhor será sua eficiência em TFD.

Também foram realizadas medidas experimentais somente com a solução de ácido úrico, para verificar se as diferentes faixas de emissão de luz poderiam causar algum decaimento da banda de absorção do ácido úrico (Figuras 49, 50 e 51). Observou-se que, sem a presença dos compostos não ocorre decaimento da banda de absorção do ácido úrico.

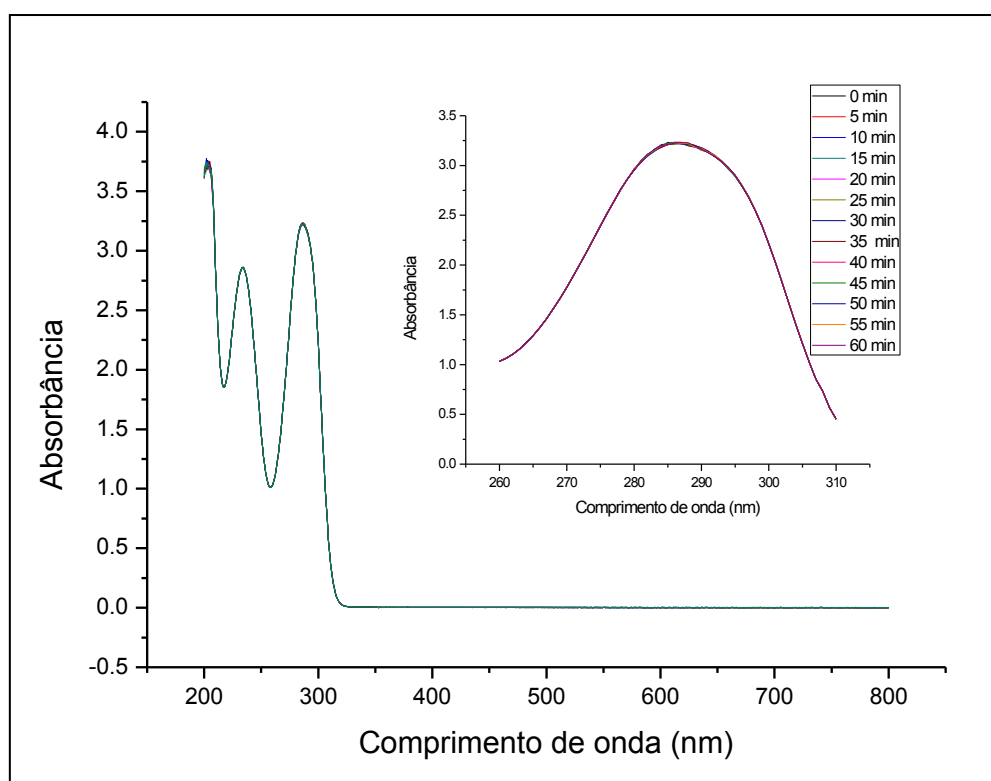


Figura 49 – Espectros de absorção do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ em água por um período de 60 min com LED alaranjado.

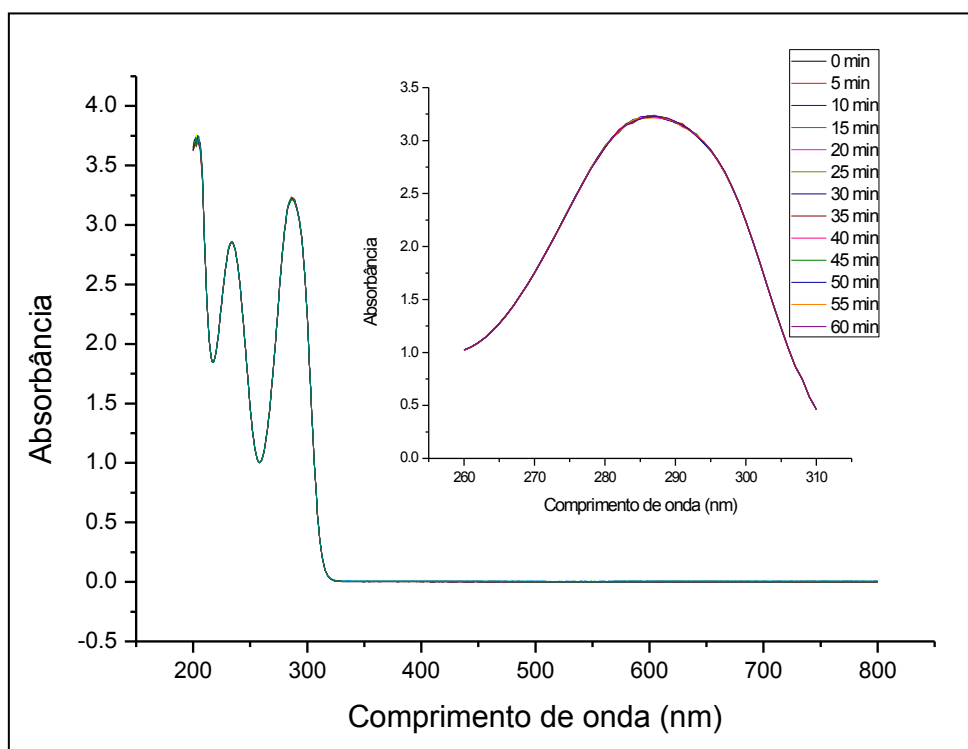


Figura 50 – Espectros de absorção do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em água por um período de 60 min com LED verde.

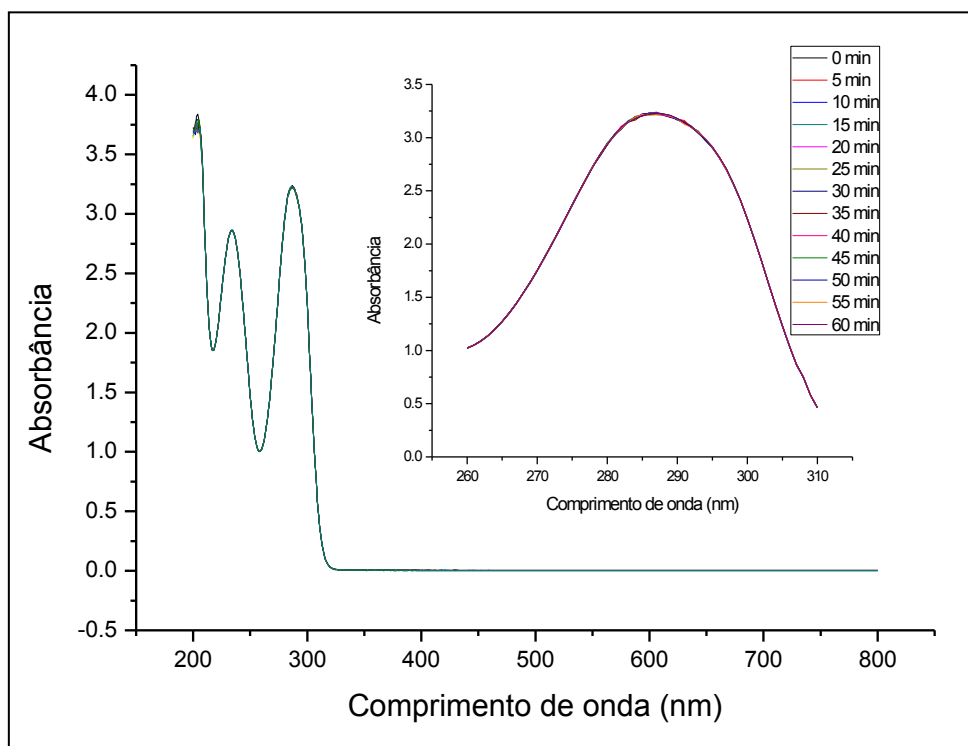


Figura 51 – Espectros de absorção do ácido úrico a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em água por um período de 60 min com LED vermelho.

Os espectros obtidos nas medidas experimentais realizadas com a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ são apresentados nas Figuras 52, 53 e 54, sendo possível observar a ocorrência de decomposição, através da diminuição da banda do ácido úrico em 293 nm, quando a porfirina foi iluminada com sistemas de LED (PELLOSI et al., 2008).

Analisando os resultados apresentados nas Figuras 52 a 54 observou-se que com o sistema de LED alaranjado, há uma decomposição do ácido úrico mais acentuada em relação aos outros dois sistemas. Utilizando-se a equação 01, calculou-se a atividade fotodinâmica para cada sistema. Os dados são apresentados na Tabela 5. Para a porfirina $[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ com iluminação com LED alaranjado a atividade fotodinâmica foi de 1,8.

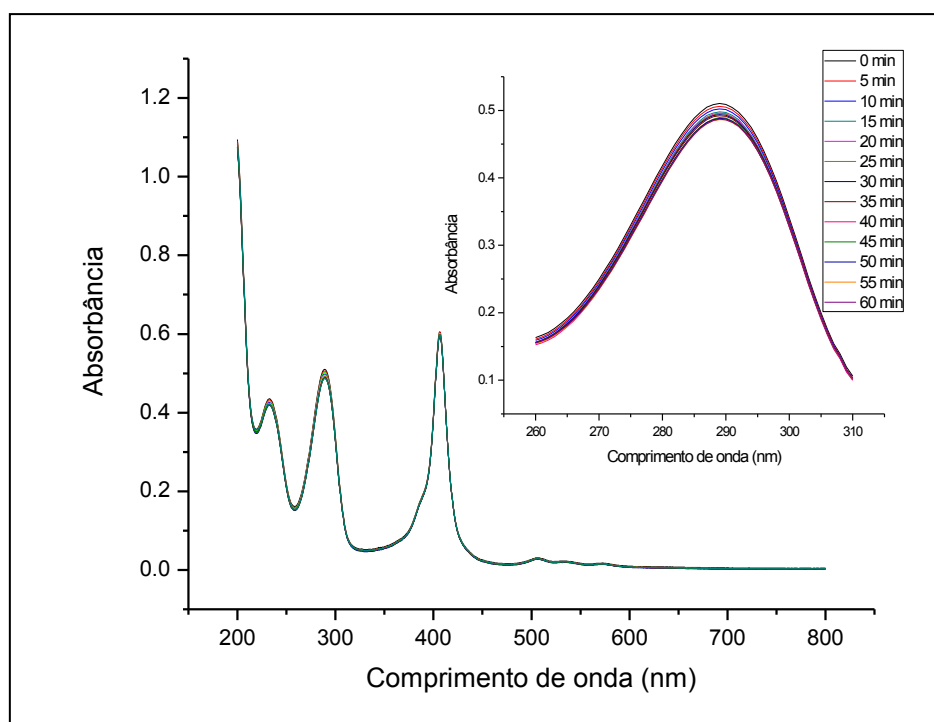


Figura 52 – Espectros de absorção de solução contendo ácido úrico ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) e porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em água sob iluminação de LED alaranjado por um período de 60 min.

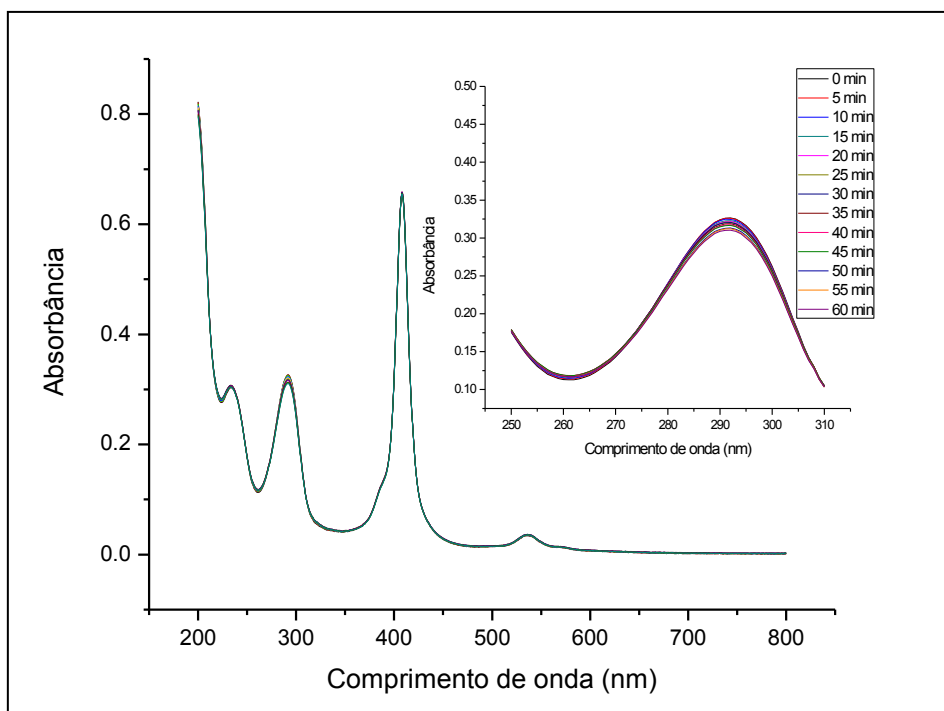


Figura 53 – Espectros de absorção de solução contendo ácido úrico ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) e porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ ($1,0 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) em água sob iluminação de LED alaranjado por um período de 60 min.

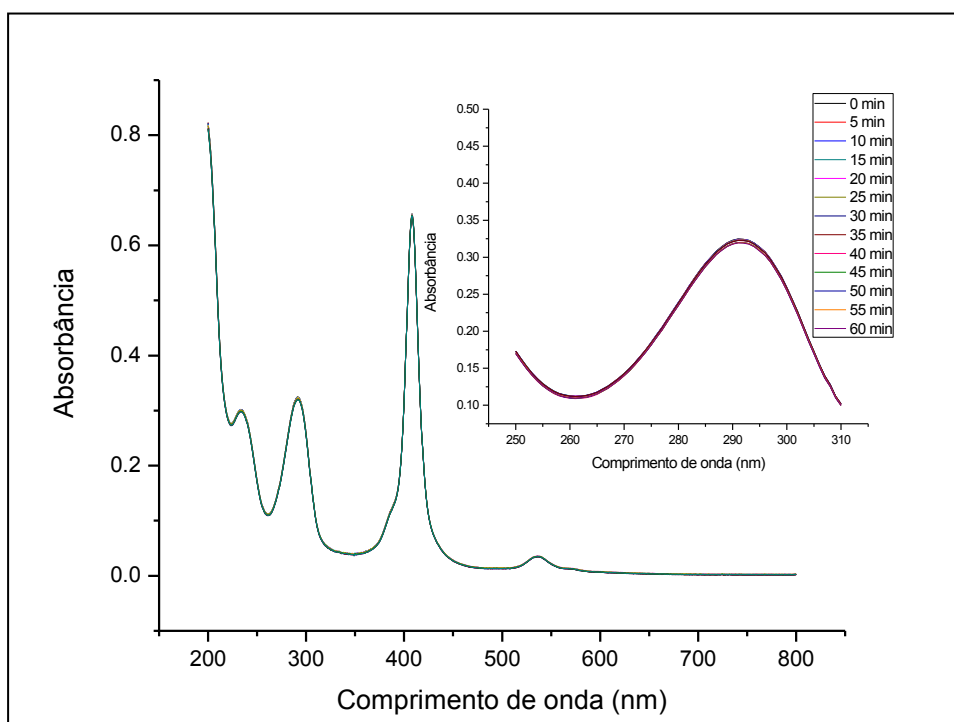


Figura 54 – Espectros de absorção de solução contendo ácido úrico ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) e porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ ($1,0 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) em água sob iluminação de LED alaranjado por um período de 60 min.

Comparando-se os dados obtidos da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ com o estudo realizado com a porfirina $[\text{H}_2(\text{TNBPyP})]\text{Br}_4$ nas mesmas condições experimentais, observou-se que para a porfirina $[\text{H}_2(\text{TNBPyP})]\text{Br}_4$ quando submetida ao sistema de LED verde, apresentou atividade fotodinâmica de 5,2 e, quando submetida ao sistema de LED vermelho, apresentou atividade fotodinâmica de 19,7. O maior decaimento da banda característica do AU, em 293 nm foi observado quando a solução da porfirina foi submetida ao sistema de LED verde (DOMARESKI, 2009). Portanto com os resultados obtidos para os sistemas de LED verde e vermelho é possível constatar que a porfirina $[\text{H}_2(\text{TNBPyP})]\text{Br}$ é mais eficiente na geração de oxigênio singlete, quando comparada à porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ nas mesmas condições experimentais. A porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ apresentou maior atividade fotodinâmica, quando submetida ao sistema de LED alaranjado. Quando submetida à iluminação do sistema de LED verde, apresentou a menor atividade fotodinâmica, o que caracteriza geração de oxigênio singlete inferior aos demais sistemas de LED.

Os espectros de absorção obtidos nos experimentos com a zinco porfirina estão apresentados nas Figuras 55, 56 e 57. Observa-se uma decomposição mais acentuada do ácido úrico em 293 nm em comparação com a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$.

Os valores da atividade fotodinâmica obtidos através da equação 01, são apresentados na Tabela 5.

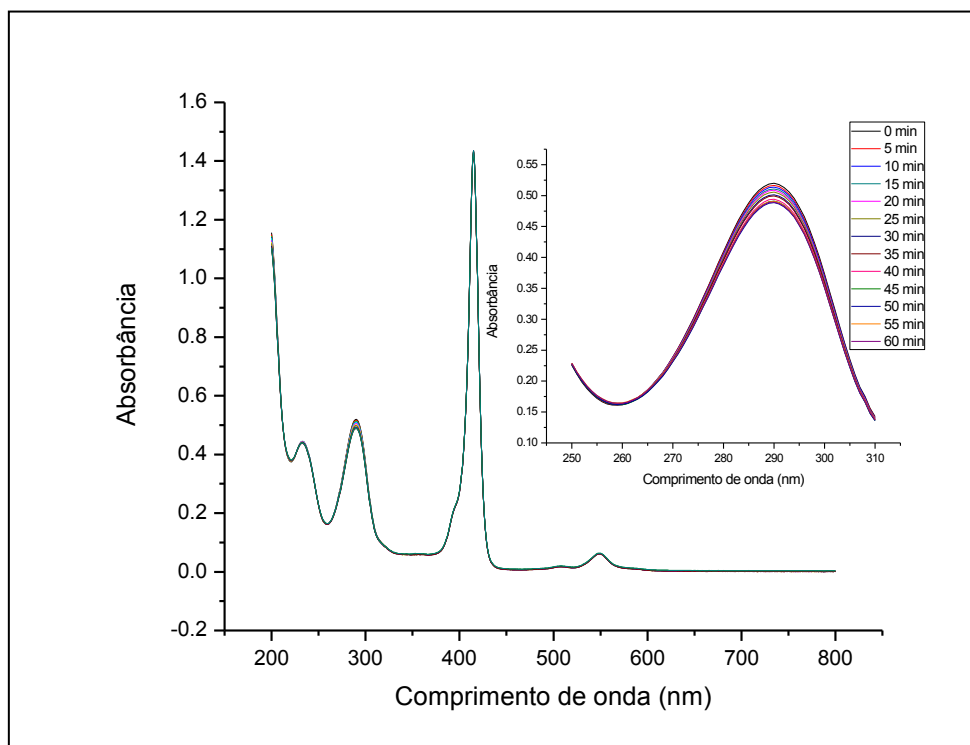


Figura 55 – Espectros de absorção de solução contendo ácido úrico ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) e porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em água sob iluminação de LED alaranjado por um período de 60 min.

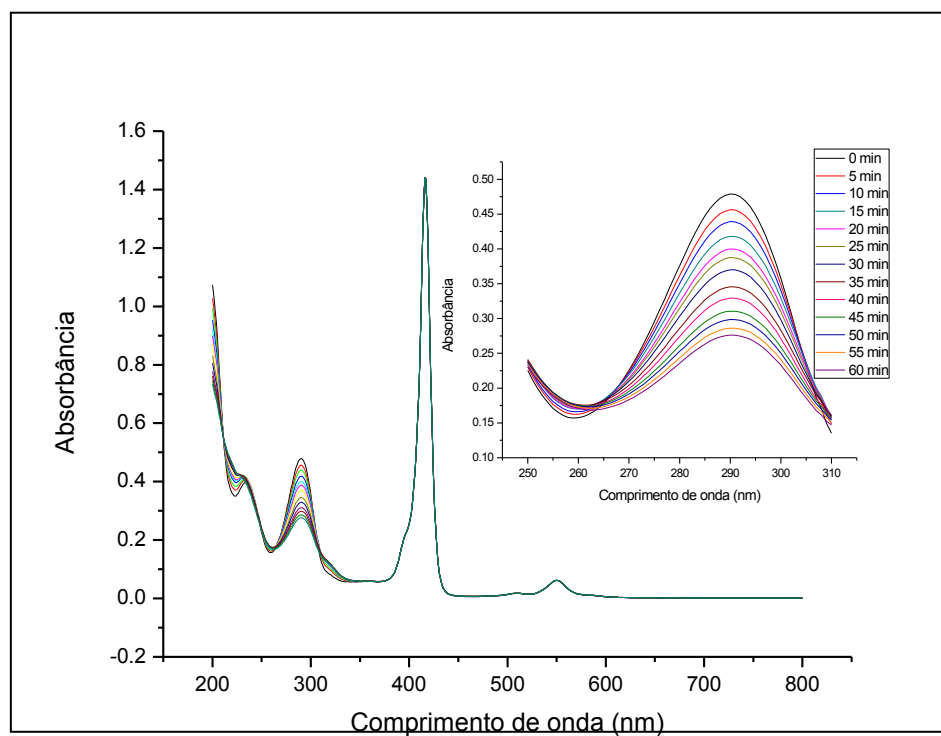


Figura 56 – Espectros de absorção de solução contendo ácido úrico ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) e porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em água sob iluminação de LED alaranjado por um período de 60 min.

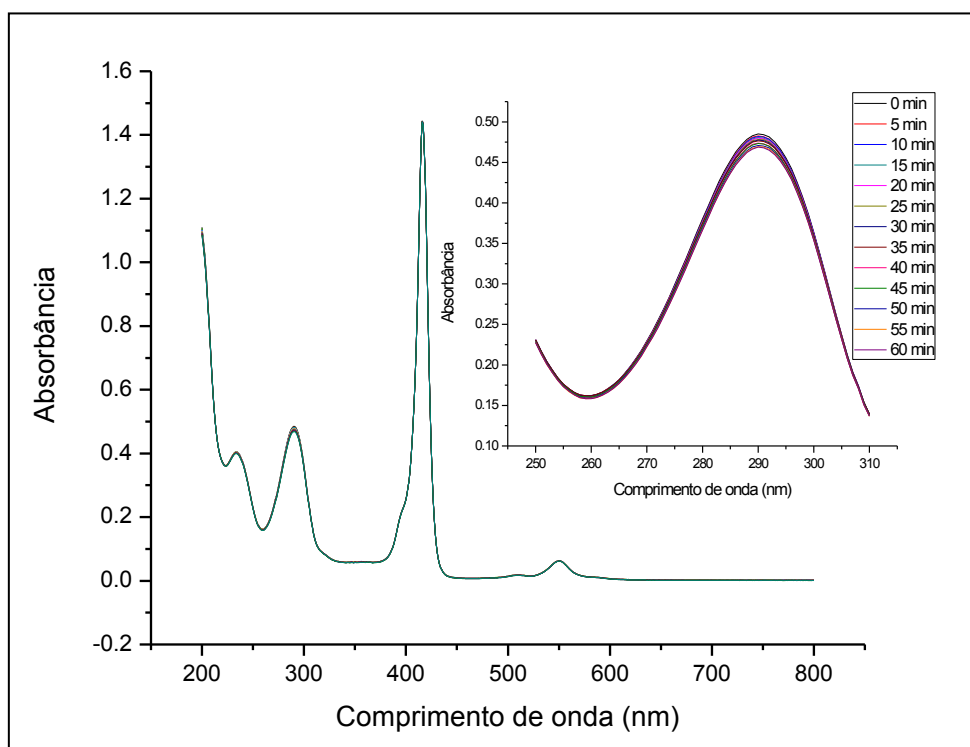


Figura 57 – Espectros de absorção de solução contendo ácido úrico ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L) e porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em água sob iluminação de LED alaranjado por um período de 60 min.

A Tabela 5 apresenta de forma resumida os valores de atividade fotodinâmica, dentre outras grandezas obtidas nos experimentos de ácido úrico. Pode-se observar que a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ apresentou maior atividade fotodinâmica, quando submetida ao sistema de LED verde. Quando submetida à iluminação do sistema de LED vermelho, apresentou a menor atividade fotodinâmica.

Tabela 5 – Valores médios de grandezas obtidas a partir dos espectros do teste de ácido úrico para os compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$.

Composto	LED	ΔA_{AU}	T (s)	AF
$\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$	Alaranjado	0,020	3600	1,8
	Verde	0,016	3600	0,6
	Vermelho	0,005	3600	1,1
$\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$	Alaranjado	0,030	3600	3,6
	Verde	0,196	3600	12,2
	Vermelho	0,016	3600	4,8

ΔA_{AU} = variação da absorvância em 293nm da solução após o tempo total de irradiação; t = tempo de irradiação; AF= atividade fotodinâmica.

Compararam-se os dados obtidos da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ com o estudo realizado por Domareski e Mendes com o composto $[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$ nas mesmas condições experimentais. Para o composto $[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$, os resultados indicam uma maior atividade fotodinâmica com o uso do LED alaranjado, sendo de 13,6 a atividade fotodinâmica. Para o sistema de LED verde, foi de 4,5 e, para o sistema de LED vermelho, foi de 0,27 (DOMARESКИ, 2009; MENDES, 2008).

Soares também desenvolveu estudo semelhante com amostras de clorofila a irradiando com LED vermelho por quarenta e cinco minutos e da feofitina a e azul de metileno em etanol irradiadas na presença de ácido úrico com a fonte de LED vermelho por trinta e seis minutos estão na mesma ordem de grandeza. Os valores de atividade fotodinâmica obtida para clorofila a é de 2,1 e para feofitina a e azul de metileno em etanol é de 4,0 e 3,7 respectivamente (SOARES, 2006).

Os compostos estudados neste trabalho geraram oxigênio singlete nas condições testadas, sendo que a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ apresentou a melhor eficiência na geração da espécie reativa, considerando o mesmo tempo de iluminação e os mesmos sistemas de LED.

4.5 – Ensaios Biológicos *in vitro*

4.5.1. – Toxicidade frente à *Artemia salina*

O teste de toxicidade basal foi utilizado para verificar, através de dados comparativos, se os compostos estudados apresentaram ação citotóxica sobre microcrustáceos sem a presença de iluminação, analisando-se se o melhor sistema para utilizar em TFD.

Os resultados obtidos no teste de toxicidade basal, realizado por um período de 24 horas sem iluminação, são apresentados na Figura 58.

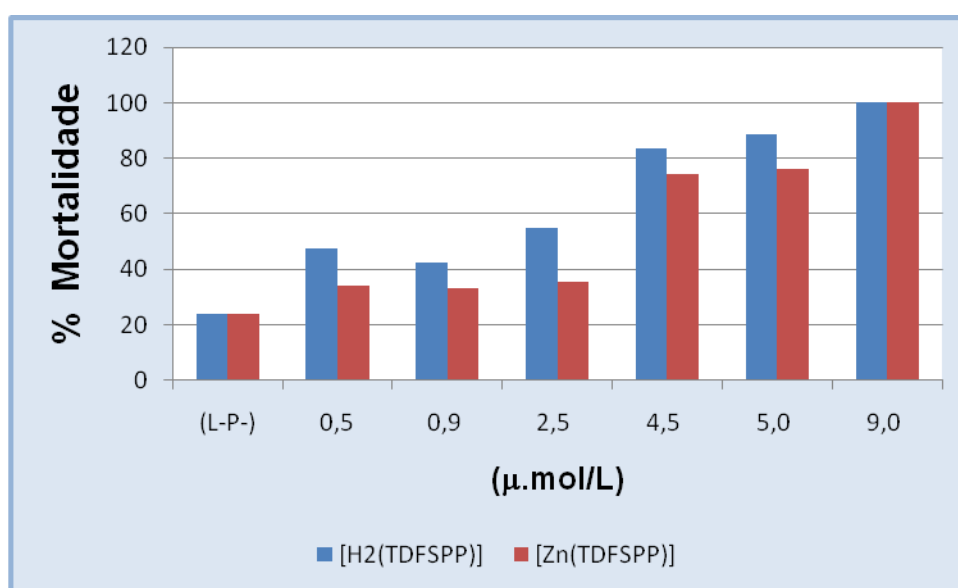


Figura 58 – Média de mortalidade de *Artemia salina* para soluções aquosas dos compostos em diferentes concentrações sem iluminação de LED.

Analisando-se a Figura 58, observa-se que os compostos apresentaram toxicidade para a *Artemia salina*. A toxicidade variou com a concentração das soluções dos compostos. Nos testes realizados em concentrações maiores, a percentagem de mortalidade foi maior, sendo necessário levar em consideração o teste realizado sem a presença de porfirina que apresentou 23,8% de mortalidade

de *Artemia salina*, possivelmente devido à perturbação (estresse) submetido às mesmas pelo período de 24 horas de incubação.

Nas Figuras 59, 60 e 61, são apresentados os resultados dos experimentos para avaliar a atividade fotodinâmica dos compostos frente à *Artemia salina*.

Os gráficos mostram a média percentual de mortalidade obtida com os diferentes sistemas de LED e solução dos compostos na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$.

De acordo com os gráficos apresentados, é possível concluir que as maiores percentagens de mortalidade de *Artemia salina* ocorrem nos testes realizados com a presença de porfirina e iluminação (L+P+), portanto observou-se atividade fotodinâmica.

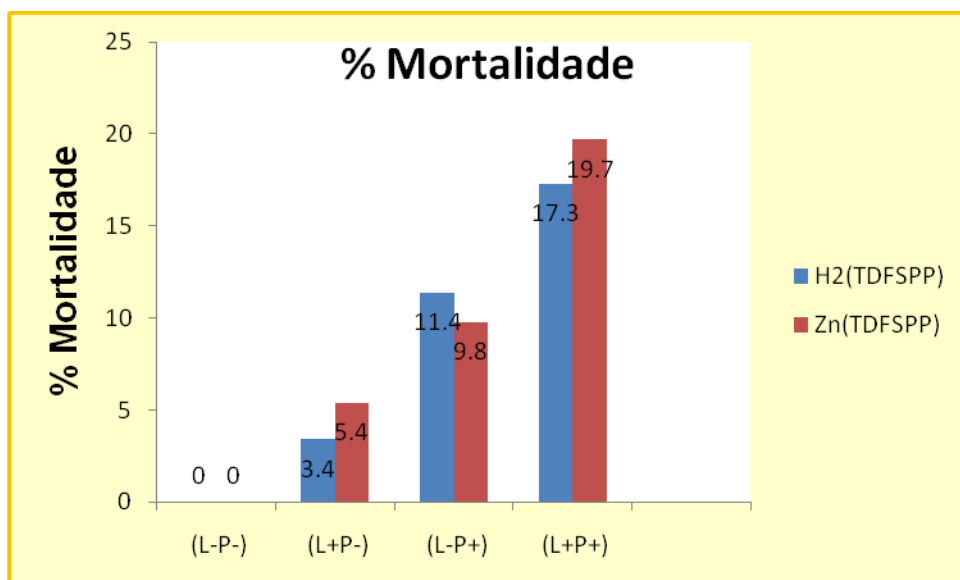


Figura 59 – Morte percentual média de *Artemia salina* para soluções aquosas dos compostos na concentração de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED alaranjado.

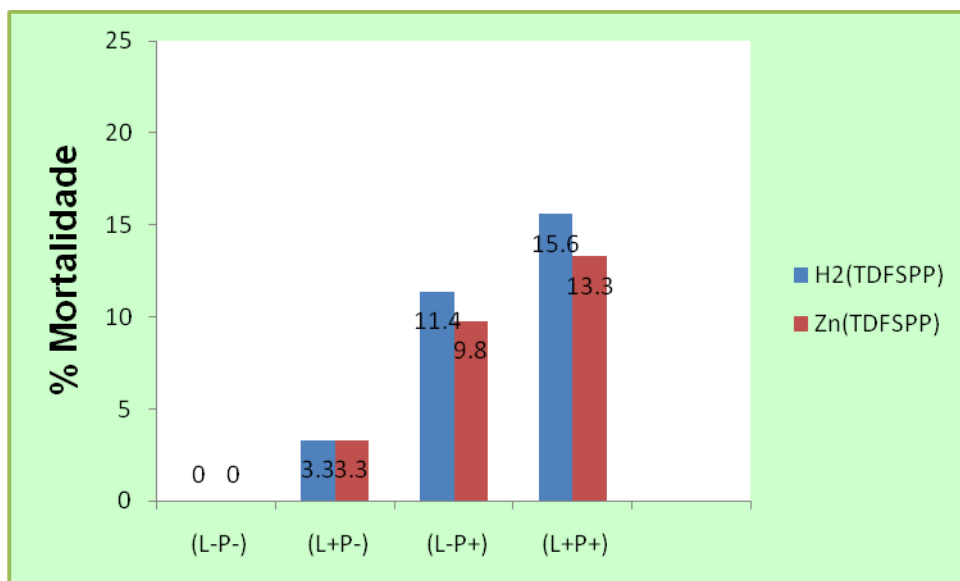


Figura 60 – Morte percentual média de *Artemia salina* para soluções aquosas dos compostos na concentração de 1,0 µmol/L e iluminação com LED verde.

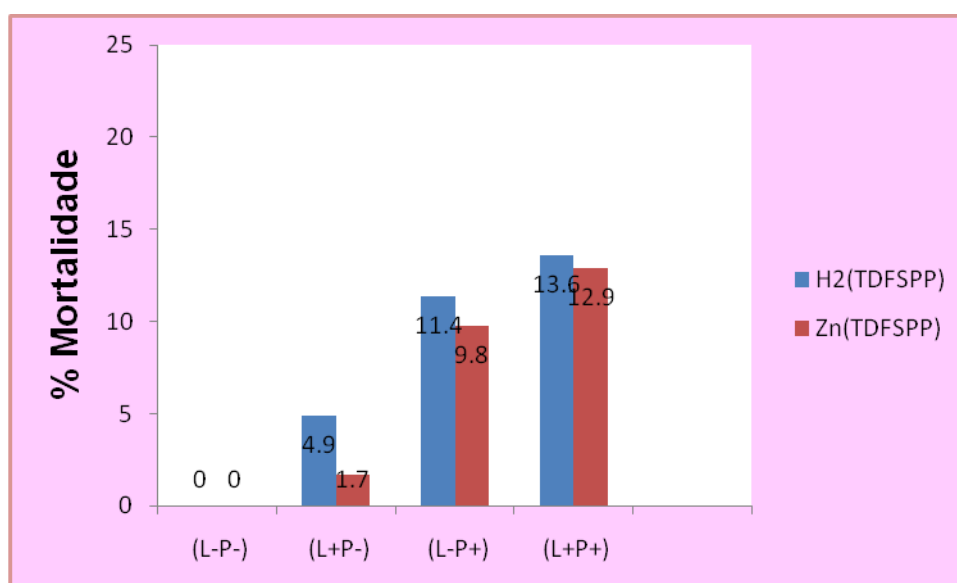


Figura 61 – Morte percentual média de *Artemia salina* para soluções aquosas dos compostos na concentração de 1,0 µmol/L e iluminação com LED vermelho.

Comparando-se os resultados obtidos para os dois, com os três sistemas de iluminação, verificou-se que o melhor resultado de atividade fotodinâmica foi observado nos testes com o LED alaranjado, Figura 59, a mortalidade foi superior sob iluminação para todos os sistemas analisados.

Um fator importante verificado é que, nos testes realizados com iluminação de LED alaranjado, verde e vermelho, a percentagem de mortalidade foi mais baixa do

que a percentagem obtida no teste de toxicidade basal. Isso ocorre porque, durante a iluminação com LED, os microcrustáceos ficaram em contato com a solução dos compostos por um período de uma hora com iluminação e mais duas horas para iniciar a contagem dos microcrustáceos e, nos testes de toxicidade basal, por um período de 24 horas.

As Figuras 62, 63 e 64 apresentam os gráficos da percentagem de mortalidade de *Artemia salina* para as soluções de ambos os compostos com concentração de 5,0 $\mu\text{mol/L}$.

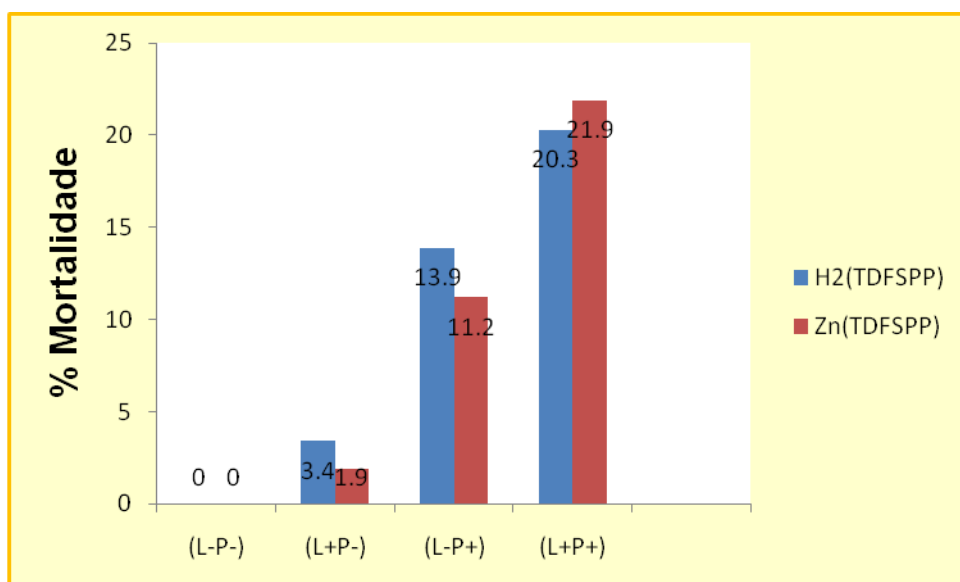


Figura 62 – Morte percentual média de *Artemia salina* para soluções aquosas dos compostos na concentração de 5,0 $\mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED alaranjado.

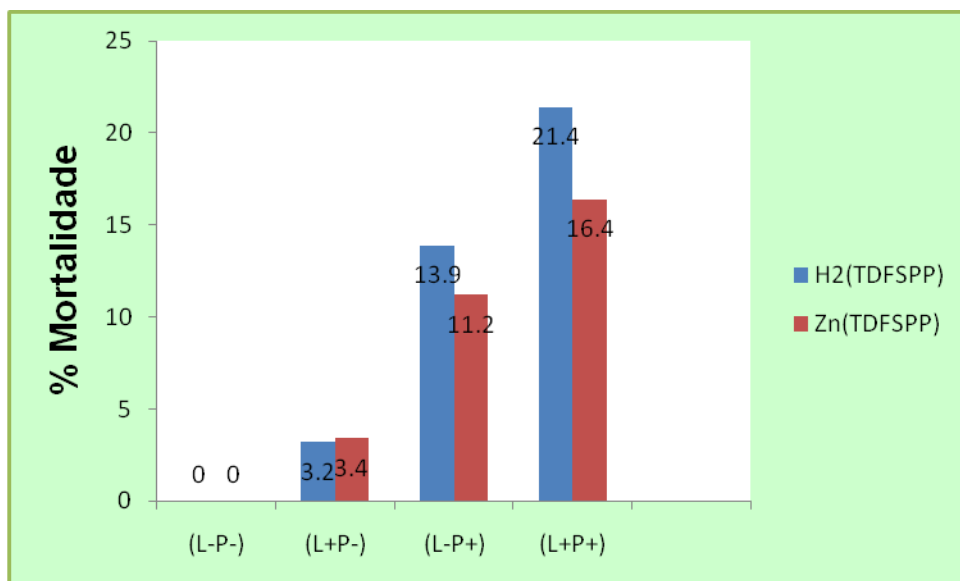


Figura 63 – Morte percentual média de *Artemia salina* para soluções aquosas dos compostos na concentração de 5,0 $\mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED verde.

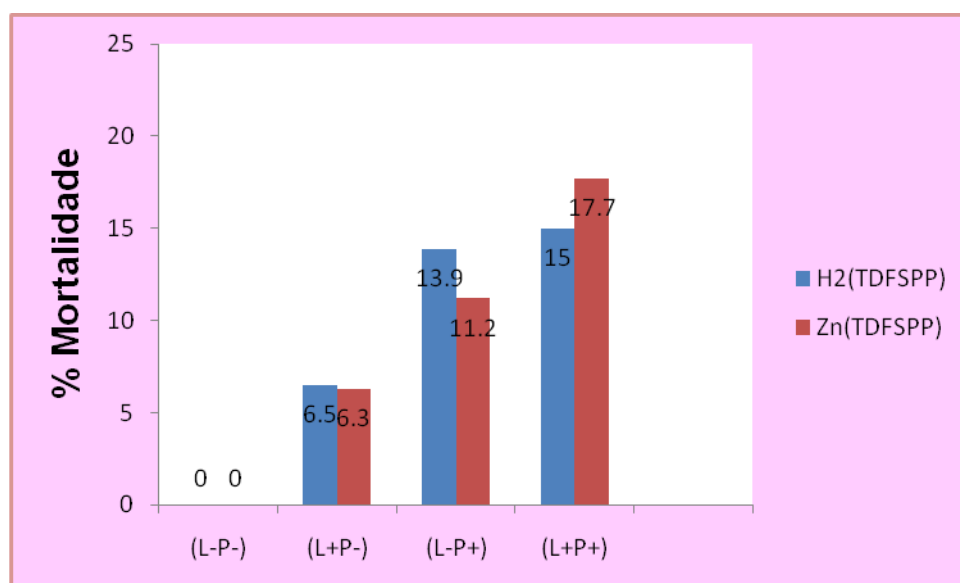


Figura 64 – Morte percentual média de *Artemia salina* para soluções aquosas dos compostos na concentração de 5,0 $\mu\text{mol/L}$ e iluminação com LED vermelho.

Os resultados mostram que a porfina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ apresentou melhor resultado com o sistema de LED verde (Figura 63) e a zinco porfina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, apresentou o melhor resultado com o sistema de LED alaranjado (Figura 62) na concentração analisada.

Analisando conjuntamente os resultados obtidos para os dois compostos, as duas concentrações e o teste de toxicidade basal, observou-se que, embora a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ tenha uma maior toxicidade sem iluminação, comparada a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, essa porfirina apresentou melhores resultados de ação fotodinâmica com concentração de $5,0 \mu\text{mol/L}$ e com iluminação de sistema de LED verde.

Comparou-se o estudo realizado com esses compostos com um estudo já realizado anteriormente com outros dois compostos, utilizando-se as mesmas condições experimentais. No trabalho realizado por Domareski, a porfirina $[\text{H}_2(\text{TNBPyP})]$, com solução na concentração de $2,2 \mu\text{mol/L}$, apresentou melhores resultados de ação fotodinâmica com sistema de iluminação de LED vermelho, sendo de 65% a percentagem de mortalidade de *Artemia salina*, sob essas condições experimentais. Para o composto $[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$, com solução na concentração de $5,0 \mu\text{mol/L}$, a percentagem de mortalidade de *Artemia salina* foi de 10,17% para o sistema de LED vermelho, que apresentou os melhores resultados. O composto $[\text{Zn}(\text{TPPS}_4)]$, apresentou percentagem de mortalidade superior sob iluminação, com uma diferença de três a quatro vezes maior que sem iluminação (DOMARESKI, 2009).

4.5.2 – Cultura de Micro-organismo: *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Para avaliar a atividade fotodinâmica dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, na inativação de micro-organismos, realizaram-se testes com a levedura (fungo) *Candida albicans* e as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. O diferencial desse trabalho é o uso dos sistemas de iluminação com LED já utilizados com outros fotossensibilizadores por Domareski e Mendes.

Na Figura 65, é apresentado o crescimento da levedura e das bactérias sem a presença de solução dos compostos e sem a presença de iluminação.

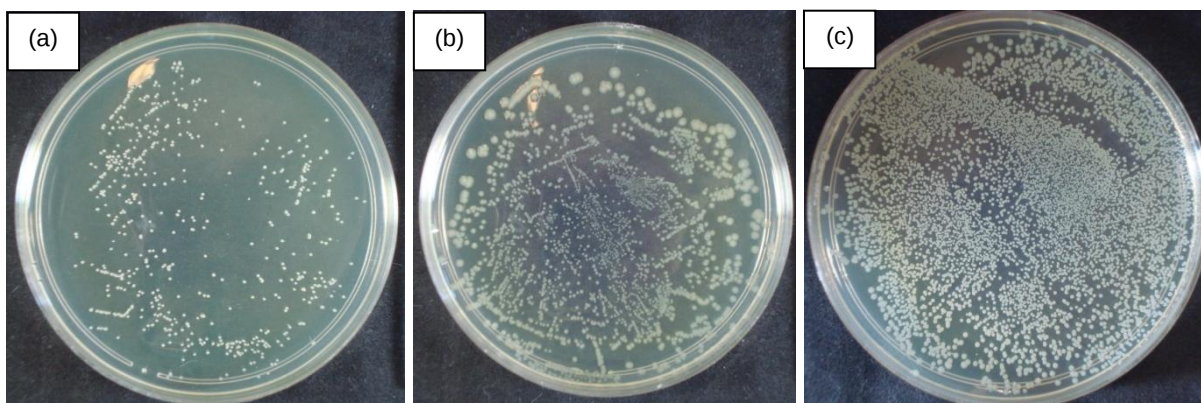


Figura 65 – Unidades formadoras de colônia de *Candida albicans* (a), *Escherichia coli* (b) e *Staphylococcus aureus* (c) sem a presença de solução dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ e sem iluminação.

A Tabela 6 apresenta a média dos valores obtidos para cada experimento com a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$. Analisando a Tabela, é possível verificar que, na presença de solução dos compostos e sem a presença de iluminação (L-P+), ocorreu inibição no crescimento dos micro-organismos, na presença somente de iluminação (L+P-) com os sistemas de LED também foi possível constatar inibição no crescimento dos micro-organismos, mas a maior inibição no crescimento de micro-organismos foi observada para o sistema com a presença de solução de porfirina e iluminação (L+P+), portanto indicando ação fotodinâmica.

Tabela 6 – Média do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) ($\times 10^3$) na presença e ausência da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em diferentes sistemas.

$\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$						
Micro-organismo	(L-P-)	(L-P+)	LED	Iluminação	(L+P-)	(L+P+)
<i>Candida albicans</i>	487	418	Amaranjado	10 min	391	360
				30 min	401	383
			Vermelho	10 min	390	371
				30 min	409	405
<i>Escherichia coli</i>	2332	1985	Amaranjado	10 min	1712	1636
				30 min	1699	1541
			Vermelho	10 min	1302	1107
				30 min	1625	1429
<i>Staphylococcus aureus</i>	2355	2308	Amaranjado	10 min	1551	1491
				30 min	2108	1952
			Vermelho	10 min	1877	1665
				30 min	2199	2090

Sem luz e sem solução do composto (L-P-); com luz e sem solução do composto (L+P-); sem luz e com solução do composto (L-P+).

Para a levedura *Candida albicans*, os melhores resultados de ação fotodinâmica na inibição do crescimento do micro-organismo foram observados para o sistema de iluminação com LED amaranjado.

Para a bactéria *Escherichia coli*, os melhores resultados de ação fotodinâmica na inibição do crescimento bacteriano foram observados para o sistema de iluminação vermelho e para a bactéria *Staphylococcus aureus*, o melhor resultado foi observado para o sistema de LED amaranjado.

Um fator importante que foi observado é que o tempo de irradiação com os sistemas de LED não influenciou na inibição do crescimento dos micro-organismos para os tempos de iluminação testados. Esperava-se que, ao aumentar o tempo de irradiação sobre os sistemas, ocorreria maior inibição no crescimento desses micro-organismos, ou seja, menor número de colônias deveria ser observado.

Esse fato só foi observado para a bactéria *Escherichia coli* com o sistema de LED amaranjado, sendo observado menor número de colônias no tempo de 30 min,

quando comparado ao tempo de 10 min de irradiação. Esse fato pode ser observado nos gráficos apresentados nas Figuras 66, 67 e 68.

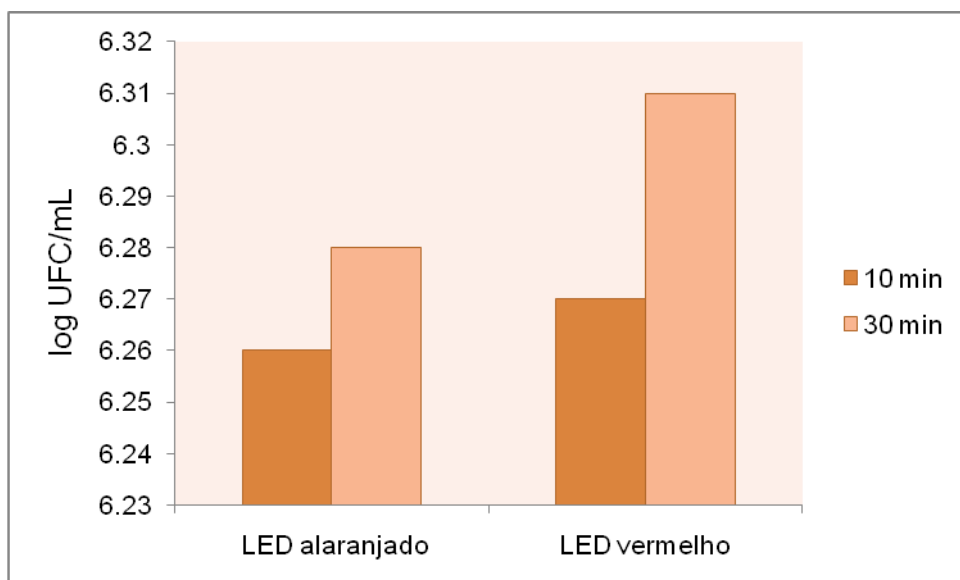


Figura 66 - Efeito da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ para *Candida albicans* em sistema de LED alaranjado e vermelho.

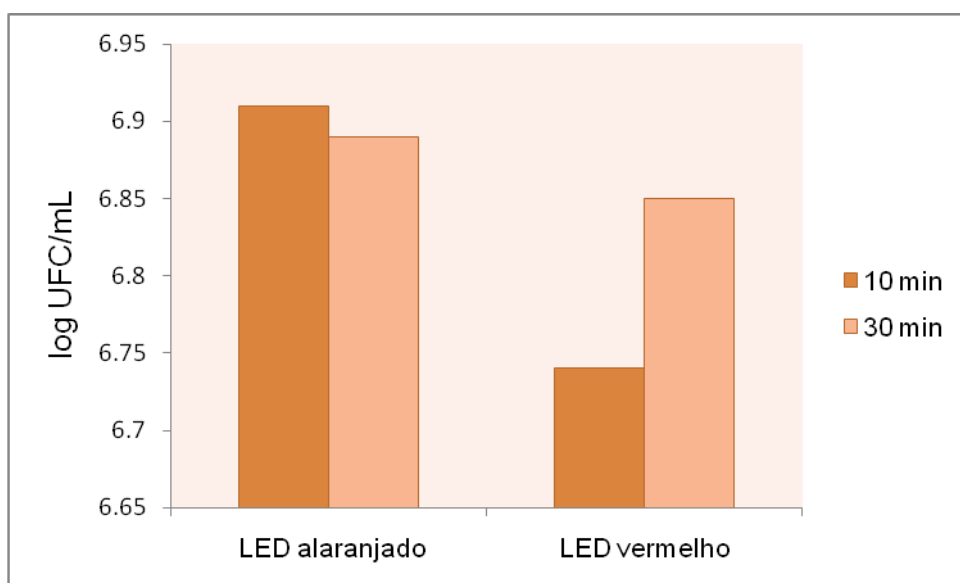


Figura 67 - Efeito da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ para a bactéria *Escherichia coli* em sistema de LED alaranjado e vermelho.

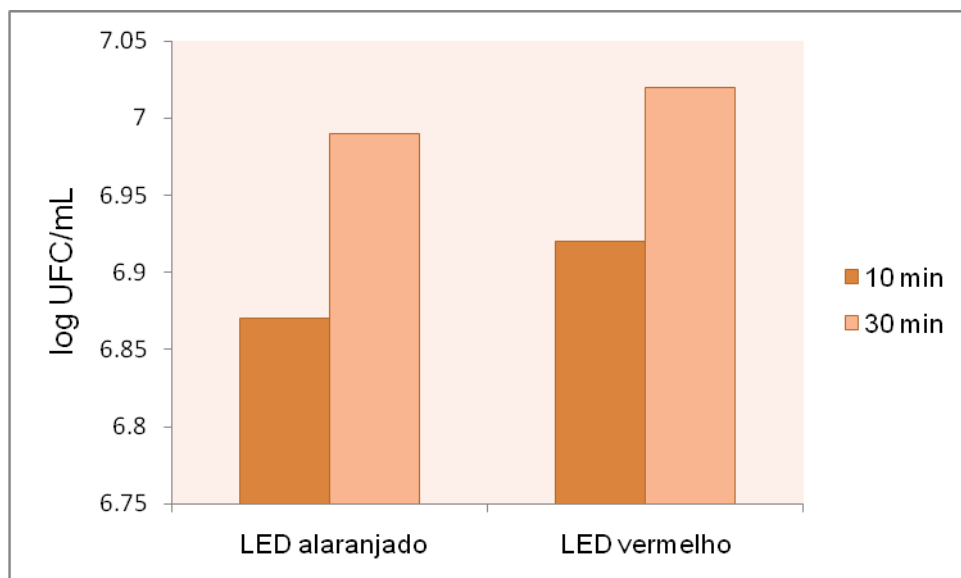


Figura 68 - Efeito da porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ para a bactéria *Staphylococcus aureus* em sistema de LED alaranjado e vermelho.

Comparou-se este estudo com o estudo realizado por Domareski com a porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ e a bactéria *Staphylococcus aureus*. De acordo com os resultados obtidos para a porfirina $\text{H}_2(\text{TNBPyP})$ na concentração de $5,0 \mu\text{mol/L}$ e iluminação com os mesmos sistemas de LED utilizados neste trabalho, observou-se que ocorreu inibição no crescimento da bactéria para os dois sistemas de LED utilizados. Ocorreu maior inibição do crescimento bacteriano quando se utilizou o sistema de LED alaranjado, e, ao aumentar o tempo de irradiação com os sistemas de LED, ocorreu melhor ação fotodinâmica, ou seja, melhores resultados na inibição do crescimento bacteriano (DOMARESKI, 2009).

A Tabela 7 apresenta a média dos valores obtidos para cada experimento com a zinco porfirina. De acordo com a tabela, é possível analisar que, na presença de solução do composto e sem iluminação (L-P+), ocorreu inibição no crescimento dos micro-organismos. Na presença somente de iluminação (L+P-) com os sistemas de LED, também foi possível constatar inibição no crescimento dos micro-organismos. A melhor ação fotodinâmica foi observada para o sistema com a presença de solução de porfirina e iluminação (L+P+), o mesmo também havia sido observado para a porfirina $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$.

Tabela 7 – Média do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) ($\times 10^3$) na presença e na ausência do composto $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ em diferentes sistemas.

$\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$						
Micro-organismo	(L-P-)	(L-P+)	LED	Iluminação	(L+P-)	(L+P+)
<i>Candida albicans</i>	487	286	Amaranjado	10 min	247	203
				30 min	256	227
			Vermelho	10 min	222	195
				30 min	243	218
<i>Escherichia coli</i>	2332	2229	Amaranjado	10 min	918	730
				30 min	1213	982
			Vermelho	10 min	1623	1442
				30 min	1901	1706
<i>Staphylococcus aureus</i>	2355	2194	Amaranjado	10 min	2019	1984
				30 min	1844	1614
			Vermelho	10 min	1124	983
				30 min	1107	907

Para a zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ com a levedura *Candida albicans*, os melhores resultados de ação fotodinâmica na inibição do crescimento do micro-organismo foram observados para o sistema de iluminação com LED vermelho.

Para a bactéria *Escherichia coli*, os melhores resultados de ação fotodinâmica na inibição do crescimento bacteriano foram observados para o sistema com LED amaranjado e, para a bactéria *Staphylococcus aureus*, o melhor resultado foi observado para o sistema de LED vermelho.

O tempo de irradiação com os sistemas de LED não influenciaram na inibição do crescimento dos micro-organismos da levedura *Candida albicans* e da bactéria *Escherichia coli*. Foi observado menor número de colônias no tempo de 30 min, quando comparado ao tempo de 10 min de irradiação para a bactéria *Staphylococcus aureus* com os sistemas de LED amaranjado e vermelho. Esses fatos podem ser observados nos gráficos apresentados nas Figuras 69,70 e 71.

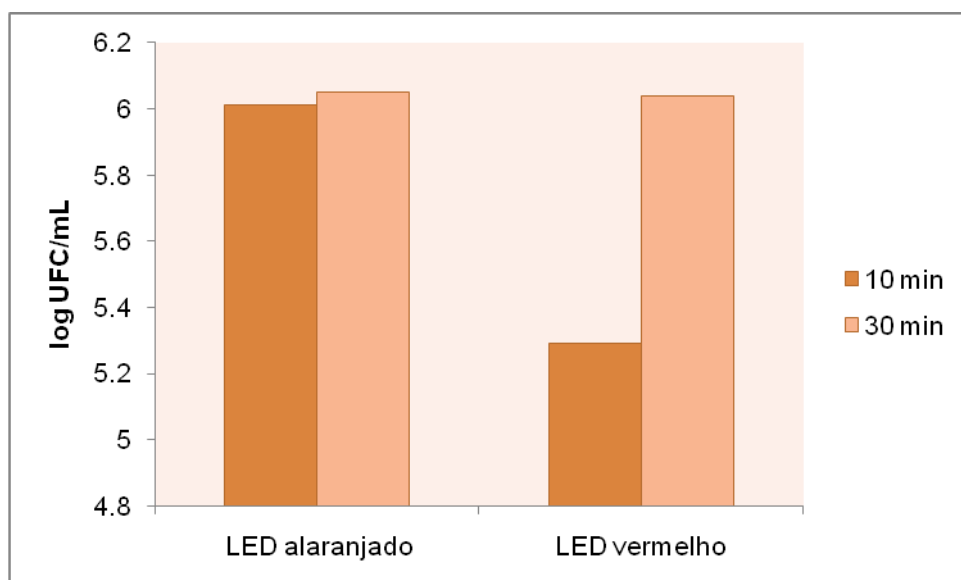


Figura 69 - Efeito da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ para *Candida albicans* em sistema de LED alaranjado e vermelho.

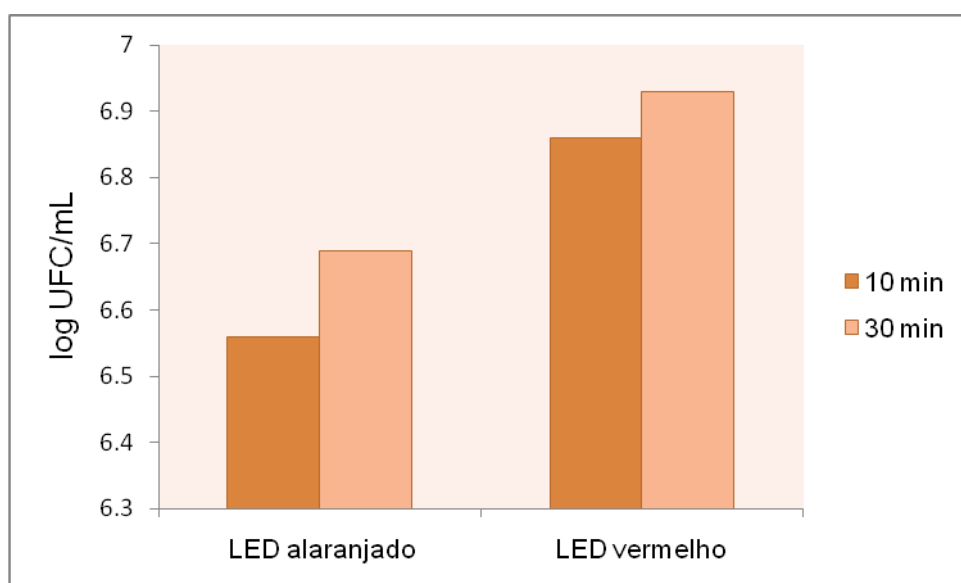


Figura 70 - Efeito da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ para a bactéria *Escherichia coli* em sistema de LED alaranjado e vermelho.

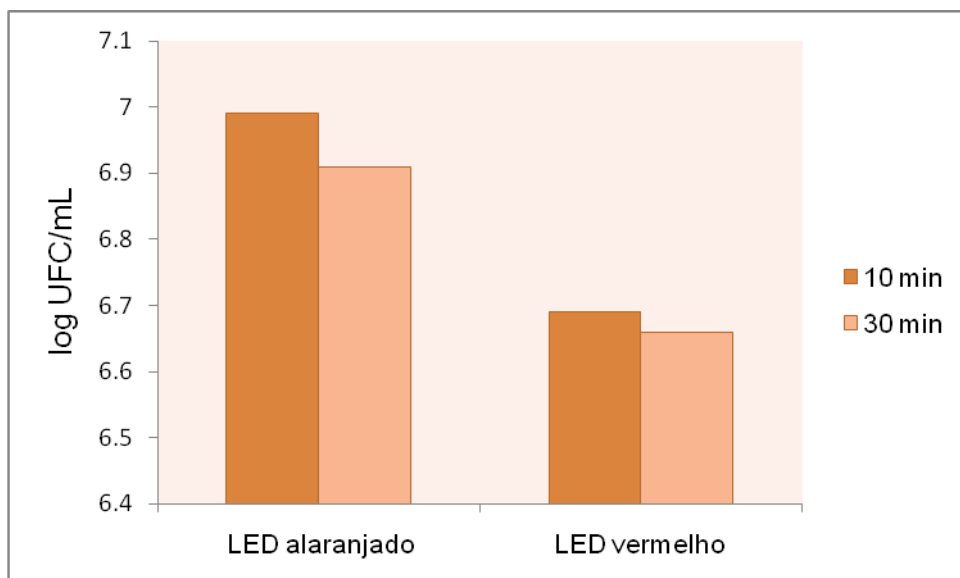


Figura 71 - Efeito da zinco porfirina $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ para a bactéria *Staphylococcus aureus* em sistema de LED alaranjado e vermelho.

Analisando-se os dados das Tabelas 6 e 7 e, comparando-se aos gráficos das Figuras 66 e 69, é possível concluir que a ação fotodinâmica para *Candida albicans* independe do sistema de LED utilizado para ambos os compostos.

A Figura 72 apresenta um exemplo do resultado obtido com sistema de LED alaranjado na presença de solução de porfirina para ambas as porfirinas.

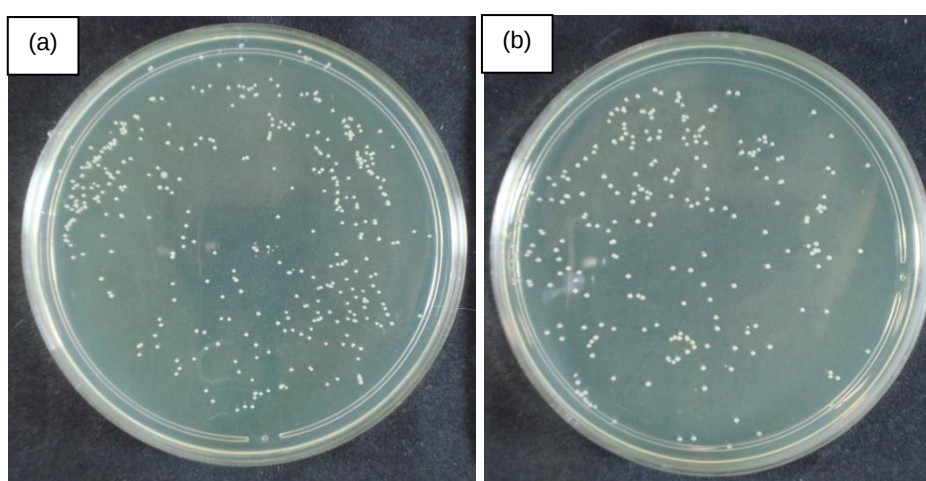


Figura 72 – Unidades formadoras de colônia de *Candida albicans* na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED alaranjado.

As Figuras 73 e 74 apresentam exemplos dos resultados obtidos com sistemas de LED alaranjado e vermelho na presença de solução de ambos os compostos.

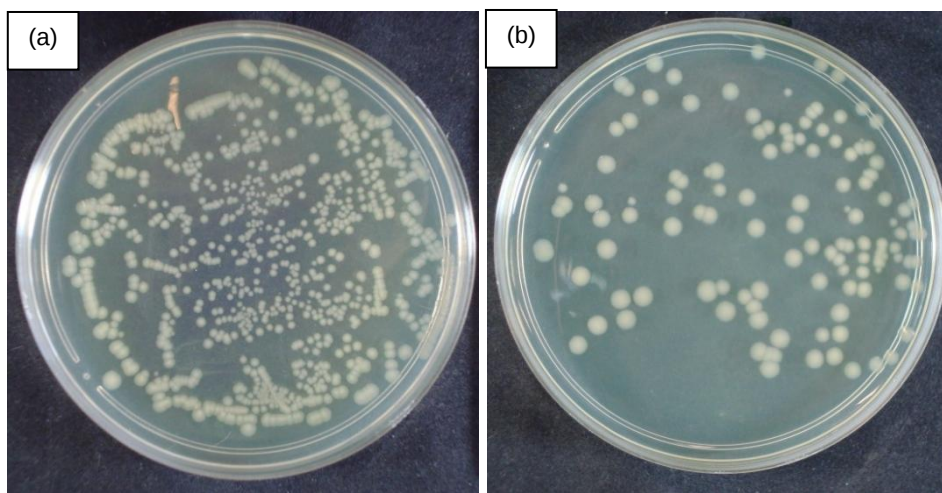


Figura 73 – Unidades formadoras de colônia de *Escherichia coli* na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED alaranjado.

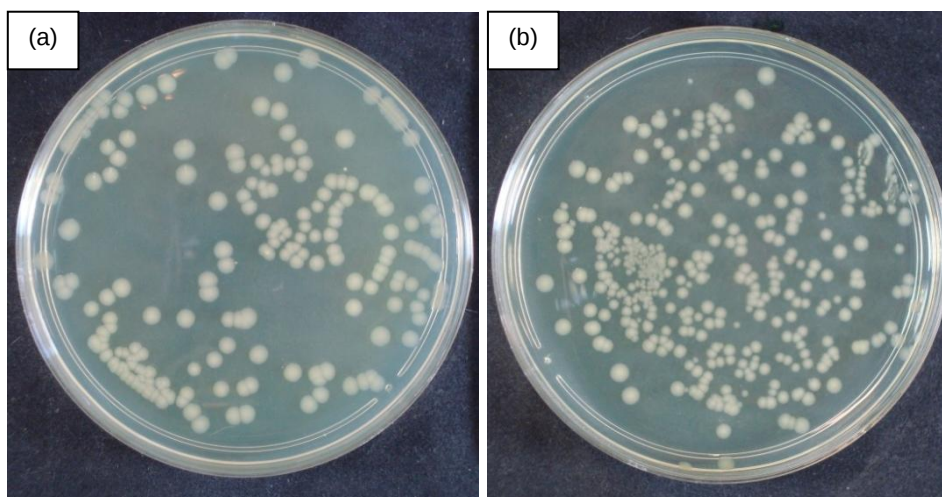


Figura 74 – Unidades formadoras de colônia de *Escherichia coli* na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED vermelho.

A Figura 75 apresenta um exemplo do resultado obtido com sistema de LED alaranjado na presença de solução para ambos os compostos.

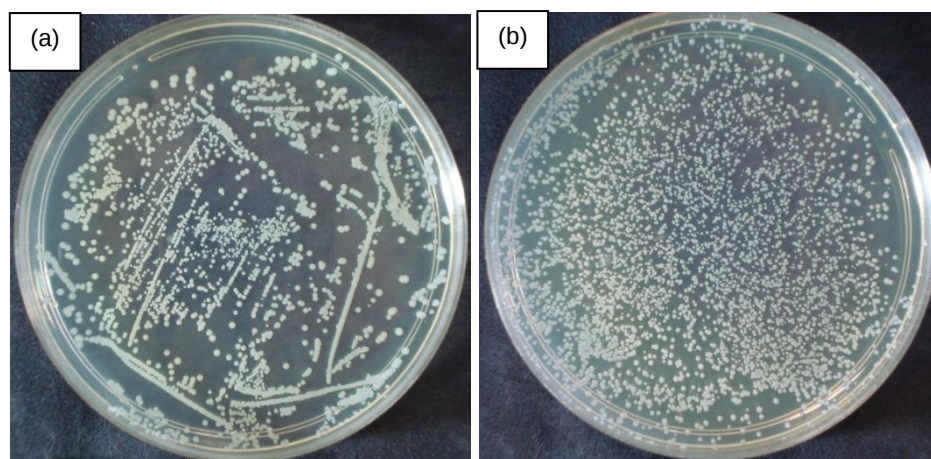


Figura 75 – Unidades formadoras de colônia de *Staphylococcus aureus* na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED alaranjado.

A Figura 76 apresenta um exemplo do resultado obtido com sistema de LED vermelho na presença de solução de ambos os compostos.

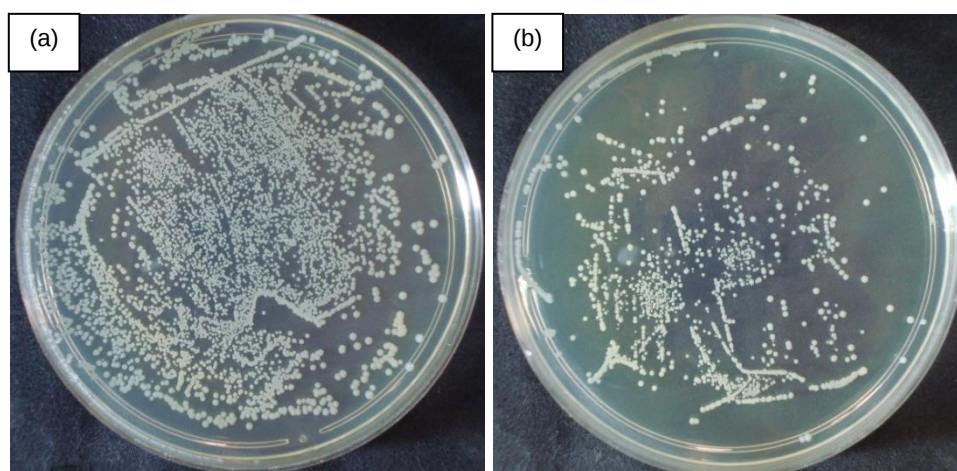


Figura 76 – Unidades formadoras de colônia de *Staphylococcus aureus* na presença de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ (a) e na presença de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ (b) e iluminação de 30 min em sistema de LED vermelho.

Comparou-se esse estudo com o estudo realizado por Domareski com o composto $\text{Zn}(\text{TPPS}_4)$ e a bactéria *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos mostram que esse composto apresenta ação com os dois sistemas de LED utilizados. Com relação ao efeito do tempo de iluminação os resultados com os dois

sistemas de LED nos tempos de 10 e 30 minutos de iluminação são muito semelhantes, não foi observada uma resposta linear com relação ao tempo de iluminação para o LED alaranjado (DOMARESKI, 2009).

Comparou-se também com o estudo realizado por Mendes nas mesmas condições experimentais, Mendes observou a mortalidade da bactéria *Escherichia coli* quando exposta à luz vermelha e a luz azul na presença das porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ em concentração próxima a 1,0 µmol/L. A porfirina TMPyP apresentou melhores resultados frente a ZnTPPS₄. A ação fotodinâmica foi mais eficiente com a combinação de porfirina catiônica TMPyP e luz vermelha, com tempo de iluminação de 30 minutos, levando a uma maior inibição do crescimento bacteriano. Nesse estudo concluiu-se que esse resultado se deve à maior capacidade da porfirina TMPyP em gerar oxigênio singlete, sob as mesmas condições citadas, em relação a porfirina ZnTPPS₄ (MENDES, 2008).

5 CONCLUSÕES

Os compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ não apresentaram fotodegradação quando analisados frente aos diferentes sistemas de iluminação com LED, sendo portanto estáveis sob as condições de iluminação utilizadas.

Os resultados dos experimentos realizados em misturas água/etanol indicaram que não ocorreu formação de agregados para os compostos nas condições analisadas.

Nos testes de ácido úrico, observou-se que os compostos geraram oxigênio singlete, e que a zinco porfirina apresentou uma maior eficiência na geração da espécie reativa.

Através da análise dos resultados obtidos nos testes com *Artemia salina* conclui-se que para os dois compostos e para os três sistemas de LED a maior percentagem de mortalidade ocorreu nos testes com associação do composto e irradiação, indicando a atividade fotodinâmica dos sistemas utilizados.

Os resultados dos testes para avaliar a atividade fotodinâmica dos compostos na inativação de micro-organismos mostraram que os menores valores de UFC foram observados para os sistemas com associação dos compostos e iluminação, observando-se inativação fotodinâmica dos compostos sobre micro-organismos estudados.

Portanto, os resultados obtidos demonstraram que os compostos analisados apresentam potencial para serem utilizados em Terapia Fotodinâmica, e estimulam a realização de estudos complementares.

REFERÊNCIAS

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The history of photodetection and photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.74, n.5, p.656 - 669, 2001.

ADLER, A. D.; LONGO, F. R.; KAMPAS, F. KIM, F. J. Photoinduced electron transfer from porphyrin to C₆₀ in a C₆₀/porphyrin double-layer photoelectrochemical cell. **Inorganic and Nuclear Chemistry**, v.32, p. 2443, 1970.

AGGARWAL, L.P.F.; BORISSEVITCH, I.E. On the dynamics of the TPPS₄ agregation in aqueous solutions successive formation of H and J aggregates. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.63, p.227-233, 2006.

AVELINE, B. M.; HASAN, T.; REDMOND, R.W. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.5, n.2, p.161-163, 1995.

BARROW, G. M. **Introduction to Molecular Spectroscopy**. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1962.

BONNETT, R. Chemical aspects of photodynamic therapy. **London: Gordon and Breach Science Publishers**, p.305, 2000.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews Articles**, v. 24, 19 – 33, 1995.

BORGES, C.P.F. **Estudos espectroscópicos da interação de derivados de dipiridamol com sistemas biofísicos**. 1994. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1994.

BYRNE, C.J.; MARSHALLSAY, L.V.; WARD, A.D. The composition o Photofrin II. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.6, n.1-2, p.13-27, 1990.

CARLOS, M.R; A aplicação da fotoquímica inorgânica nas diversas áreas da ciência. **Química Nova**, São Paulo, v.30 n. 7, p.36-47, 2007.

COZZINI, P.; FORNABAIO, M.; MARABOTTI, A.; ABRAHAM, D.J.; KELLOGG, G.E.; MOZZARELLI, A. Simple, intuitive calculations of free energy of binding for proteinligand complexes. Models without explicit constrained water. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.2469-2483, 2002.

DaCOSTA,R.S.;ANDERSON,H.;WILSON,B.C. Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.78, n.4, p.384-392, 2003.

DEDA,D.K.; IMASATO,H.;TOMINAGA,T.T. Estudos espectroscópicos da interação da porfirina aniônica meso-tetrakis (p-fenilsulfonato) com albumina de soro bovino. In: **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**, Florianópolis, 2006.

DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell- photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.34, p. 2329-2335, 2005.

DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G.; XIE, L. Y.; Polyhaloporphyrins: Unusual ligands for metals and metal-catalyzed oxidations. **Accounts of Chemical Research**, v.30, p.251-259 ,1997.

DOMARESKI, J. **Caracterização espectroscópica e ensaios químico – biológicos de H₂(TNBPyP) e Zn(TPPS₄) visando utilização em Terapia Fotodinâmica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

DOVIDAUSKAS S. **Química supramolecular de porfirino-clusters**.2001.Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo,São Paulo, 2001.

ENGELMANN,F.M. **Derivados porfirínicos como fotossensibilizadores para Terapia Fotodinâmica**. 2005. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

ENGELMANN,F.M.;MAYER,I.;GABRIELLI,D.S.;TOMA,H.E.;KOWALTOWSKI,A.J.;ARAKI,K.;BAPTISTA,M.S.Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes,mitochondria and erythrocytes.Journal of Bioenergetics and Biomembranes, **Journal of Medicinal Chemistry** ,v.39, p.175-185, 2007.

ESSIAS, L.R.R. **Complexos modelo para hemoproteínas respiratórias: N-alquilpiridilporfirinas**. 1986. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo,1986.

FALK, J.E. **Comprehensive Biochemistry**. Elsevier Publishing Company. 9. ed. Amsterdam, 1963, p. 3.

FERNANDES, A.U. **Síntese, caracterização e fotoatividade de fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX e de clorofilina**. 2007. Tese

(Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

FREITAS, I.G.F. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v.11, p.3-30, 1991.

FRIEDERMANN, G.R. **Estudo de porfirinas base livre e seus derivados de manganês por eletroquímica e espectroeletroquímica de RPE e UV-Vís.** 2005. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

GANDINI, S.C.M.; ITRI, R.; NETO, D.S.; TABAK, M. porphyrin effects on zwitterionic HPS micelles as investigated by small – Angle X – ray scattering (SAXS) and electron paramagnetic resonance (EPR). **Journal of Physical Chemistry**, v. 109, n. 47, p. 264-272. 2005.

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

GEORGAKOUD, I.; JACOBSON, B.C.; MULLER, M.G.; SHEETS, E.E.; BADIZADEGAN, K.; CARRLOCKE, D.L.; CRUM, C.P.; BOONE, C.W.; DASARI, R.R.; DAM, J.V.; FELD, M.S. NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. **Cancer**, v.62, p.682-687, 2003.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, p.227-234, 2005.

GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v.6, p.138-163, 1961.

HADJUR C.; RICHARD M.J.; PARAT M.O.; FAVIER A.; JARDON P. Photodynamically induced cytotoxicity of hypericin dye on human fibroblast cell line MRC5. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 27, p.139-146, 1995.

HALMA, M. **Síntese e caracterização de ferroporfirinas imobilizadas em hidróxidos duplos lamelares: estudo de diferentes estratégias de imobilização**

e investigação da atividade catalítica. 2004. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

HAUSMANN,W.H. Die sensibilisierende Wirkung des Hamatoporphyrins. **Biochemische Zeitschrift**, v.30, p.276-316, 1910.

HILL,R.P. **The basic science of oncology.** In: Health Professions Division. Ed.Mc Graw-Hill, 1992. p.271.

HUTENER,C.A.;SANDERS,J.K.M. The nature of $\pi \rightarrow \pi$ interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v.112, p.5525-5534, 1990.

ITRI, R. Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações. In: Encontro Fotodinâmica do Câncer (*PDT*), 2002. **Livro de Resumos do Encontro Fotodinâmica do Câncer (PDT)**, São Pedro, São Paulo, 2002.

JAMNIK,S.; SANTORO,I.L.;UEHARA,C.;SILVA,V.V. Estudo comparativo de fatores prognósticos em portadores de carcinoma não-pequenas células de pulmão: sobrevida superior a cinco anos e inferior a um ano. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n.1, p.6-15, 2009.

KADISH, K.M.; MAIYA,G.B.; ARAULLO, C.; GUILARD,R. Micellar effects o the aggregation of tetraanionic porphyrins. spectroscopic characterization of free-Base meso- tetrakis- (4-sulfonatophenyl) porphyrin (TPPS) H_2 and (TPPS)M (M= Zn(II); Cu(II), VO 2^+) in aqueous micellar media. **Journal of Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 14, p.2725-2731, 1989.

KAIM, W.;SCHWEDERSKI, B. **Inorganic Elements in the Chemistry of Life** Bioinorganic Chemistry., ed. Wiley, 1994.

KASHA,M.;RAWLS,H.R. The excition model in molecular spectroscopy. **Pure and Applied Chemistry**, v.11, p.371-392, 1965.

KESSEL, D.;LUO,Y.; DENG, Y.; C. K. CHANG. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, n. 65, p.422–426, 1995.

KOOLMAN, J; ROEHM, K.H. **Color Atlas of Biochemistry.** New York: Thieme, 2005.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy.** New York – London Plenum Press, 1986.

LIEGEL, R.M. **Aspectos da sensibilização em Terapia Fotodinâmica:** avaliação das propriedades fotofísicas de metaloporfirinas catiônicas em meio homogêneo e

micro-heterogêneo. 2002. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LIMA, J.M.; SILVA, C.A.; ROSA, M.B.; SANTOS, J.B.; OLIVEIRA, T.G.; SILVA, M.B. Prospecção fitoquímica de sonchus oleraceus e sua toxicidade sobre o microcrustáceo Artemia salina. **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. **AMA, Archives of Dermatology**, v.82, p.508-516, 1960.

LIPSON, R.L.; BALDES, E.J.; OLSEN, A.M. The use of an derivative of hematoporphyrin intumor. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.42, p.623-629, 1961.

LIPSON, R.L.; GRAY, M.J.; BALDES, E.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. In: INTERNATIONAL CANCER CONGRESS. 9. Tokyo: **Proceedings**, 1966. p.393.

MACHADO, A.E.H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p.236-238, 2000.

MACRAE, W. D.; HUDSON, J. B. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 143, 1988.

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. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.15, p.708-713, 2004.

MANG, T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.1, p. 43-48, 2004.

MARTINEZ, N.S. Avaliação de células neoplásicas após Terapia Fotodinâmica. Arquivos Catarinenses de Medicina, v.36, n.1, 2007.

MENDES, M. **Estudo das propriedades das porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ para potencial de aplicação em Terapia Fotodinâmica**. 2008. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2007.

MENEZES, P.F.C. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do photogem fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser**. 2006.

Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, São Paulo, 2006.

MILGROM, L.R. **The colours of life – an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds**. New York – Tokyo: Oxford University Press, 1997.

MONTANARI, F. Biomimetic oxygenations catalyzed by metalloporphyrins and metallophorphinoids bearing co-catalytic functions. **Pure and Applied Chemistry**, v.66, p.1519-1526, 1994.

MULLER, M.G.; VALDEZ, T.A.; GEORGAKOUDI, I.; BACKMAN, V.; FUENTES, C.; KABAN I, S.; LAVER, N.; WANG, Z.; BOONE, C.W.; DASARI, R.R.; SHAPSHAY, S.M.; FELD, M.S. Spectroscopic detection and evaluation of morphologic and biochemical changes in early human oral carcinoma. **Revista Cancer**, v.97, n.7, p.1681-1692, 2003.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; RODWELL, V.W. **Harper's Illustrated Biochemistry**. Toronto: McGraw-Hill Medical, 2003.

OHWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. v. 3. Rio de Janeiro: Livros Técnicos Científicos S.A, 1974.

PAULA, J. C.; WALTERS, V. A. Electronic structure of triplet states of zinc (II) tetraphenylporphyrins. **Journal of Physical, Chemical**, v.99, p. 1166-1171, 1995.

PARKER, C.A. **Photoluminescence of Solutions**. Elsevier, Amsterdam, 1968.

PELEGRINO, A.C. **Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos de porfirinas e ftalocianinas derivadas de éter de coroa**. 2006. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 2007.

PELLOSI, D. S.; BATISTELA V. R.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. Proposta metodológica para quantificar atividade fotodinâmica química de fotossensibilizadores irradiados por luz policromática. In: XVI Encontro de Química da Região Sul, 2008, Blumenau, **Anais e XVI Encontro de Química da Região Sul**, 2008.

PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de micro-organismos. **Química Nova**, v. 30, n.4, p.988-994, 2007.

PHILLIPS J.N.; M. Forkin.; Stotz.E. H. **Comprehensive Biochemistry**. Elsevier Publishing Company, v.9, p.34, 1963.

RAMANUJAM, N. Fluorescence spectroscopy in vivo. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, 2000. p.20-56.

ROBERTS, D.J.; CAIRNDUFF, F. Photodynamic therapy of primary skin cancer. **British Journal of Plastic Surgery**, v.48, p.360-370, 1995.

ROVERS, J P.; SAARNAK, A E.; MOLINA, A.; SCHUITMAKER, J J.; STERENBORG, H J C M.; TERPSTRA, O T. Effective treatment of liver metastases with photodynamic therapy, using the second-generation photosensitizer meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC), in a rat model. **British Journal of Cancer**, v.81, p.600-608, 1999.

SIMPLICIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos, **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 801-805, 2002.

SKOOG, D.A.; HOLLER, J.F.; CROUCH, S. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SOARES, D. **Estudo da interação entre porfirina e eumelanina sintética**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SOARES, R.R.S. **Estudo de propriedades da clorofila a e da feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

STENBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v.54, n.17, p.4151-4202, 1998.

STERENBORG, H.J.C.M.; SAARNAK, A.E.; FRANK, R.; MOTAMED, M. Evaluation of spectral correction techniques for fluorescence measurements on pigmented lesions in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.35, p.159-165, 1996.

TESSARO, A.L.; FERNANDES, D.M.; TEREZO, A.J.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.32, 2006.

TURRO, N. J.; BALZANI, V.; SCANDOLA, F. Modern molecular photochemistry, benjamin/cummings. **Supramolecular Photochemistry**, Ellis-Horwood, Chichester, California, 1978.

UENO, M.; JORGE, A.O.C. Cocos gram-positivos. In: **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: ed. Santos, 2006. p. 65-84.

VAN WINKELHOFF, A.J.; RAMS, T.E.; SLOTS, J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. **Periodontology** 2000, v. 10, p.45-78, 1996.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.42, p.13-28, 1998.

WILSON, M.; DOBSON J.; SARKAR S. Sensitization of Periodontopathogenic bacteria to killing by light from a low- power laser. **Oral Microbiology and Immunology**, v.32, p.182-187, Munksgaard, 1993.