

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

ARIANA RODRIGUES ANTONANGELO

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA DE SISTEMAS QUE ASSOCIAM
DERIVADOS PORFIRÍNICOS E LED VISANDO APLICAÇÃO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA

PONTA GROSSA
2012

ARIANA RODRIGUES ANTONANGELO

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA DE SISTEMAS QUE ASSOCIAM
DERIVADOS PORFIRÍNICOS E LED VISANDO APLICAÇÃO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA

Dissertação apresentada para a obtenção
do título de Mestre em Química Aplicada no
Programa de Pós-Graduação em Química
Aplicada da Universidade Estadual de
Ponta Grossa.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Christiane Philippini
Ferreira Borges.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima
Padilha de Paula.

PONTA GROSSA
2012

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

A634a Antonangelo, Ariana Rodrigues
Avaliação da eficiência fotodinâmica de sistemas que associam derivados porfirínicos e LED visando aplicação em terapia fotodinâmica / Ariana Rodrigues Antonangelo. Ponta Grossa, 2012. 121f.
Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa .
Orientadora : Profa. Dra. Christiane Philippini Ferreira Borges
Coorientadora : Profa. Dra. Josiane de Fátima Padilha de Paula
1.Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana. 2. Derivados porfirínicos. 3. Na₄[H₂(TDFSPP)], 4. Na₄[Zn(TDFSPP)]. 5. LED. 6. *Staphylococcus aureus*. I. Borges, Christiane Philippini Ferreira. II. Paula, Josiane de Fátima Padilha de. III.T.

CDD: 547

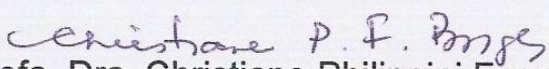
TERMO DE APROVAÇÃO

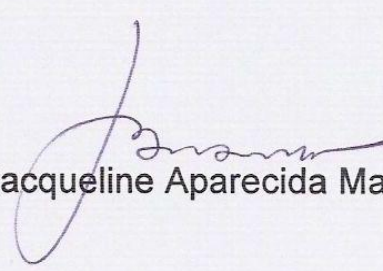
ARIANA RODRIGUES ANTONANGELO

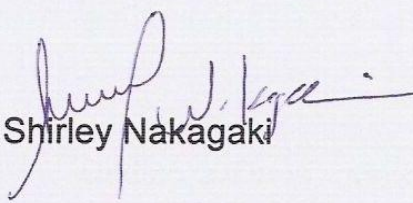
**"AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA FOTODINÂMICA DE SISTEMAS
QUE ASSOCIAM DERIVADOS PORFIRÍNICOS E LED VISANDO
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA."**

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

Orientadora:


Profa. Dra. Christiane Philippini Ferreira Borges
UEPG/PR


Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Marques
UEPG/PR


Profa. Dra. Shirley Nakagaki
UFPR/PR

Ponta Grossa, 06 de março de 2012.

Dedico a Deus, que está sempre ao meu lado, me dando coragem e sabedoria. Ao meu pai Albertino e a minha querida irmã Amanda.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida, por sempre estar ao meu lado, me guiando, iluminando e protegendo.

Aos meus pais, Albertino e Sandra, pela educação, pelos valores ensinados e incentivos aos estudos. Obrigada pelo amor e carinho que sempre me dedicaram. Agradeço, em especial, ao meu pai Albertino pelas orações e pelo apoio incondicional durante esses anos.

A minha irmã Amanda, por sua amizade, seu apoio, seus conselhos e por seu amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado Jean, pelo apoio, compreensão e carinho.

As minhas amigas do grupo de pesquisa, Emanuely Nascimento, Rosana Balzer, Larissa Schmidt, Camila Furtado, Priscila Colesel, Ana Paula Prestes e Bruna Mariana Tartari, pela ajuda e carinho.

As minhas queridas amigas, Suélen Crevelim, Laura Trevisan, Renata Olegário, Emanuely Nascimento, Ivelise Guimarães, Simone Sabino e Jakeline Antonangelo, pela amizade, pelos ótimos momentos, por me apoiarem e me ajudarem sempre. Cada uma de vocês tem um lugar especial em meu coração.

Aos meus colegas de laboratório, Éder Souza, Michael Favoreto, Renata Guimarães e Taísa Tozetto, pela colaboração e carinho.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Christiane P. F. Borges e a minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Josiane F. P. de Paula, pelos ensinamentos, amizade, incentivo e dedicação. Vocês foram fundamentais para meu crescimento profissional, sou extremamente grata.

A Prof.^a Dr.^a Shirley Nakagaki, por fornecer os compostos para realização desta pesquisa.

A Prof.^a Dr.^a Jacqueline Marques, pela ajuda com o programa para desenhar as estruturas apresentadas neste trabalho.

Ao Prof.^o Dr.^o Noboru Hioka e seus alunos, que ajudaram para o entendimento de uma das técnicas empregadas neste trabalho.

Ao Prof.^o Dr.^o Gerson Kniphoff e seus alunos, pela ajuda na determinação da potência dos dispositivos de LED.

Aos órgãos de fomento, Capes (DS), Capes/Pró-equipamento, Capes/PROAP e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram e contribuíram para realização desta pesquisa.

RESUMO

A crescente resistência de bactérias patogênicas a antibióticos levou ao desenvolvimento de novas alternativas que possam substituí-los. Uma das alternativas investigadas atualmente é a quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT). Várias associações entre fotossensibilizadores (FS) e fontes de luz são utilizadas para inativar diferentes micro-organismos, comprovando a eficiência dessa terapia. Os derivados porfirínicos apresentam características interessantes para aplicação em PACT e estão entre os compostos mais investigados, apresentando resultados promissores. O uso de LED como fonte de luz apresenta vantagens, uma vez que esse dispositivo tem mostrado bons resultados na eliminação de bactérias e é economicamente mais viável. Assim, no presente estudo, investigou-se a atividade fotodinâmica de diferentes sistemas derivados porfirínicos/LEDs para possível aplicação em PACT. Para isso, utilizou-se os seguintes derivados porfirínicos: 5,10,15,20-tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil) porfirinato de sódio, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, 5,10,15,20-tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil) zinco (II) porfirinato de sódio, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, e 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatofenil) manganês (III) porfirinato de sódio, $\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]$. A irradiação dos compostos foi feita utilizando-se sistemas de LED com diferentes faixas de emissão: alaranjado, vermelho, verde e azul. A atividade fotodinâmica dos sistemas FS/LED foi avaliada por meio dos testes de fotobranqueamento, foto-oxidação da proteína BSA, ácido úrico e de ensaio microbiológico, utilizando-se a bactéria *Staphylococcus aureus* de origem ATCC e hospitalar. Os resultados mostraram que os derivados porfirínicos não sofreram fotobranqueamento quando associados aos diferentes LEDs. Os sistemas FS/LED levaram à oxidação da proteína BSA e à degradação da molécula de ácido úrico, exceto para o derivado $\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]$. As constantes de foto-oxidação obtidas para os sistemas $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ verde e azul; $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ verde e azul, ficaram próximas aos valores obtidos para fármacos com aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD). Os resultados do teste do ácido úrico para esses mesmos sistemas indicaram que eles são capazes de gerar oxigênio singlete. O sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ azul apresentou maior atividade fotodinâmica sobre as cepas de *S. aureus* ATCC e hospitalar. Assim, os resultados demonstram que os sistemas investigados apresentam potencial para aplicação em TFD e PACT.

Palavras chave: Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana, derivados porfirínicos, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, LED, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The increasing pathogenic bacteria resistance to antibiotics has led to the development of new alternatives to replace them. The Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) is one of the alternatives recently researched. Several associations between photosensitizer (PS) and light sources are used to inactivate different micro-organisms. The porphyrin derivatives have interesting features and are amongst the most investigated compounds in PACT, showing promising results. The light-emitting diode (LED) source presents advantages, since this device has been shown efficient against bacteria and is economically feasible. The present study investigated the photodynamic activity of different porphyrin derivatives/LED systems for application in PACT. The following porphyrin derivatives were used: 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluor-5-sulfonatophenyl) sodium porphyrinate, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, 5,10,15,20-tetrakis(2,6-difluor-5-sulfonatophenyl) zinc (II) sodium porphyrinate, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ and 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl) manganese (III) sodium porphyrinate, $\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]$. LED systems were used in different emission bands: orange, red, green and blue. The photodynamic activity of PS/LED systems were analyzed through the photobleaching test, photooxidation of bovine serum albumin (BSA) protein, uric acid and microbiological assay with ATCC and hospital *Staphylococcus aureus* strains. The results showed no significant photobleaching of porphyrin derivatives using LED as a light source. The PS/LED systems led to oxidation of the BSA protein and uric acid, except for the derivative $\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]$. The photooxidation constant rate for $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ /green and blue LED, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ /green and blue LED systems, were close to the constant rate for drugs with application in photodynamic therapy (PDT). The uric acid test result indicated that compounds are capable of generating singlet oxygen. The $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ /blue LED system had a higher photodynamic activity against ATCC and hospital *S. aureus* strains. The results demonstrated that the systems under study present potential to be used in PDT and PACT.

Key words: Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy, porphyrin derivatives, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, LED, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Absorção de luz por cromóforos presentes no tecido, onde (- - -) água, (· · · · ·) hemoglobina - H_2O , (—) Oxiemoglobina - O_2 e (-----) melanina (PLAETZER et al., 2009).	22
Figura 1.2 - Representação esquemática da dependência do grau de penetração de luz em um tecido em função do comprimento de onda (STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998).	23
Figura 1.3 - Estrutura do psoraleno.	24
Figura 1.4 - Estrutura do alaranjado de acridina.	24
Figura 1.5 - Estrutura do corante Eosina Y.	25
Figura 1.6 - Estrutura da hematoporfirina.	26
Figura 1.7 - Estrutura do agente terapêutico Photofrin® na forma de éter.	27
Figura 1.8 - Biossíntese da PpIX (JOSEFSEN; BOYLE, 2008).	28
Figura 1.9 - Reações (Tipo I e II) de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio no estado fundamental O_2 ($^3\Sigma_g^-$).	30
Figura 1.10 -Diagrama de orbital molecular mostrando a distribuição eletrônica do oxigênio triplete, O_2 ($^3\Sigma_g^-$), e do oxigênio singlete, 1O_2 ($^1\Delta_g$) (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001)	31
Figura 1.11 - Fontes, reações e alvos do 1O_2 ($^1\Delta_g$) (RONSEIN et al., 2006).	34
Figura 1.12 -Estruturas básicas das (a) porfirinas e (b) metaloporfirinas, M = íon metálico.	36
Figura 1.13 - Sistema de numeração do macrociclo, segundo a IUPAC.	37
Figura 1.14 -Estrutura do macrociclo porfirínico (a), da clorina (b) e da bacterioclorina (c).	38
Figura 1.15 -Exemplos de porfirinas classificadas como (a) primeira geração, (b) segunda geração e (c) terceira geração.	39
Figura 1.16 - Tipos de transições eletrônicas.	40
Figura 1.17 -Níveis de energia para as transições eletrônicas proposto por Gouterman (GOUTERMAN, 1961).	41
Figura 1.18 -Espectros de absorção no UV-Vis de $[H_2(TMPyP)]^{4+}$ (-----) e da $[Mn(TMPyP)]^{5+}$ (—) em água, (a) banda Soret, (b) bandas Q.	42

Figura 1.19 - Comprimento de onda das bandas de absorção de porfirinas base livre e penetração da luz na pele humana (SAKAMOTO; TOREZAN; ANDERSON, 2010).....	44
Figura 1.20 - (a) Bactérias Gram-positivas; (b) bactérias Gram-negativas.....	46
Figura 1.21 -Diagramas ilustrando as diferenças estruturais da parede celular bacteriana de (a) Gram-positiva, (b) Gram-negativa (HAMBLIN; HASAN, 2004).....	47
Figura 1.22- Ciclo de vida da <i>Artemia salina</i> (http://aquaflash.blogspot.com/2009/03/32-artemia-alimento-vivo-o-mascota.html).....	51
Figura 1.23 -Previsão de consumo de $^1\text{O}_2$ por alvos intracelulares (DAVIES, 2003).	53
Figura 1.24 - Seletividade do metil aminolevulínico no tumor. (a) O padrão de fluorescência induzida por metil aminolevulínico é claramente limitado ao tecido tumoral; (b) quando comparado com o contorno do tumor, visto sob luz branca (BROWN et al., 2004).	56
Figura 3.1 - Estrutura dos derivados porfirínicos (a) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e (b) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$	59
Figura 3.2 - Estrutura do derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$	59
Figura 3.3 - Sistema de LED utilizados: alaranjado, vermelho, verde e azul.....	60
Figura 3.4 - Aparato utilizado para iluminação das soluções.	60
Figura 4.1 - Espectros de absorção no UV-Vis dos derivados porfirínicos (—) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, (——) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ e (-----) $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, $[\text{FS}] \approx 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em PBS e espectros expandidos na faixa das bandas Q.	69
Figura 4.2 - (a) Espectros de absorção no UV-Vis do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ em PBS e espectros expandidos na faixa das bandas Q em diferentes concentrações, (b) Gráfico da variação da absorbância em 408 nm versus a concentração de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$	70
Figura 4.3 - Espectros de emissão normalizados dos sistemas de LED utilizados. ..	72
Figura 4.4 - Espectros de absorção no UV-Vis do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS irradiado com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos, as setas indicam o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de cada sistema de LED utilizado.....	73
Figura 4.5 - Espectros de absorção no UV-Vis do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS irradiado com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos, as setas indicam o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de cada sistema de LED utilizado.....	74

- Figura 4.6 - Espectros de absorção no UV-Vis do derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS irradiado com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos, as setas indicam o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de cada sistema de LED utilizado.....75
- Figura 4.7 - Mecanismo de fotobranqueamento de complexos metálicos de *meso*-tetrafenilporfirina (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001).76
- Figura 4.8 - Espectro de absorção ($\lambda_{\text{máx}} = 279 \text{ nm}$) (—) e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{máx}} = 345 \text{ nm}$) (-----) de solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS.78
- Figura 4.9 - Espectros de emissão de fluorescência da solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS na presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiada com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos [$\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$].79
- Figura 4.10 - Espectros de emissão de fluorescência da solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS na presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiada com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos [$\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$].80
- Figura 4.11- Espectros de emissão de fluorescência da solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS na presença do derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiada com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos [$\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$].81
- Figura 4.12 - Gráfico $\ln(F/F_0)$ versus o tempo de iluminação para a solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{máx}} = 345 \text{ nm}$) na presença dos derivados porfirínicos (a) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e (b) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ irradiada com os sistemas de LED.82
- Figura 4.13 - Gráfico $\ln(F/F_0)$ versus o tempo de iluminação para a solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{máx}} = 345 \text{ nm}$) na presença dos derivados porfirínicos (a) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e (b) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$, corrigido pelos valores das absorbâncias dos compostos no comprimento de onda máximo de emissão do LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 513 \text{ nm}$) e do LED azul ($\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$).84
- Figura 4.14 - Reação de cicloadição entre o $^1\text{O}_2$ e o triptofano (RIBEIRO et al., 2007).85
- Figura 4.15 -Espectros de absorção no UV-Vis dos derivados porfirínicos (—) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, (—) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ e (-----) $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, $[\text{FS}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, na presença de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS.86
- Figura 4.16 -Foto-oxidação do ácido úrico via oxigênio singlete (MAESTRIN et al., 2004).87
- Figura 4.17 - Espectro de absorção no UV-Vis da solução de ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS.88

- Figura 4.18 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde durante 60 min.89
- Figura 4.19 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde, durante 60 min.90
- Figura 4.20 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde, durante 60 min e espectro expandido da banda do AU.90
- Figura 4.21 - Sobreposição espectral dos derivados porfirínicos (a) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e (b) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ com os sistemas de LED (—) verde e (—) azul.93
- Figura 4.22 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde, durante 60 min.94
- Figura 4.23 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde, durante 60 min.94
- Figura 4.24 - Média de mortalidade de *Artemia salina* para soluções aquosas de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ em diferentes concentrações durante (*) 3 horas e (•) 24 horas, grupo L-P- (ausência de luz e FS).97
- Figura 4.25 - Média de mortalidade de *Artemia salina* para soluções aquosas de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, em diferentes concentrações, associado aos sistemas de LED azul, vermelho, alaranjado e verde, grupo L+P- (presença de luz e ausência de FS).98
- Figura 4.26 - Média de UFC dos diferentes grupos experimentais para as bactérias (a) *S. aureus* ATCC e (b) *S. aureus* hospitalar, utilizando-se o sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ / LED azul, durante (*) 1 hora e (•) 3 horas de iluminação.100
- Figura 4.27 - Média de UFC dos diferentes grupos experimentais para as bactérias (a) *S. aureus* ATCC e (b) *S. aureus* hospitalar, utilizando-se o sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ / LED azul, durante (*) 1 hora e (•) 3 horas de iluminação.102
- Figura 4.28 - Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônias de *S. aureus* ATCC, (a) Controle ausência de LED e derivado porfirínico (L-P-) (b) presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado com LED azul durante 3 horas (L+P+).103

- Figura 4.29 -Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônias de *S. aureus* hospitalar, (a) Controle ausência de LED e derivado porfirínico (L-P-) (b) presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado com LED azul durante 3 horas (L+P+).....103
- Figura 4.30 -Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônias de *S. aureus* ATCC, (a) Controle ausência de LED e derivado porfirínico (L-P-) (b) presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado com LED azul durante 3 horas (L+P+).....104
- Figura 4.31 -Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônias de *S. aureus* hospitalar, (a) Controle ausência de LED e derivado porfirínico (L-P-) (b) presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado com LED azul durante 3 horas (L+P+).....104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Distribuição eletrônica dos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado excitado singlete, $^1\text{O}_2$ ($^1\Sigma_g^+$ ou $^1\Delta_g$) e estado fundamental triplete O_2 ($^3\Sigma_g^-$) (RONSEIN et al., 2006).....	32
Tabela 1.2 - Característica de um FS ideal (O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009).....	43
Tabela 1.3 - Características espectroscópicas de alguns aminoácidos aromáticos presentes na proteína BSA (SILVA, 2007).....	52
Tabela 4.1 – Absortividade molar (ϵ) e comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) para as bandas de absorção dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ em PBS.	71
Tabela 4.2 – Valores das constantes de velocidade de foto-oxidação da solução de BSA ($\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS, irradiados com LED alaranjado, vermelho, verde e azul durante 60 min, $\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$. Os valores representam a média de três experimentos.	83
Tabela 4.3 - Valores das constantes de velocidade de foto-oxidação da solução de BSA ($\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS, irradiados com LED verde e azul durante 60 min. Correção realizada em função da absorbância dos compostos nos $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão do LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 513 \text{ nm}$) e azul ($\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$). Os valores representam a média de três experimentos.....	84
Tabela 4.4 - Porcentagem de decaimento da banda de absorção do ácido úrico (292 nm) na presença dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS, irradiados com LED verde e azul durante 60 min.	91
Tabela 4.5 - Porcentagem de decaimento da banda de absorção do ácido úrico (292 nm) na presença do derivado porfirínico $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ nas concentrações $1,0$ e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em PBS, irradiados com LED verde e azul durante 60 min.	95
Tabela 4.6 - Média de UFC mL^{-1} das cepas de <i>S. aureus</i> ATCC e hospitalar, obtidas para os diferentes grupos experimentais frente ao sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ /LED azul.	100
Tabela 4.7 - Resultados da análise estatística (ANOVA – Teste de Tukey) para os diversos grupos referente ao sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ /LED azul.....	100

Tabela 4.8 - Média de UFC mL ⁻¹ das cepas de <i>S. aureus</i> ATCC e hospitalar, obtidas para os diferentes grupos experimentais frente ao sistema Na ₄ [Zn(TDFSPP)]/LED azul.....	101
Tabela 4.9 - Resultados da análise estatística (ANOVA – Teste de Tukey) para os diversos grupos referente ao sistema Na ₄ [Zn(TDFSPP)]/LED azul.	101
Tabela 4.10 - Média de UFC mL ⁻¹ das cepas de <i>S. aureus</i> ATCC e hospitalar, obtidas para os diferentes grupos experimentais frente ao sistema Na ₄ [H ₂ (TDFSPP)]/LED verde.....	105
Tabela 4.11 - Resultados da análise estatística (ANOVA – Teste de Tukey) para os diversos grupos referente ao sistema Na ₄ [H ₂ (TDFSPP)]/LED verde. ...	105
Tabela 4.12 - Média de UFC/mL das cepas de <i>S. aureus</i> ATCC e hospitalar, obtidas para os diferentes grupos experimentais frente ao sistema Na ₄ [Zn(TDFSPP)]/LED verde.....	106
Tabela 4.13 - Resultados da análise estatística (ANOVA – Teste de Tukey) para os diversos grupos referente ao sistema Na ₄ [Zn(TDFSPP)]/LED verde...	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϵ	absortividade molar
AM	azul de metileno
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (do termo em inglês: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ALA	ácido δ -aminolevulínico
DNA	ácido desoxirribonucléico
AU	ácido úrico
BSA	albumina de soro bovino (do termo em inglês: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
HSA	albumina de soro humano (do termo em inglês: <i>Human Serum Albumin</i>)
ATCC	do termo em inglês: <i>American Type Culture Collection</i>
Å	angstrom
AF	atividade fotodinâmica
cm	centímetro
NaCl	cloreto de sódio
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda máximo
Cis	cisteína
HpD	derivado de hematoporfirina
LED	diodo emissor de luz (do termo em inglês: <i>light-emitting diode</i>)
E_T	energia do estado triplete
DL ₅₀	dose letal média
EROs	espécies reativas de oxigênio (do termo em inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i> , ROS)
S ₁	estado singlete excitado
S ₀	estado singlete fundamental

T ₁	estado triplete excitado
K ₂ HPO ₄	fosfato de potássio dibásico anidro
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico anidro
FS	fotossensibilizador
¹ FS	fotossensibilizador no estado singlete excitado
⁰ FS	fotossensibilizador no estado singlete fundamental
³ FS	fotossensibilizador no estado triplete excitado
g	gramas
°C	grau Celsius
Hp	hematoporfirina
BHI	infusão de cérebro e coração (do termo em inglês <i>Brain Heart Infusion</i>)
Kcal	kilocaloria
Kg	kilogramas
kJ	kilojoule
HDL	lipoproteína de alta densidade (do termo em inglês: <i>high density lipoprotein</i>)
LDL	lipoproteína de baixa densidade (do termo em inglês: <i>low density lipoprotein</i>)
TPPS μm	<i>meso</i> -tetrakis(<i>p</i> -sulfonatofenil)porfirina micrometro
mg	miligrama
nm	nanômetro
ns	nanosegundos
OEP	octaetilporfirina
LUMO	orbital molecular desocupado de mais baixa energia (do termo em inglês: <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)

HOMO	orbital molecular ocupado de mais alta energia (do termo em inglês: <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
$^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$	oxigênio singlete
$\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$	oxigênio triplete
$[\text{H}_2(\text{TMPyP})]^{4+}$	<i>para</i> -toluenosulfonato de 5, 10, 15, 20 - tetrakis (<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina
PZ	photodithazine®
PF	photofrin®
PG	photogem®
PS	photosan®
pH	potencial hidrogeniônico
Pp IX	protoporfirina IX
PACT	quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (do termo em inglês <i>Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy</i>)
Φ_T	rendimento quântico do estado triplete
Φ_Δ	rendimento quântico de oxigênio singlete
PBS	tampão fosfato salino (do termo em inglês <i>phosphate buffered saline</i>)
τ_T	tempo de vida do estado triplete
TDF	terapia fotodinâmica
TMPP	tetrametilpiridinoporfirina
TAS	teste de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i>
$\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$	5, 10, 15, 20- tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirinato de sódio
$\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$	5, 10, 15, 20- tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil) zinco (II) porfirinato de sódio
<i>meso</i> -THPBC	5, 10, 15, 20 - tetrakis (<i>meso</i> -hidroxifenil)bacterioclorina
<i>meso</i> -THPC	5, 10, 15, 20 - tetrakis (<i>meso</i> -hidroxifenil)clorina

<i>meso</i> -THPP	5, 10, 15, 20 - tetrakis (<i>meso</i> -hidroxifenil)porfirina
[Mn(TMPyP)] ⁵⁺	5, 10, 15, 20 – tetrakis (<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina de manganês (III)
{Na ₄ [Mn(TSPP)]} ⁺	5, 10, 15, 20- tetrakis (4-sulfonatofenil) manganês (III) porfirinato de sódio
Trp	triptofano
UV-Vis	ultravioleta-visível
UFC mL ⁻¹	unidades formadoras de colônias por mL
VOOEP	vanadil octaetilporfirina
$\Delta A_{A.U}$	variação na banda do ácido úrico
V	volts
W	watts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	TERAPIA FOTODINÂMICA - TFD	21
1.2	ASPECTOS HISTÓRICOS DA TFD	24
1.3	PROCESSOS FOTOQUÍMICOS DA TFD	29
1.4	OXIGÊNIO SINGLETE	31
1.5	FONTE DE LUZ NA TFD	35
1.6	PORFIRINAS E METALOPORFIRINAS	36
1.6.1	Nomenclatura	37
1.6.2	Classificação	38
1.6.3	Características espectroscópicas de porfirinas e metaloporfirinas na região do UV-Vis	40
1.6.4	Porfirinas como FS em TFD	42
1.7	QUIMIOTERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (PACT).....	45
1.8	ARTEMIA SALINA	50
1.9	ALBUMINA	52
1.10	TRANSPORTE E LOCALIZAÇÃO DE FS	54
2	OBJETIVOS	58
2.1	OBJETIVO GERAL	58
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
3	MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1	MATERIAL E EQUIPAMENTOS	59
3.2	DETERMINAÇÃO DE ABSORTIVIDADE MOLAR DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS EM TAMPÃO FOSFATO	62
3.3	ANÁLISE DE FOTOBRANQUEAMENTO DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS..	62
3.4	TESTE DE FOTO-OXIDAÇÃO DE BSA	63
3.4.1	Cálculo das constantes de velocidade	63
3.5	AVALIAÇÃO DA FOTO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ÚRICO	65
3.6	ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO	66
3.6.1	Ensaio com <i>Artemia salina</i>	66
3.6.1.1	Incubação	66
3.6.1.2	Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	66
3.6.1.3	Avaliação de atividade fotodinâmica frente à <i>Artemia salina</i>	67
3.6.2	Avaliação de atividade fotodinâmica em cultura de micro-organismos ...	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	DETERMINAÇÃO DA ABSORTIVIDADE MOLAR DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS EM TAMPÃO FOSFATO	69
4.2	ANÁLISE DE FOTOBRANQUEAMENTO DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS..	72
4.3	TESTE DE FOTO-OXIDAÇÃO DE BSA	77

4.4	AVALIAÇÃO DA FOTO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ÚRICO	87
4.5	ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO	96
4.5.1	Ensaio com <i>Artemia salina</i>	96
4.5.2	Avaliação de atividade fotodinâmica em cultura de micro-organismo	98
4.6	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS RESULTADOS	109
5	CONCLUSÃO	110
	REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO

Fotossensibilizadores (FS) são substâncias que se ativam quando são irradiadas com luz de comprimento de onda específico. Essas substâncias absorvem a radiação e geram espécies altamente reativas, levando ao efeito fotodinâmico, que pode ter várias aplicações.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento que emprega a interação entre um FS, luz visível e oxigênio, levando à morte celular. Essa técnica tem se mostrado promissora devido ao sucesso obtido no tratamento de vários tipos de câncer e outras doenças que possuem, como característica, o crescimento acelerado de tecidos (BROWN; BROWN; WALKER, 2004; KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000; MACHADO, 2000; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; WILSON; PATTERSON, 2008). A TFD apresenta vantagens em relação a outras técnicas empregadas no tratamento do câncer (cirurgia, radio e quimioterapia), como a destruição seletiva do tecido doente, causando pouco ou nenhum dano aos tecidos saudáveis, além de apresentar mínimo efeito colateral (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, 2006; PERUSSI, 2007).

O efeito fotodinâmico também pode ser aplicado na inativação de micro-organismos. A eliminação de micro-organismos patogênicos por meio da TFD é denominada Inativação Fotodinâmica (PDI - *Photodynamic Inactivation*), também conhecida como Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT- *Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*). A PACT pode ser uma alternativa útil, evitando o desenvolvimento de resistência microbiana. Dessa maneira, a TFD, inicialmente utilizada para o tratamento de câncer, também pode ser empregada para tratar doenças infecciosas. Além disso, a TFD pode ser aplicada como método diagnóstico, no delineamento de lesões por fluorescência, devido a propriedade de localização preferencial do FS em células de proliferação rápida (BANFI et al., 2006; BROWN; BROWN; WALKER, 2004; DOUGHERTY et al., 1998; HAMBLIN; HASAN, 2004; PERUSSI, 2007; WILSON; PATTERSON, 2008).

As porfirinas são compostos macrociclos, conjugados, que estão presentes em sistemas biológicos. Os derivados porfirínicos são considerados FS interessantes para aplicação em TFD, por apresentarem características favoráveis à técnica, como baixa toxicidade na ausência de luz, fotoestabilidade, propriedade de localização em células de proliferação rápida e absorção espectral próxima a 600

nm, região em que os tecidos biológicos são relativamente transparentes a radiação (NOWIS et al., 2005; TITA; PERUSSI, 2001; TOMINAGA et al., 2004).

1.1 TERAPIA FOTODINÂMICA – TFD

Como já mencionado, a TFD é uma técnica que se baseia na administração de um FS e sua posterior ativação com luz visível, na presença de oxigênio.

Na primeira etapa do processo, o FS é administrado ao paciente, por via tópica, sistêmica ou oral. Depois de um tempo, que pode variar de minutos a dias, o local é irradiado com luz visível ou próximo ao infravermelho. A absorção de luz pelo FS, na presença de oxigênio encontrado nas células, desencadeia reações fotoquímicas gerando Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A produção de EROs provoca uma sequência de eventos oxidativos resultando na morte da célula doente por necrose e/ou apoptose, ou também por danos à vascularidade da célula, resultando na sua morte indireta (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; PERUSSI, 2007; RIBEIRO; SILVA; JORGE, 2004; WILSON; PATTERSON, 2008).

A TFD é considerada como um tratamento de dupla seletividade, que é conseguida por um maior acúmulo do FS em células de proliferação rápida e pelo fato de que a iluminação é direcionada ao tecido afetado (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, 2006; DOUGHERTY et al., 1998; NOWIS et al., 2005).

A eficácia da TFD pode ser afetada por vários fatores, dentre eles estão: a profundidade de penetração de luz no tecido biológico, o comprimento de onda da luz de ativação, as propriedades do FS e a disponibilidade de oxigênio (KOLÁROVA et al., 2003; MACHADO, 2000). A profundidade de penetração de luz no tecido depende de processos como, reflexão, refração, espalhamento e absorção. Dessa forma, a ativação do FS pela luz dependerá das características do tecido, da sua espessura e também do comprimento de onda da luz empregada (NOWIS et al., 2005; PLAETZER et al., 2009).

Cromóforos existentes nos tecidos podem absorver a radiação, interferindo na ativação do FS pela luz, uma vez que competem pelos fótons incidentes. Assim, o espectro de absorção desses cromóforos define a janela óptica da TFD. Os principais cromóforos no tecido são a água, a hemoglobina, a melanina e os citocromos, que possuem máximo de absorção abaixo de 600 nm, como

apresentado na Figura 1.1, o que limita o intervalo terapêutico a esse valor mínimo. O emprego de luz com comprimento de onda acima de 850 nm leva à absorção da energia pelas moléculas de água, sem excitação eletrônica, ocasionando apenas aquecimento do tecido. Além disso, luz acima desse comprimento de onda não possui energia suficiente para levar a uma reação fotoquímica (AGOSTINIS et al., 2011; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, 2006; NOWIS et al., 2005; PLAETZER et al., 2009; WILSON; PATTERSON, 2008). Dessa forma, na região do visível, quanto maior o comprimento de onda, maior o grau de penetração da luz no tecido, como mostra a Figura 1.2.

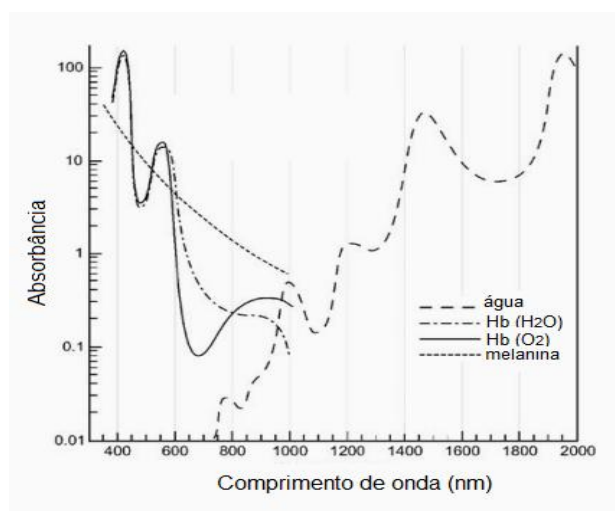


Figura 1.1 - Absorção de luz por cromóforos presentes no tecido, onde (- - -) água, (-·-·-) hemoglobina - H₂O, (—) Oxihemoglobina - O₂ e (----) melanina (PLAETZER et al., 2009).

Para a aplicação clínica de tumores ou lesões internas, a TFD utiliza, geralmente, luz com comprimentos de onda característicos da região espectral do vermelho e infravermelho próximo (600-850 nm), uma vez que nessa região os tecidos são relativamente transparentes à radiação, ou seja, nessa região os cromóforos possuem menor absorvidade molar, permitindo que a luz excite o FS (STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998). Essa faixa de comprimento de onda é conhecida como “janela terapêutica”, e a profundidade de penetração da luz é aproximadamente 10 mm (AGOSTINIS et al., 2011; KALKA; MERK; MUKHTA-R, 2000; NOWIS et al., 2005). Porém, o tratamento de lesões superficiais pode ser realizado utilizando-se radiação de comprimento de onda menor (SAKAMOTO; TOREZAN; ANDERSON, 2010).

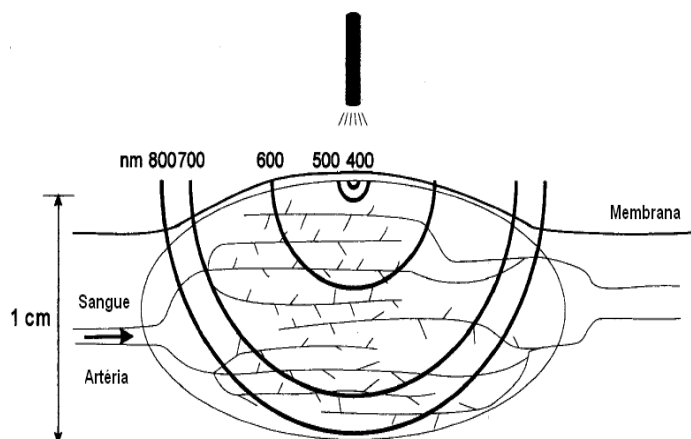


Figura 1.2 - Representação esquemática da dependência do grau de penetração de luz em um tecido em função do comprimento de onda (STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998).

A TFD possui aplicação clínica em várias áreas da saúde, utilizando-se diferentes classes de FS e fontes de luz, podendo ser empregada em combinação com outras técnicas convencionais. Além da aplicação na oncologia, a TFD é empregada no campo da oftalmologia (degeneração macular da retina), dermatologia (psoríase, acne) e odontologia (periodontite) (AGOSTINIS et al., 2011; KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000; STRONG; HAO, 2010; TAO et al., 2009; WILSON; PATTERSON, 2008).

Atualmente, devido ao aumento de resistência bacteriana a antibióticos, a TFD vem sendo bastante estudada *in vitro* para inativação microbiana (PACT), podendo ser, por exemplo, aplicada para o tratamento de infecções localizadas e também para desinfecção de água e do sangue (PERUSSI, 2007; RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010; SOBSEY; GOLD; CASTEEL, 2002).

Para ampliar o uso da TFD é necessário a otimização de protocolos, tais como o intervalo entre a administração do FS e a exposição de luz, o tempo adequado de iluminação e conveniente fonte de luz. O alto custo da TFD em aplicações clínicas também é outro fator que diminui as perspectivas de seu uso como modalidade de tratamento para diversas patologias. Esse alto custo se deve não apenas ao preço dos equipamentos para o procedimento de irradiação, mas também dos FS empregados. Sendo assim, torna-se importante a pesquisa de novos sistemas de luz/FS, de baixo custo, para aplicação em TFD.

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA TFD

O uso terapêutico da luz é conhecido há mais de 4000 anos pelas civilizações antigas, como as do Egito, Índia e China. Eles utilizavam a ação fotodinâmica pela ingestão oral de plantas com posterior exposição à luz solar para tratamento de patologias, como, por exemplo, o vitiligo, que é uma doença de pele, caracterizada por máculas acrômicas, de causa desconhecida (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998). O psoraleno (Figura 1.3) é o princípio ativo destas plantas e é empregado atualmente para o tratamento de psoríase, outra alteração idiopática que acomete a pele (JOSEFSEN; BOYLE, 2008).

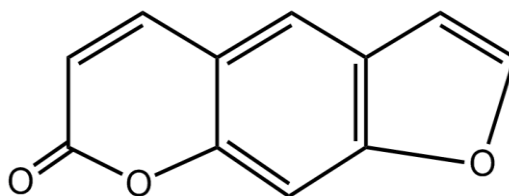


Figura 1.3 - Estrutura do psoraleno.

Segundo mencionado por Macdonald e outros pesquisadores, em 1900, Raab verificou que a combinação do corante laranja de acridina, cuja estrutura é apresentada na Figura 1.4, e luz poderiam destruir o organismo vivo *Paramecium*. Quando o micro-organismo era exposto apenas à luz solar ou apenas ao corante na ausência de luz, nenhum efeito era observado. Contudo, se o micro-organismo fosse exposto ao corante e à luz simultaneamente, um efeito letal ocorria, demonstrando a dependência tanto da concentração do corante como do tempo de exposição à luz (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; RIBEIRO; SILVA; JORGE, 2004).

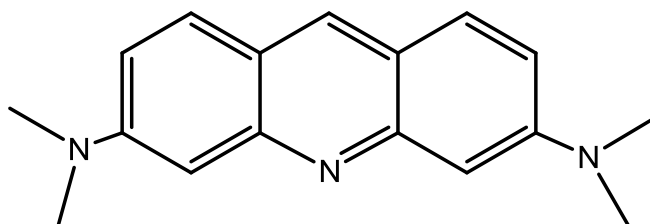


Figura 1.4 - Estrutura do alaranjado de acridina.

Conforme relatos encontrados na literatura, em 1903, Tappeiner e Jesionek realizaram os primeiros experimentos para o tratamento do câncer por meio da TFD, utilizando aplicação tópica do corante eosina (Figura 1.5) e luz branca para tratar um câncer de pele (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; MACHADO, 2000; STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998). Segundo Dolmans e colaboradores, em 1907, Tappeiner e Jodlbauer demonstraram a necessidade de utilizar oxigênio no processo e introduziram o termo “ação fotodinâmica” (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

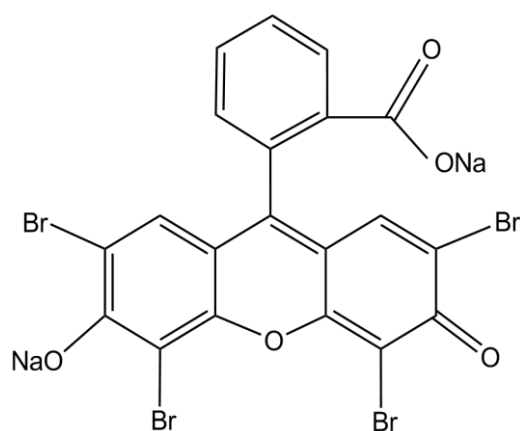


Figura 1.5 - Estrutura do corante Eosina Y.

De acordo com alguns autores, Policard examinou a atividade fototóxica de porfirinas em tumores malignos em 1925. Foi observado que o tecido tumoral apresentou maior fluorescência em relação ao tecido sadio, demonstrando o preferencial acúmulo das porfirinas em células anormais. Verificou-se também que as porfirinas são atóxicas na ausência de luz, apresentando-se tóxicas apenas na presença de luz visível e oxigênio (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; MACHADO, 2000; STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998).

Bonnett e pesquisadores relataram que, no início da década de 50, Schwartz desenvolveu um composto denominado derivado de hematoporfirina (HpD). Para preparar esse derivado, a hematoporfirina bruta (Figura 1.6) foi tratada com ácido acético e ácido sulfúrico, filtrada e então neutralizada com acetato de sódio. O precipitado foi dissolvido em solução salina para, então, produzir HpD. Por meio da fluorescência do HpD, Lipson, sob orientação de Schwartz, observou o acúmulo de HpD em células tumorais de ratos e camundongos (BONNETT, 1995; DOLMANS;

FUKUMURA; JAIN, 2003; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998). Segundo relatos, no fim da década de 60, Lipson empregou HpD e irradiação seletiva de luz visível para tratar um câncer de mama, obtendo sucesso (MACHADO, 2000; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; STERNBERG; DOLPHIN; BRUCKNER, 1998).

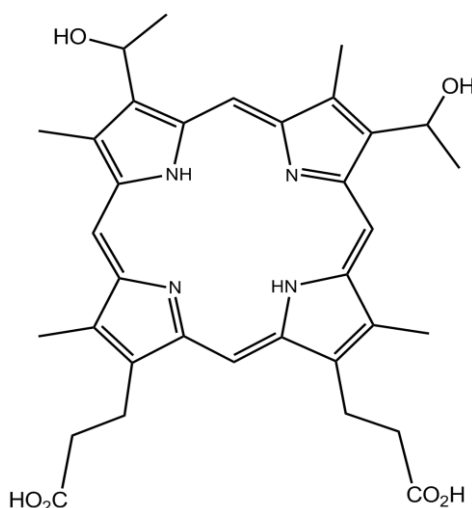


Figura 1.6 - Estrutura da hematoporfirina.

Segundo mencionado por Macdonald e Dougherty, em 1976, Weishaupt e colaboradores verificaram que o oxigênio singlete era o agente citotóxico responsável pelo efeito fotodinâmico observado nas células tumorais. Porfirinas foram então analisadas como FS devido à sua eficiente geração de oxigênio singlete e devido à sua absorção máxima na região vermelha do espectro eletromagnético (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

Conforme relatos obtidos na literatura, Dougherty passou vários anos isolando e identificando frações ativas de HpD, que era conhecido até então por suas propriedades de retenção em tecidos tumorais, alto rendimento quântico de oxigênio singlete e por possuir máximo de absorção no comprimento de onda da luz vermelha. Assim, no fim de 1980, desenvolveu uma versão purificada deste, denominado Photofrin II[®]. Em 1993, a empresa QLT (Canadá) purificou e otimizou a preparação feita por Dougherty, e chegou ao medicamento Photofrin[®] (Figura 1.7), que foi o primeiro agente fototerapêutico a ser autorizado por órgãos governamentais dos Estados Unidos, Canadá, Alemanha, França, Holanda e Japão,

para uso em TFD (JOSEFSEN; BOYLE, 2008; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

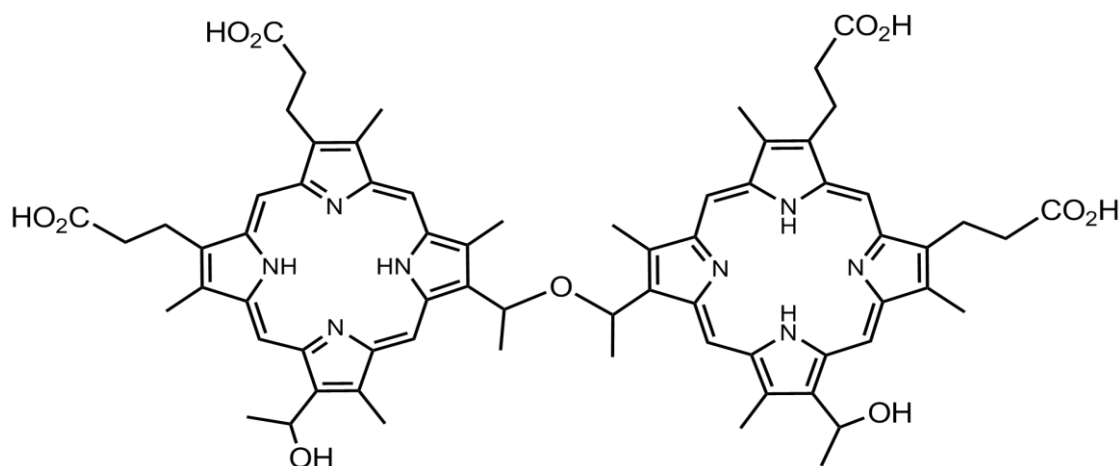


Figura 1.7 - Estrutura do agente terapêutico Photofrin® na forma de éter.

O Photofrin® continua sendo o FS mais frequentemente utilizado para TFD do câncer, porém ele não é o agente terapêutico mais indicado. O Photofrin® consiste de mais de 60 compostos, sendo uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros, o que torna difícil a escolha da luz administrada, além de ser difícil de ser sintetizado. Ele possui absorvidade molar relativamente baixa em 630 nm ($1170 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), sendo necessária a administração de altas doses ($2 \text{ a } 5 \text{ mg kg}^{-1}$). Além disso, o photofrin® não é seletivo ao tecido tumoral e fica retido em tecidos normais por longos períodos, induzindo a uma prolongada sensibilidade aos pacientes, que devem evitar a luz por 4 a 6 semanas (MACHADO, 2000; NOWIS et al., 2005; O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009).

Derivados de hematoporfirina e o Photofrin® são considerados FS de primeira geração. A busca de FS com propriedades melhores em relação ao Photofrin® estimulou a pesquisa, levando ao desenvolvimento da segunda geração de FS. Esses são quimicamente puros, possuem maior absorvidade molar próximo ou acima de 650 nm e induzem pouca ou nenhuma sensibilidade (MACHADO, 2000; NOWIS et al., 2005).

Vários FS de segunda geração foram desenvolvidos, um exemplo é o Levulan® Kerastick. O princípio ativo deste medicamento é obtido a partir do ácido δ -aminolevulínico (ALA = ácido 5-amino-4-oxopentanóico). Esse ácido é o precursor metabólico da protoporfirina IX (PpIX), na rota biossintética do heme, que é o agente

fotodinamicamente ativo, a biossíntese da PpIX está apresentada na Figura 1.8 (BERG et al., 2005; BROWN; BROWN; WALKER, 2004; JOSEFSEN; BOYLE, 2008).

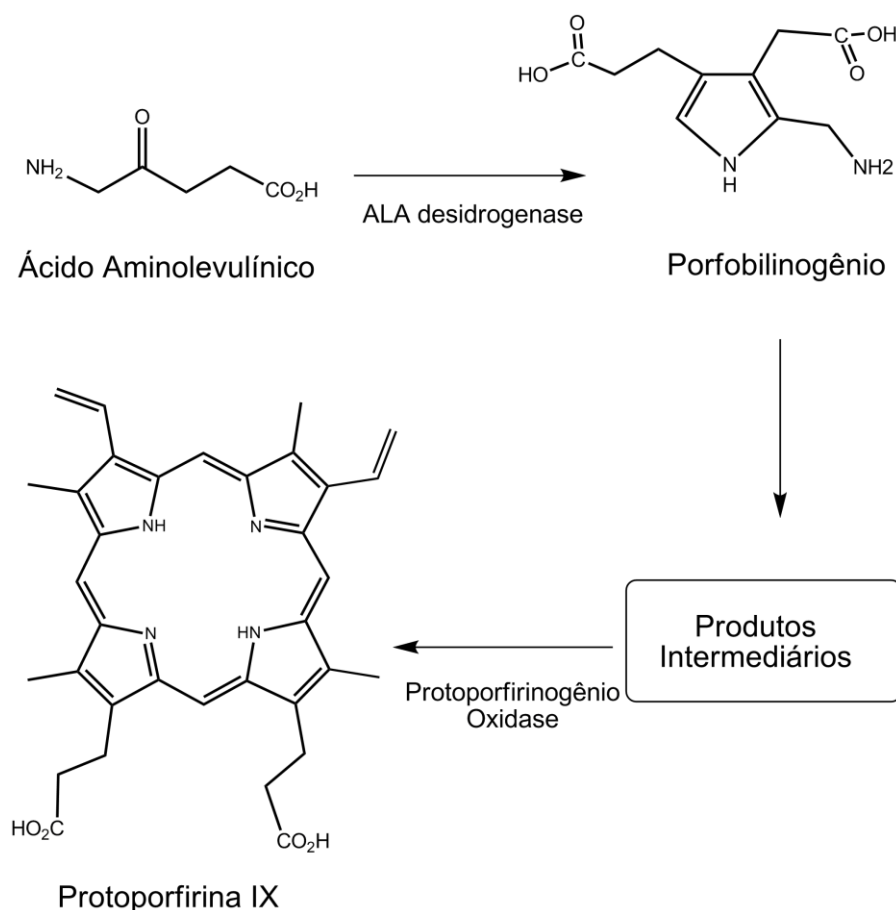


Figura 1.8 - Biossíntese da PpIX (JOSEFSEN; BOYLE, 2008).

O ALA (pró-droga), que é o material de partida para as porfirinas *in vivo*, é aprovado para o tratamento de doenças de pele, sendo utilizado atualmente na TFD dermatológica. Assim, o ALA é geralmente aplicado topicamente utilizando luz de comprimento de onda próximo ao azul (400-500 nm) (AGOSTINIS et al., 2011; KHARKWAL et al., 2011; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; WILSON; PATTERSON, 2008). Uma vantagem da aplicação tópica em relação à injetável, é que no caso da primeira o FS é mais facilmente eliminado.

Devido à baixa solubilidade de muitos FS em meio aquoso, principalmente em soro fisiológico, tem-se pesquisado sistemas de transporte que permitem a entrega desses FS ao tecido doente. Essa estratégia de entrega inclui a

investigação de FS ligados diretamente a moléculas biologicamente ativas, tais como anticorpos e lipossomos. Esses FS são denominados de terceira geração (JOSEFSEN; BOYLE, 2008; NYMAN; HYNNINEN, 2004; O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009).

1.3 PROCESSOS FOTOQUÍMICOS DA TFD

A primeira etapa no processo da TFD é a absorção de um fóton de luz pelo FS no estado fundamental (S_0) e sua promoção para um estado excitado (S_1). O FS no estado excitado pode retornar ao estado fundamental emitindo luz na forma de fluorescência ou fosforescência, ou por meio de processos não radiativos. Alternativamente, ele pode passar para um estado triplete excitado (T_1), conforme apresentado na Figura 1.9.

A transição $S_1 \rightarrow T_1$ ou $T_1 \rightarrow S_0$ envolve uma mudança de spin eletrônico e é um evento significativamente menos provável que transições $S_1 \rightarrow S_0$. Assim, o tempo de vida médio do estado T_1 pode variar de 10^{-4} a vários segundos, enquanto o tempo de vida médio de um estado S_1 é de aproximadamente 10^{-8} s (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Dessa forma, o FS no estado T_1 pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, localizadas próximas à região irradiada, gerando EROs que oxidam biomoléculas e danificam o tecido irradiado (RIBEIRO et al., 2007). O mecanismo de produção de EROs pode ser do Tipo I, do Tipo II ou ambos.

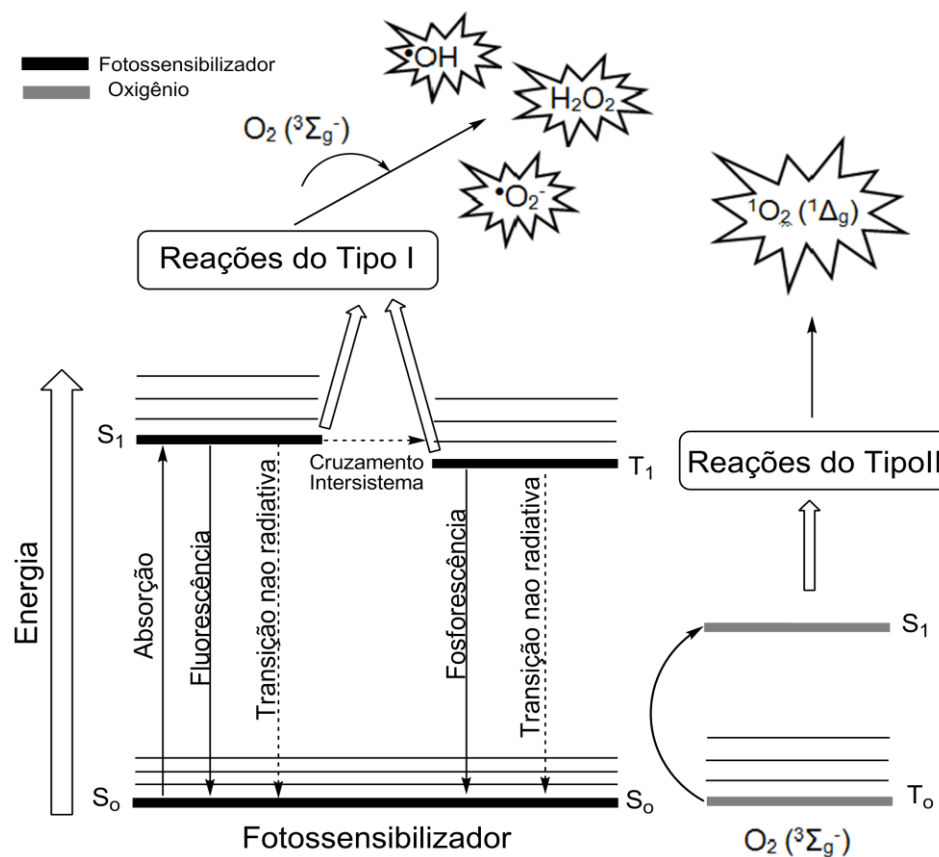


Figura 1.9 - Reações (Tipo I e II) de geração de EROs pela combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio no estado fundamental $O_2 (^3\Sigma_g^-)$.

Reações Tipo I: o FS no estado excitado S_1 ou T_1 age diretamente com substratos biológicos para formar íons radicais, que transferem elétrons para o oxigênio no estado fundamental, produzindo radicais livres, que são extremamente reativos, como radicais superóxido ($\bullet O_2^-$), hidroxila ($\bullet OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas. Esses processos estão esquematizados abaixo:



Reações Tipo II: o FS no estado excitado T_1 transfere energia para o oxigênio no estado fundamental tripleto, $O_2 (^3\Sigma_g^-)$, o qual será promovido a um estado singlete, $^1O_2 (^1\Delta_g)$, um agente altamente citotóxico para o sistema biológico (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, 2007; MACHADO, 2000).

As reações de transferência de energia são mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons, assim o mecanismo Tipo II é geralmente favorecido nas reações de foto-oxidação. O FS no estado T_1 pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, localizadas próximas à região irradiada, gerando 1O_2 ($^1\Delta_g$), que danifica o tecido irradiado (MACHADO, 2000; RIBEIRO et al., 2007). Os EROs oxidam biomoléculas, como proteínas e lipídios. A reatividade dos EROs com moléculas orgânicas não é específica, assim qualquer macromolécula dentro da célula pode ser alvo para TFD. Portanto, essa multiplicidade de alvos torna difícil o desenvolvimento de resistência celular (BONNETT, 1995; PERUSSI, 2007).

1.4 OXIGÊNIO SINGLETE

Segundo a teoria do orbital molecular, a configuração eletrônica do oxigênio molecular no estado fundamental, O_2 ($^3\Sigma_g^-$), possui dois elétrons paralelos ocupando dois orbitais π degenerados, caracterizando um estado tripleto. Uma forma mais reativa do oxigênio é o oxigênio no estado singlete, 1O_2 ($^1\Delta_g$), que pode ser gerado por um acréscimo de energia. A reatividade extrema do estado 1O_2 ($^1\Delta_g$), decorre do emparelhamento de dois elétrons, com spins opostos, em um orbital π . Sendo assim, o oxigênio singlete é muito mais oxidante que o oxigênio molecular (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; RONSEIN et al., 2006). A Figura 1.10 mostra a distribuição eletrônica do oxigênio tripleto e do oxigênio singlete.

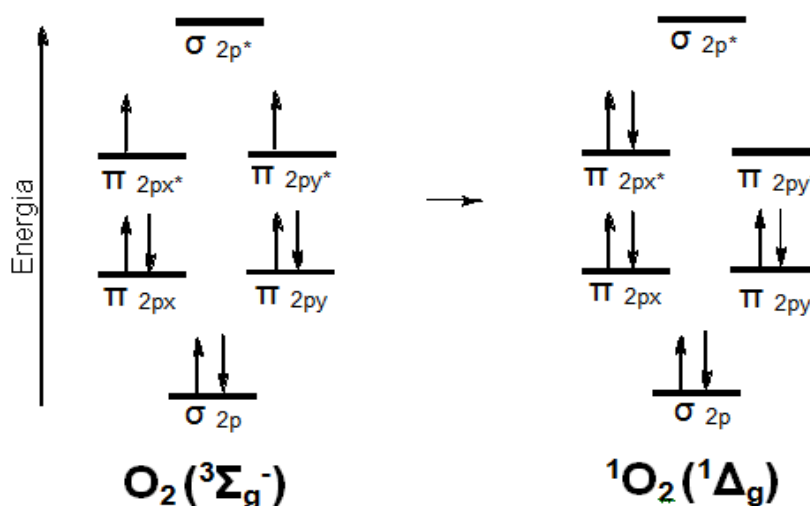


Figura 1.10 - Diagrama de orbital molecular mostrando a distribuição eletrônica do oxigênio tripleto, O_2 ($^3\Sigma_g^-$), e do oxigênio singlete, 1O_2 ($^1\Delta_g$) (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001)

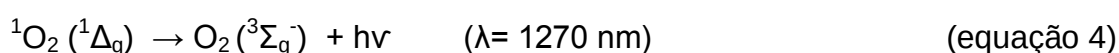
Existem dois estados singlete do oxigênio, como pode ser observado na Tabela 1.1. O primeiro estado excitado, $^1\Delta_g$, tem dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, possui uma energia de 22,5 kcal mol⁻¹ acima do estado fundamental, e tempo de meia vida de aproximadamente 10⁻⁶ s em solvente aquoso. O segundo estado excitado, $^1\Sigma_g^+$ tem um elétron em cada orbital π degenerado, com spins opostos, e possui uma energia de 37,5 kcal mol⁻¹ acima do estado fundamental, e tempo de vida em solvente aquoso de 10⁻¹¹ s. A relevância do $^1\Sigma_g^+$ para processos fotodinâmicos se deve ao fato dele ser um precursor do $^1\Delta_g$, uma vez que decai rapidamente para o estado $^1\Delta_g$. Assim, em geral, o estado $^1\Delta_g$ é decisivo no processo de TFD (LANG; MOSINGER; WAGNEROVÁ, 2004; RONSEIN et al., 2006).

Tabela 1.1 - Distribuição eletrônica dos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado excitado singlete, $^1O_2 (^1\Sigma_g^+ \text{ ou } ^1\Delta_g)$ e estado fundamental triplete $O_2 (^3\Sigma_g^-)$ (RONSEIN et al., 2006).

Estado	Orbital π^*	Energia (kcal mol ⁻¹)	Tempo de vida (s)
$^1O_2 (^1\Sigma_g^+)$	$\uparrow \downarrow$ []	37,5	10 ⁻¹¹
$^1O_2 (^1\Delta_g)$	$\uparrow\downarrow$ []	22,5	10 ⁻⁶
$O_2 (^3\Sigma_g^-)$	$\uparrow$ [] $\uparrow$ []	-----	-----

A geração de oxigênio singlete é determinante para o uso da TFD, uma vez que o principal mecanismo de ação desta terapia (mecanismo Tipo II) é responsável pela geração desse composto. As reações Tipo II são caracterizadas por uma dependência na concentração de oxigênio molecular (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; RIBEIRO et al., 2007).

Diferentes métodos ópticos podem ser utilizados para monitorar a presença de oxigênio singlete no sistema de estudo. Na região do infravermelho próximo (1270 nm) ocorre uma transição monomolecular do $^1O_2 (^1\Delta_g)$ (Equação 4). A luminescência dessa transição pode ser medida diretamente em solventes, em células eucarióticas e também em pele humana (MAISCH et al., 2007; RONSEIN et al., 2006; SNYDER et al., 2006).



O $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) é gerado *in situ* e reage rapidamente com os substratos celulares, assim o dano oxidativo é altamente localizado em regiões com diâmetro próximo a espessura de uma membrana celular. O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) em sistemas biológicos pode ser comparado com a pequena distância de difusão deste, podendo ser utilizado para estimar o local de dano e, conseqüentemente, a localização do FS (DOUGHERTY et al., 1998; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; SNYDER et al., 2006).

Maisch e colaboradores estudaram os processos oxidativos que ocorrem durante a morte de bactérias por meio da geração e decaimento do oxigênio singlete, que foi detectado diretamente por sua luminescência em 1270 nm. Eles verificaram que, quando a bactéria *Staphylococcus aureus* foi incubada com Photofrin[®], o tempo de decaimento de luminescência do oxigênio singlete foi de aproximadamente 6 μs . Esse valor situou-se entre o tempo de decaimento em água (3,5 μs) e em fosfolípídeos de membrana de células (14 μs). Eles concluíram que o oxigênio singlete foi gerado próximo, ou dentro da membrana plasmática da bactéria, local que poderia, então, ser a localização do Photofrin[®]. A distância de difusão do oxigênio singlete em membrana celulares é de 0,3 μm . Sendo assim, o oxigênio singlete gerado, poderia levar a foto-oxidação da bactéria, uma vez que a membrana de *S. aureus* tem aproximadamente 0,2 μm de espessura (MAISCH et al., 2007).

O oxigênio singlete pode interagir com moléculas de duas maneiras: a) extinção física de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) por um supressor que se torna eletronicamente excitado. Assim o oxigênio singlete transfere sua energia de excitação para uma molécula e retorna ao estado fundamental; b) oxidação de uma molécula (reação química).

A maioria das interações do $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) com biomoléculas ocorre por meio de reações químicas e não por supressão física. O oxigênio singlete é um poderoso agente oxidante e pode reagir com muitas biomoléculas, como pode ser observado na Figura 1.11. Ele reage com lipídios insaturados (incluindo o colesterol), ácidos nucleicos (principalmente derivados de guanina e guanosina) e proteínas. As proteínas estão presentes em altas concentrações em sistemas biológicos e as cadeias laterais de seus aminoácidos possuem elevada constante de desativação total do $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) quando comparadas com outras biomoléculas. O triptofano é o aminoácido mais reativo, porém histidina e metionina também reagem. Essas interações causam danos e potencial destruição para membranas celulares e

desativação enzimática, levando à morte celular (BONNETT, 1995; JOSEFSEN; BOYLE, 2008; RONSEIN et al., 2006).

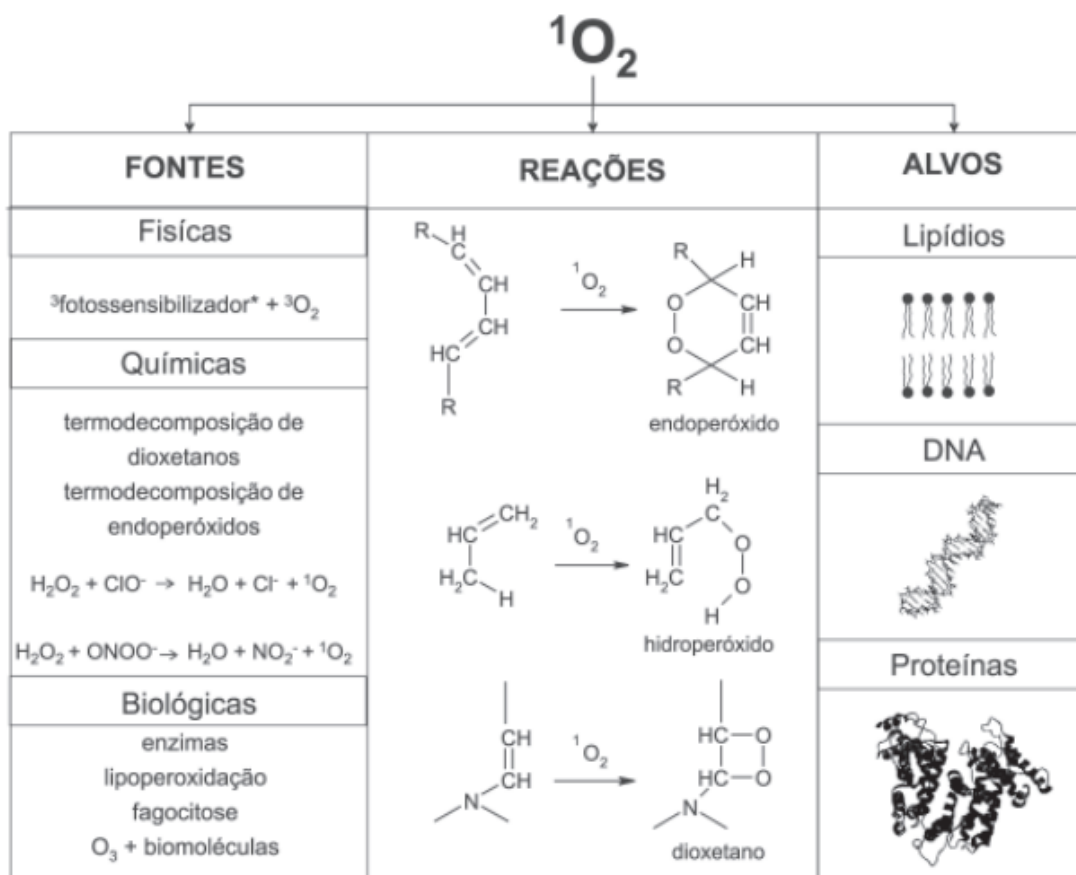


Figura 1.11 - Fontes, reações e alvos do $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) (RONSEIN et al., 2006).

Um FS deve ser estável frente à oxidação por $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) ou outras espécies reativas de oxigênio gerado *in situ* (LANG; MOSINGER; WAGNEROVÁ, 2004; RONSEIN et al., 2006).

A quantidade de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) produzido depende de fatores como, interação do FS com constituintes celulares, agregação do FS, fotodegradação do FS, pH do meio e presença de oxigênio. Para um alto rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_Δ) o FS deve apresentar alta absorvidade molar na região espectral de excitação da fonte de luz; energia apropriada do estado tripleto ($E_T \geq 95 \text{ kJ mol}^{-1}$), suficiente para formação de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$); alto rendimento quântico de estado tripleto Φ_T ($\Phi_T > 0,4$); longo tempo de vida do estado tripleto ($\tau_T > 1 \text{ } \mu\text{s}$) e alta fotoestabilidade (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, 2007; DEROSA; CRUTCHLEY, 2002; LANG; MOSINGER; WAGNEROVÁ, 2004).

1.5 FONTE DE LUZ NA TFD

A melhor fonte de radiação em TFD é aquela que por um baixo custo forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do FS, sem efeitos térmicos significativos (MACHADO, 2000).

A faixa de comprimento de onda da luz mais comumente utilizada para aplicação da TFD corresponde à faixa do vermelho e infravermelho-próximo (600-850 nm). Para ocorrer o efeito fotodinâmico é necessário que a luz seja absorvida pelo FS. Isso é possível quando o comprimento de onda da luz emitida corresponde ao comprimento de onda de absorção do FS.

Atualmente, uma grande variedade de aparelhos podem ser utilizados no procedimento de irradiação durante a TFD, os quais utilizam diferentes fontes de luz, como lâmpadas e laser, por exemplo, sendo o laser a mais utilizada. O termo laser é um acrônimo para *light amplification by stimulated emission of radiation* (amplificação de luz por emissão estimulada da radiação). O laser possui certas características que o distingue das outras fontes de luz: são coerentes e preservam a colimação durante a propagação; são monocromáticos, assim permitem irradiação no comprimento de onda exato em que o FS possui absorção. Além disso, o laser pode ser facilmente acoplado a fibras ópticas, permitindo a entrega da luz ao tecido-alvo em lesões internas. Porém, o laser possui um alto custo, o que se torna um inconveniente para aplicação como fonte de luz em TFD (BAGNATO et al., 2006; MANG, 2004; MARTINS et al., 2007; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; NYMAN; HYNINEM, 2004).

Recentemente, várias fontes de luz alternativas têm sido pesquisadas, uma delas é o LED (*light-emitting diode*), dispositivo que possui um diodo semicondutor que emite luz quando conectado a um circuito elétrico. Esses dispositivos possuem uma alta emissão em uma estreita largura de banda (de 20 a 50 nm) e são fabricados em vários comprimentos de onda, que abrange quase todo espectro visível. O preço elevado do laser estimulou a utilização de fontes baseadas em dispositivos LED, que são de baixo custo, de resposta confiável, portáteis e de fácil manuseio. Os LEDs não apresentam coerência, nem colimação, porém possuem várias vantagens econômicas, podendo ser utilizado para investigação de novos compostos para TFD (BAGNATO et al., 2006; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI, 2006; MANG, 2004; MARTINS et al., 2007; PELOI, et al., 2008).

Os LEDs, em geral, possuem dimensões bem pequenas (0,5 a 1 cm de diâmetro), porém podem ser acoplados em série, aumentando sua superfície de contato, permitindo o tratamento de lesões de grandes dimensões.

1.6 PORFIRINAS E METALOPORFIRINAS

Porfirinas são compostos intensamente coloridos, vermelhas ou púrpuras, de origem natural ou sintética, apresentam um macrociclo aromático de vinte átomos de carbono e quatro átomos de nitrogênio (Figura 1.12 a). O macrociclo é composto por quatro anéis pirrólicos (I, II, III e IV) conectados entre si por grupos metino (MILGROM, 1997).

O macrociclo porfirínico é essencialmente planar. Seu centro é um ligante tetradentado, com diâmetro máximo de 0,37 nm, podendo coordenar-se a um íon metálico, o que pode levar a uma distorção na planaridade do anel porfirínico. O tamanho do cátion metálico influencia na distorção e consequentemente na estabilidade da porfirina. O macrociclo pode se complexar com uma grande variedade de íons metálicos e, quando isso ocorre, as porfirinas passam a ser denominadas metaloporfirinas, cuja estrutura está representada na Figura 1.12 b (BIESAGA; PYRZYNSKA; TROJANOWICZ, 2000; MILGROM, 1997).

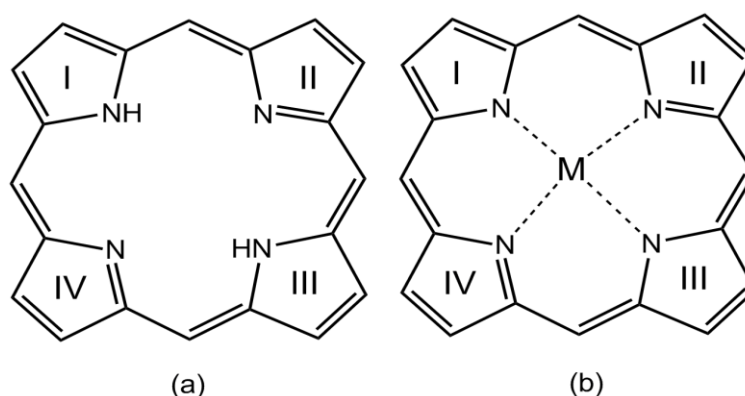


Figura 1.12 - Estruturas básicas das (a) porfirinas e (b) metaloporfirinas, M = íon metálico.

Metaloporfirinas de ocorrência natural desempenham importante papel na atividade biológica de organismos vivos. Por exemplo, as metaloporfirinas de ferro no grupo heme são responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina, respectivamente). Além disso, sistemas macrociclos

similares às porfirinas também desempenham papel fundamental nos sistemas biológicos, como, por exemplo, os macrociclos de magnésio (clorina) da clorofila, responsáveis pela fotossíntese, e os macrociclos de cobalto (corrina) na vitamina B₁₂, que exerce diferentes funções no organismo humano, sendo necessária em pequenas quantidades (BERG et al., 2005; BIESAGA; PYRZYNSKA; TROJANOWICZ, 2000; LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

1.6.1 Nomenclatura

No sistema de nomenclatura da IUPAC o macrociclo apresentado na Figura 1.13, é denominado porfirina e a nomenclatura desses compostos está baseada nas posições dos grupos substituintes no macrociclo porfirínico.

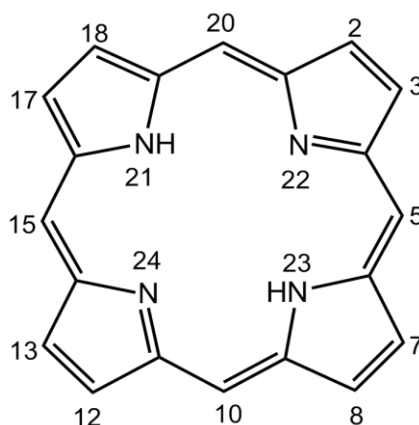


Figura 1.13 - Sistema de numeração do macrociclo, segundo a IUPAC.

Os carbonos nas posições 5, 10, 15 e 20 são denominados carbonos em posições *meso*. Os carbonos das posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 são denominados carbonos β -pirrólicos. O prefixo “tetrakis” é utilizado para porfirinas com quatro substituintes iguais nas posições *meso* do anel. Se esses grupos forem anéis aromáticos eles podem possuir substituintes nas posições *orto*, *meta* e *para* (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997; MILGROM, 1997).

As clorinas e as bacterioclorinas são importantes derivados porfirínicos. As diferenças estruturais entre as porfirinas, clorinas e bacterioclorinas se devem ao grau de insaturação dos anéis, a composição dos grupos laterais ligadas aos anéis pirrólicos e das posições desses grupos no macrociclo, como pode ser observado na

Figura 1.14. As porfirinas apresentam 22 elétrons π , nas clorinas um dos anéis pirrólicos é reduzido, possuindo 20 elétrons π , enquanto as bacterioclorinas apresentam dois anéis reduzidos e 18 elétrons π (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; STERNBERG; DOLPHI; BRUCKNER, 1998).

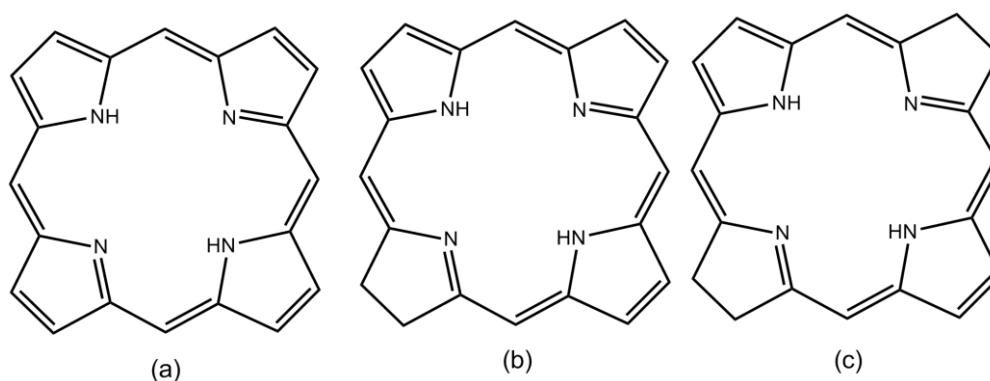


Figura 1.14 - Estrutura do macrociclo porfirínico (a), da clorina (b) e da bacterioclorina (c).

1.6.2 Classificação

A protoporfirina IX é um derivado porfirínico que ocorre naturalmente associada a íons de ferro (II e III), denominada heme. Heme é o grupo prostético para várias proteínas, como por exemplo, os citocromos, que participam de reações de transferência de elétrons. Metaloporfirinas sintéticas são capazes de mimetizar as reações de oxidação que acontecem em sistemas vivos mediadas por enzimas do citocromo P-450 e podem ser utilizadas como catalisadores para processos de oxidação (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997; LEHNINGER; NELSON; COX, 2000; MONTANARI, 1994). Assim, os derivados porfirínicos sintéticos foram classificados de acordo com sua atividade catalítica, sendo divididos em porfirinas de primeira, segunda ou de terceira geração.

As porfirinas de primeira geração (Figura 1.15 a) possuem substituintes fenila nas posições *meso* do anel (5, 10, 15 e 20). Essas porfirinas apresentam baixa atividade catalítica em reações de oxidação. Isso ocorre pois os grupos fenílicos promovem fraca ativação do anel porfirínico, devido à ausência de grupos retiradores de elétrons. Esta baixa ativação eletrônica não promove eficientemente a geração e estabilização da espécie catalítica ativa. Outro fator relacionado à baixa eficiência catalítica é a ausência de grupos volumosos, que causam impedimento

estérico e evitam a formação de agregados e dímeros. Além disso, em porfirinas de primeira geração a degradação oxidativa do anel porfirínico ocorre rapidamente visto que a ausência de grupos protetores (retiradores eletrônicos e volumosos) fornece o contato de espécies porfirínicas em solução (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997).

Quando os grupos fenílicos das posições *meso* do anel porfirínico possuem halogênios como substituintes (ou outros substituintes retiradores de elétrons), as porfirinas são classificadas como sendo de segunda geração (Figura 1.15 b). A presença desses substituintes confere a essas porfirinas melhor atividade catalítica, uma vez que atuam como retiradores de densidade eletrônica do anel macrocíclico. Além disso, porfirinas de segunda geração podem conter grupos volumosos nas posições *meso*, que podem diminuir a degradação da porfirina, impedindo o contato entre espécies em solução e a formação de dímeros (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997).

Porfirinas de terceira geração correspondem a porfirinas que possuem halogênios ou grupos volumosos nas posições β -pirrólicas (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18) do anel porfirínico (Figura 1.15 c). A presença desses grupos pode facilitar a formação e a ativação da espécie catalítica ativa; confere a essas porfirinas maior proteção à destruição oxidativa e impede a formação de espécies diméricas (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997; MONTANARI, 1994).

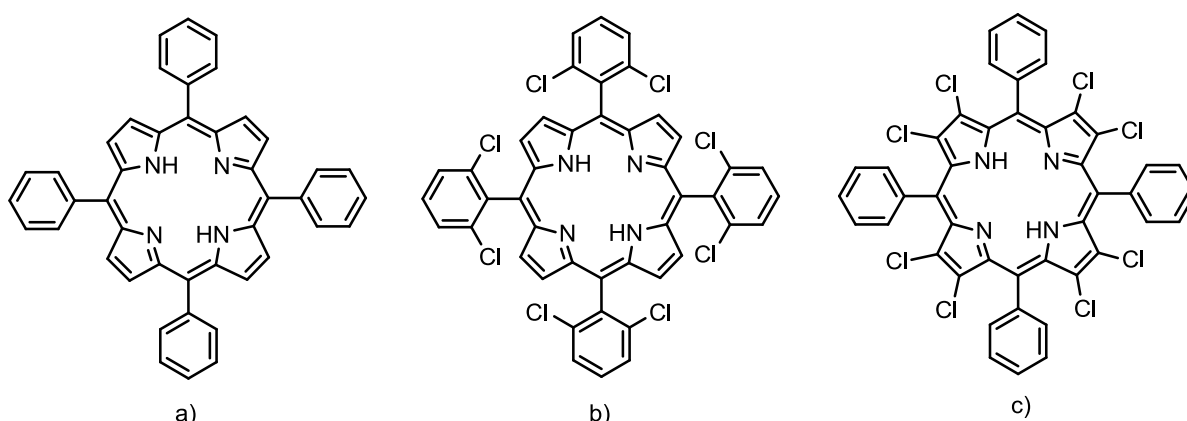


Figura 1.15 - Exemplos de porfirinas classificadas como (a) primeira geração, (b) segunda geração e (c) terceira geração.

1.6.3 Características espectroscópicas de porfirinas e metaloporfirinas na região do UV-Vis

A espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) utiliza luz na faixa do visível e ultravioleta próximo (200 a 700 nm). A absorção de luz nessa região depende da estrutura eletrônica da molécula e provoca transições dos elétrons de valência do estado fundamental para os estados excitados. Os orbitais no estado fundamental excitado caracterizam o tipo de transição eletrônica observada (Figura 1.16).

As transições de menor energia resultam da promoção do elétron do orbital n ou π para o orbital π^* , denominadas transições $n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$, respectivamente. Assim, a maioria das aplicações da espectroscopia de absorção a compostos orgânicos é baseada nessas transições, uma vez que as energias necessárias para esses processos situam-se em uma região espectral de 200 a 700 nm. Ambas as transições requerem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π . As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ possuem valores de absorvidade molar elevados, entre 10^4 a $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, visto serem amplamente favorecidas pelas regras de seleção definidas para esta espectroscopia (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

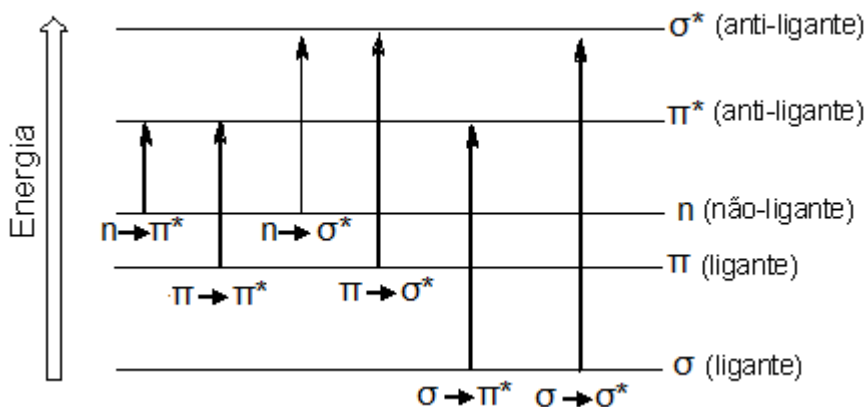


Figura 1.16 - Tipos de transições eletrônicas.

A caracterização de porfirinas geralmente é feita por meio da técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis, uma vez que esses compostos possuem absorção nessa faixa de comprimento de onda.

As porfirinas possuem um sistema eletrônico altamente conjugado, com 22 elétrons π , apresentando características espectrais com uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ por

volta de 400 nm, denominada banda *Soret*, a qual possui uma absorptividade molar da ordem de $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e quatro bandas na região do visível, entre 500 e 700 nm, denominadas bandas Q, que apresentam absorptividade molar da ordem de $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

As porfirinas possuem simetria D_{2h} e orbital de maior energia ocupado (HOMO) com simetria a_{1u} e b_{1u} , sendo a energia do orbital b_{1u} superior ao do a_{1u} . O orbital molecular não ocupado de menor energia (LUMO) tem simetrias b_{2g} e b_{3g} , em que o orbital b_{2g} é o de menor energia (Figura 1.17). Geralmente, quando a porfirina é metalada, sua simetria passa de D_{2h} para D_{4h} . Assim, o orbital molecular ocupado de maior energia tem simetrias a_{2u} e a_{1u} , sendo a energia do orbital a_{2u} superior, e o orbital molecular não ocupado de menor energia é duplamente degenerado e possui simetria e_g (GOUTERMAN, 1961).

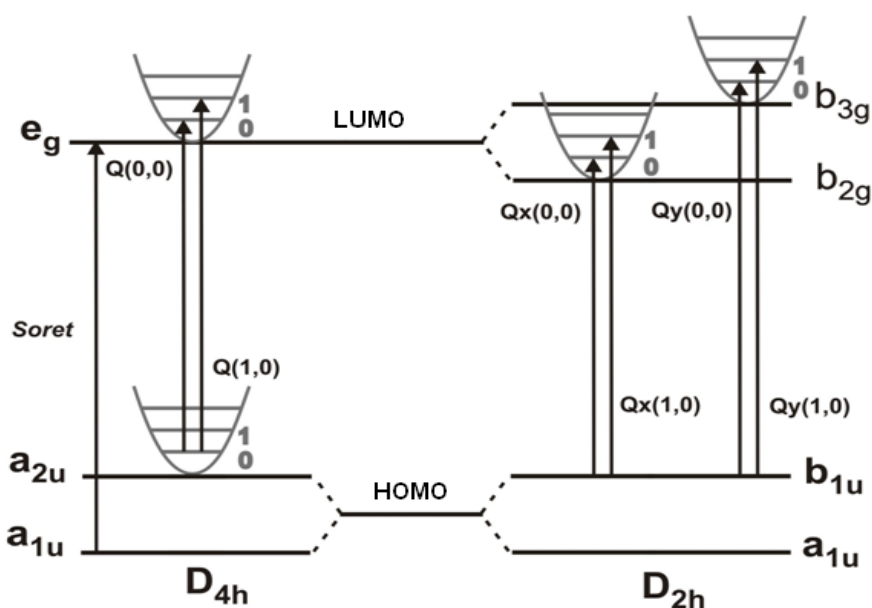


Figura 1.17 - Níveis de energia para as transições eletrônicas proposto por Gouterman (GOUTERMAN, 1961).

A banda *Soret* é atribuída à transição do orbital molecular HOMO a_{1u} para o orbital desocupado LUMO e_g . As bandas Q para os compostos com 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: Q (1,0) e Q (0,0). Para as bandas Q de porfirinas com simetria D_{2h} , devido à perda de simetria do anel, ocorre o desdobramento da transição $a_{2u} \rightarrow e_g$, formando as transições $b_{1u} \rightarrow b_{2g}$ referente ao

eixo x e $b_{1u} \rightarrow b_{3g}$ referente ao eixo y, resultando em quatro bandas Q, representadas em ordem decrescente de energia: $Q_y (1,0)$; $Q_y (0,0)$; $Q_x (1,0)$; $Q_x (0,0)$ (GOUTERMAN, 1961).

Sendo assim, o espectro de absorção eletrônico das porfirinas base livre muda quando a molécula é coordenada com um íon metálico, uma vez que, com a metalação, há alteração da simetria. A Figura 1.18 apresenta o perfil espectral da porfirina $[H_2(TMPyP)]^{4+}$ e da metaloporfirina $[Mn(TMPyP)]^{5+}$, com seus respectivos espectros de absorção. A porfirina base livre possui quatro bandas Q. Após a metalação com íons de Mn^{3+} observa-se o deslocamento da banda Soret para maior comprimento de onda, de 422 para 462 nm. Além disso, observa-se três bandas Q, em 503 nm, 559 nm e 680 nm, caracterizando o processo de metalação.

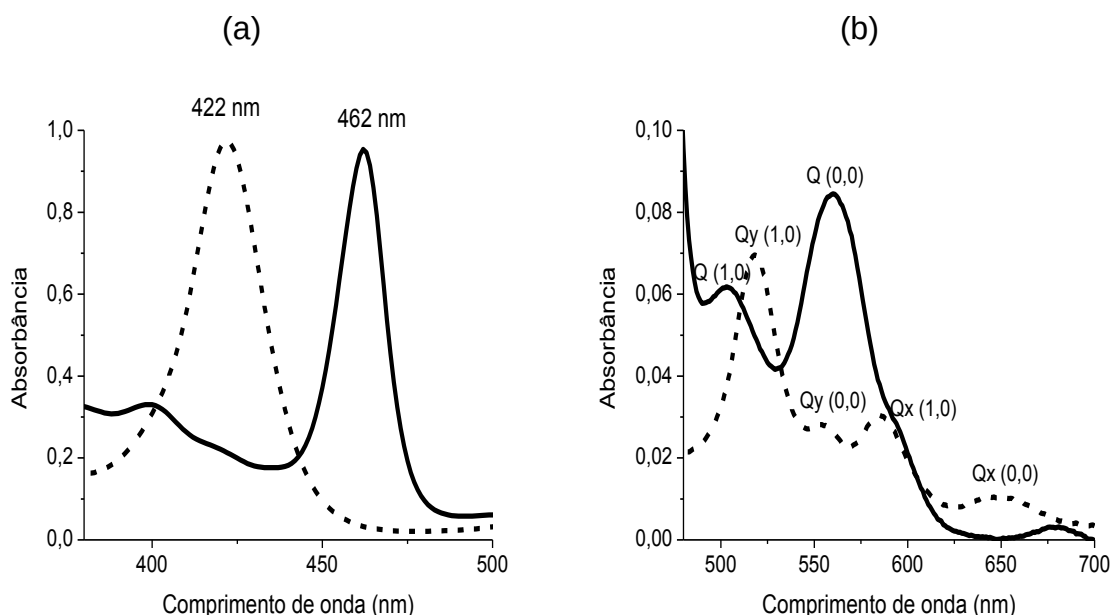


Figura 1.18 - Espectros de absorção no UV-Vis de $[H_2(TMPyP)]^{4+}$ (-----) e da $[Mn(TMPyP)]^{5+}$ (—) em água, (a) banda Soret, (b) bandas Q.

1.6.4 Porfirinas como FS em TFD

Um FS ideal para aplicação em TFD deve apresentar características específicas. As principais características de um FS ideal estão demonstradas na Tabela 1.2, apresentada a seguir.

Tabela 1.2 - Característica de um FS ideal (O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009).

Pureza	Deve ser uma substância de composição conhecida e estável a temperatura ambiente
Estabilidade	Estável quanto à formação de agregados e à fotodegradação
Toxicidade	Toxicidade mínima na ausência de luz e toxicidade apenas em presença de luz em determinados comprimentos de onda. Não deve produzir metabólitos tóxicos
Formulação/farmacocinética	O FS deve ter rápida eliminação do corpo e simplicidade na formulação
Ativação	Absorção de luz em comprimentos de onda de ≈ 600 a 850 nm para máxima penetração de luz no tecido com mínima dispersão de luz
Rendimento quântico	Alto rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) nas reações do Tipo II e outros EROs
Custo e disponibilidade	Baixo custo e comercialmente disponível a fim de promover a utilização extensiva do tratamento
Seletividade	Acumulação favorável em tecido cancerígeno

Como já dito, as porfirinas estão entre os FS mais estudados para aplicação em TFD, por possuírem propriedades interessantes à técnica. Estudos indicam que derivados porfirínicos podem ser utilizados com sucesso para diferentes aplicações relacionadas à TFD (DING et al., 2011; QUIROGA; AVAREZ; DURANTINI, 2010; TITA; PERUSSI, 2001; TOMINAGA et al., 2004).

Ding e colaboradores estudaram a eficiência fotodinâmica da porfirina *meso*-THPP, associada a micelas poliméricas, sobre células cancerígenas em condições de hipóxia. Os resultados demonstraram que a porfirina foi mais eficiente associada a micelas quando comparada a sua forma livre. Os autores também concluíram que as reações do Tipo I, como a formação de $\bullet\text{O}_2^-$, foram predominantes em comparação com a produção de $^1\text{O}_2$ (reações do Tipo II), durante a morte celular (DING et al., 2011).

Quiroga e outros pesquisadores avaliaram a atividade fotodinâmica da porfirina [$\text{H}_2(\text{TMPyP})$] para aplicação *in vitro* sobre células de *Candida albicans*. Os autores verificaram que a porfirina foi capaz de se ligar a células deste fungo,

levando à inativação fotodinâmica após exposição de 30 minutos à iluminação com lâmpada. Concluiu-se que a ação fotodinâmica deste composto poderia ser usada para o tratamento de infecções localizadas ou para esterilização de superfícies (QUIROGA; AVAREZ; DURANTINI, 2010).

Como mencionado anteriormente, porfirinas possuem cinco bandas de absorção na faixa do UV-Vis. Elas possuem uma banda de absorção máxima na região do azul, banda *Soret* (405 a 415 nm), e quatro bandas Q, situadas na região de 500 a 650 nm. Dessa forma, as porfirinas podem ser ativadas por diferentes comprimentos de onda do espectro da luz, sendo que cada intervalo de comprimento de onda possui uma determinada profundidade de penetração na pele humana, como mostra a Figura 1.19 (SAKAMOTO; TOREZAN; ANDERSON, 2010).

Para aplicação da TFD utiliza-se, geralmente, fonte de luz de comprimento de onda próximo ao vermelho, devido à maior penetração em tecidos humanos, como já mencionado. Porém, a luz azul também possui aplicação clínica. Nos Estados Unidos, Canadá e União Europeia, o fotossensibilizador ALA é comercializado como Levulan[®] Kerastick, e é utilizado para tratamento de queratose actínica seguida por exposição de luz azul (AGOSTINIS et al., 2011; SAKAMOTO; TOREZAN; ANDERSON, 2010).

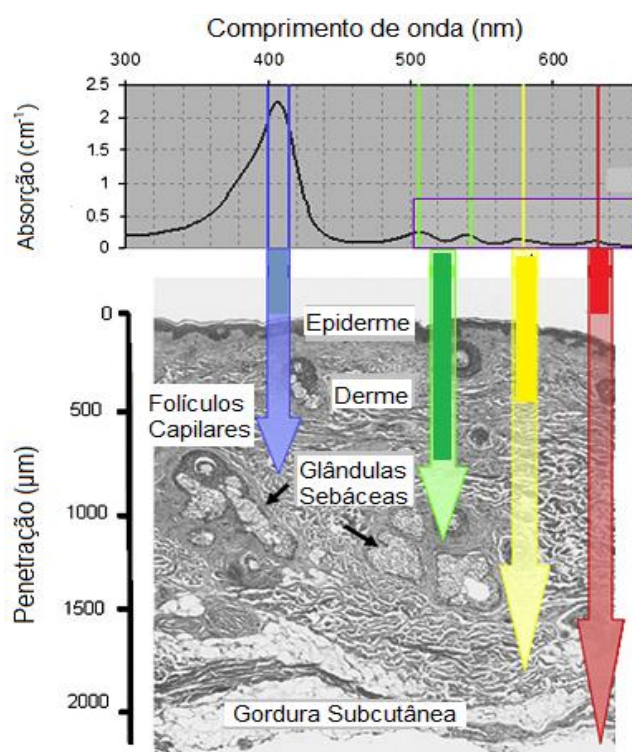


Figura 1.19 - Comprimento de onda das bandas de absorção de porfirinas base livre e penetração da luz na pele humana (SAKAMOTO; TOREZAN; ANDERSON, 2010).

Para fácil aplicação da TFD, o FS deve ser solúvel em água ou em soro fisiológico (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). As porfirinas possuem baixa solubilidade em água, porém essa solubilidade pode ser elevada, inserindo-se grupos polares no anel macrociclo.

1.7 QUIMIOTERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (PACT)

O rápido aumento de resistência bacteriana a antibióticos levou à contínua necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de combate a estes micro-organismos (GUILFOILE, 2007). O desenvolvimento da TFD possibilitou uma nova modalidade de tratamento para a redução ou eliminação de bactérias.

A Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT) é uma opção terapêutica que utiliza um FS, que se localiza preferencialmente nas células microbianas, e luz visível para induzir danos oxidativos, levando a inativação de micro-organismos patogênicos. Essa técnica tem se mostrado eficaz *in vitro* contra as bactérias, incluindo as cepas resistentes aos medicamentos (ALBRECHT et al., 2011; ALVES et al., 2009; BANFI et al., 2006; HAMBLIN; HASAN, 2004; MAISCH, 2007; MANTAREVA et al., 2007; ROLIM et al., 2012).

A inativação fotodinâmica de bactérias pode produzir mudanças principalmente na membrana citoplasmática e no DNA. O dano à membrana citoplasmática pode envolver vazamento do conteúdo celular ou inativação de sistemas de transporte de membrana e enzimas (CAMINOS; DURANTINI, 2007).

A vantagem dessa terapia é que os FS agem via produção de radicais livres, que podem oxidar diferentes biomoléculas, assim, a multiplicidade de alvos torna difícil para as células desenvolverem resistência. Até o momento não houve relatos de resistência microbiana por meio da PACT. Dessa forma, essa pode ser uma alternativa interessante para o tratamento de infecções localizadas (BANFI et al., 2006; PERUSSI, 2007).

A inativação de bactérias depende da natureza do FS, bem como da sua interação com o envelope celular bacteriano. Vários estudos mostraram que a eficácia do FS é diferente para bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas, sendo que as Gram-negativas apresentam-se mais resistentes a PACT.

Isso pode ser explicado pelas diferenças estruturais nas paredes das células dessas bactérias (BANFI et al., 2006; MANTAREVA et al., 2007; SAHU et al., 2009).

A técnica desenvolvida por Gram é o método de coloração mais amplamente utilizado em bacteriologia, e cora de forma distinta as bactérias devido às diferenças fundamentais na parede celular, diferenciando as bactérias em Gram-positivas, coradas de púrpura e Gram-negativas, coradas de rosa, conforme pode ser observado na Figura 1.20 (GUILFOILE, 2007).

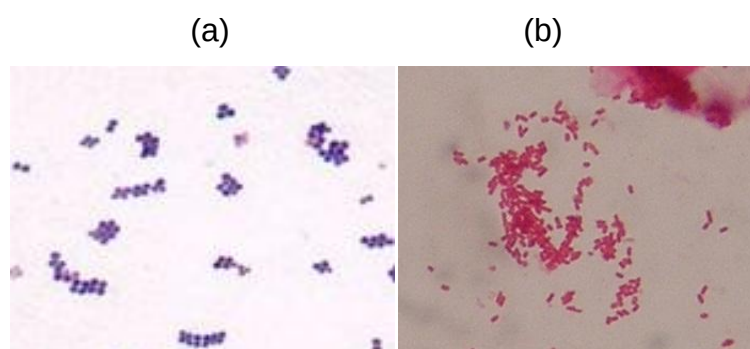


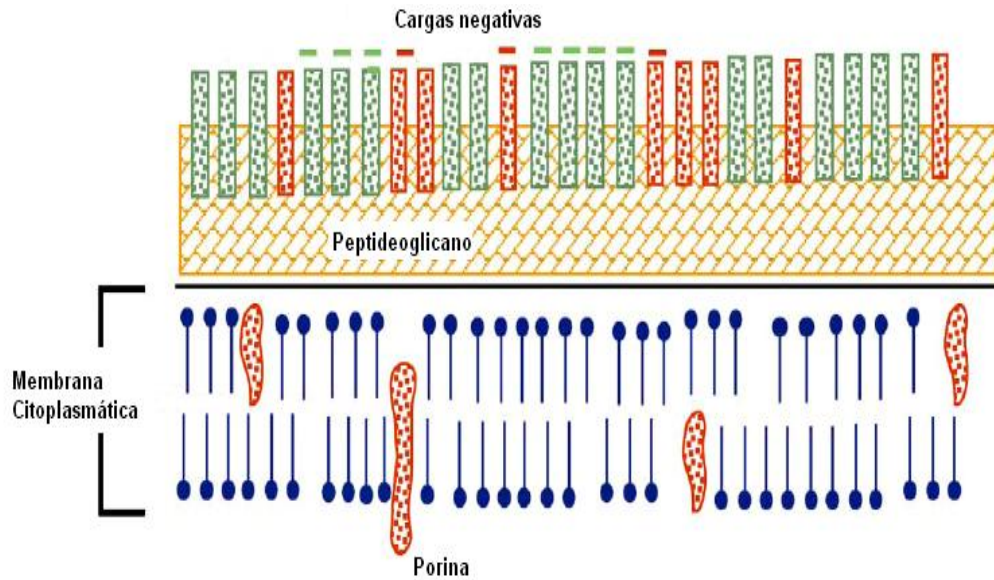
Figura 1.20 - (a) Bactérias Gram-positivas; (b) bactérias Gram-negativas

Nas bactérias Gram-positivas 60 a 90% da parede celular é constituída por peptidoglicano entrelaçados com ácido teicóico. Nas bactérias Gram-negativas apenas 10 a 20% de sua parede corresponde a peptidoglicano. Essas bactérias possuem ainda uma membrana externa constituída por fosfolipídeos, lipopolissacarídeos, lipoproteínas e outras proteínas, conforme apresentado na Figura 1.21 (HAMBLIN; HASAN, 2004; PARIJA, 2006).

Dessa forma, no método de Gram, nas bactérias Gram-positivas, o cristal violeta, que é o corante primário, associado ao iodo utilizado na técnica, forma um complexo constituído por uma grande molécula, que precipita dentro da célula. Nessa fase, a mistura de álcool/acetona, utilizada como agente descolorante, precipita a multicamada de peptidoglicano, fazendo com que este complexo cristal violeta-iodo fique aprisionado dentro da célula, portanto as bactérias Gram-positivas não são descoradas, retêm o corante e apresentam cor púrpura. Além do que, as bactérias Gram-positivas possuem um protoplasma mais ácido, o que as torna mais ávida ao cristal violeta, que é um corante básico. Por outro lado, nas bactérias Gram-negativas, a mistura álcool/acetona dissolve os fosfolipídeos e os lipopolissacarídeos, danificando a membrana citoplasmática, como consequência o

complexo cristal violeta-iodo não fica retido na célula, sendo posteriormente corada na contracoloração, apresentando cor rosa (PARIJA, 2006; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2002).

(a)



(b)

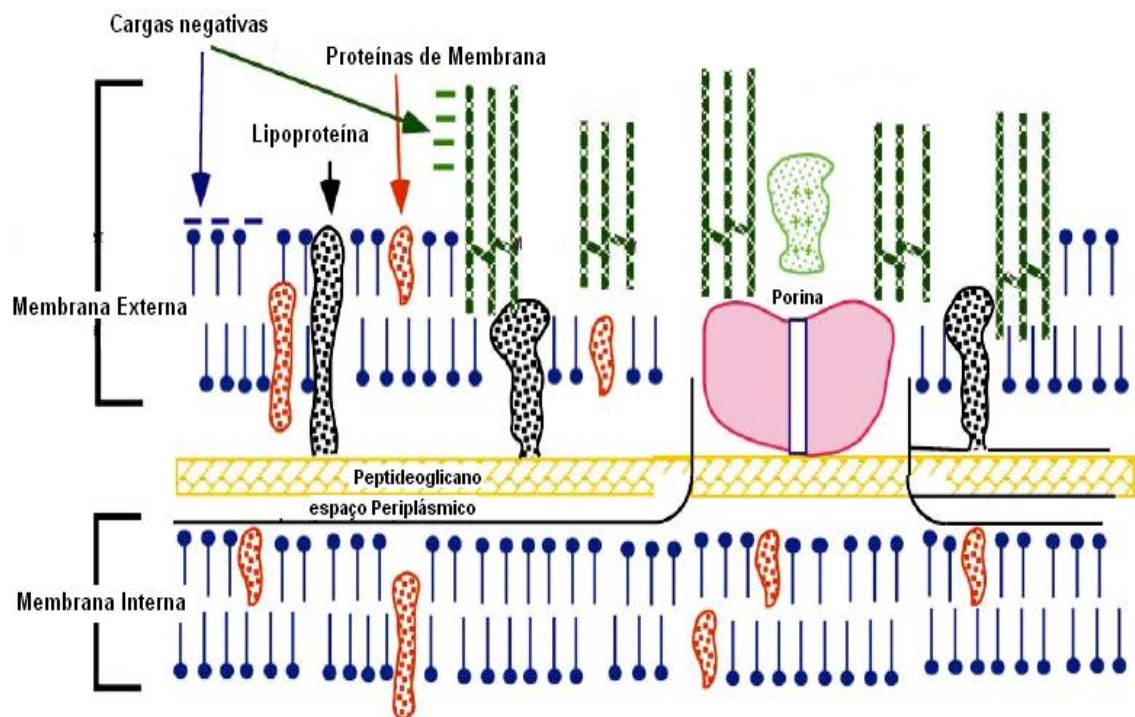


Figura 1.21 - Diagramas ilustrando as diferenças estruturais da parede celular bacteriana de (a) Gram-positiva, (b) Gram-negativa (HAMBLIN; HASAN, 2004).

A membrana externa nas bactérias Gram-negativas é responsável por impedir a penetração de várias substâncias, sendo levemente permeável a moléculas grandes e hidrofóbicas. Dessa maneira, uma das dificuldades encontradas com uso da PACT deve-se ao restrito número de FS eficazes para ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ALBRECHT; GITTER, 2006; RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010).

Moléculas de FS neutras e aniônicas vinculam-se à membrana de bactérias Gram-positivas, mostrando inativação fotodinâmica destas. Esses FS vinculam-se apenas à membrana externa de bactérias Gram-negativas, porém não a inativam. As bactérias Gram-negativas podem ser inativadas usando FS juntamente com agentes policatiônicos, como polimixina ou Tris-EDTA, uma vez que o efeito de aditivos provoca modificação na permeabilidade da membrana externa. Porém, a inativação direta de bactérias Gram-negativas também é possível. Moléculas de FS catiônicas são capazes de se ligar a bactérias Gram-negativas, mostrando-se eficientes na sua inativação fotodinâmica (ALVES et al., 2009; BANFI et al., 2006; CAMINOS; DURANTINI, 2007).

Diferentes classes químicas de FS carregados positivamente, incluindo porfirinas, foram testadas com sucesso como agentes FS contra bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas. Além disso, foi observado que o número de cargas positivas, a distribuição de carga e a natureza dos grupos *meso*-substituintes no macrociclo porfirínico parecem ter efeitos diferentes sobre a fotoinativação de ambas as classes (ALVES et al., 2009; BANFI et al., 2006; CAMINOS; DURANTINI, 2007).

A carga positiva na molécula do FS parece promover uma intensa interação eletrostática com os locais de carga negativa na superfície exterior das células bacterianas. Essa associação aumenta a eficiência dos processos de fotoinativação, contudo, derivados porfirínicos com carga negativa ou porfirinas neutras exibem uma baixa atividade na fotoinativação de bactérias Gram-negativa (CAMINOS; DURANTINI, 2007; RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010).

Ragàs e colaboradores investigaram a interação da porfirina catiônica [H₂(TMPyP)] com a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, verificando também a cinética do ¹O₂. Os resultados sugerem uma dupla localização da porfirina nestas bactérias, uma fração da porfirina se vinculou à estrutura externa da parede celular e o restante foi internalizado (ligada a ácidos nucleicos). Eles verificaram que, após

exposição da porfirina à luz, o $^1\text{O}_2$ pôde ser formado tanto fora quanto dentro das células. Além disso, o $^1\text{O}_2$ foi capaz de atravessar a parede celular (RAGÀS; AGUT; NONELL, 2010).

Gois e outros pesquisadores avaliaram a eficácia da PACT, usando duas diferentes fontes de luz (laser, $\lambda = 630 \text{ nm}$, e LED, $\lambda_{\text{máx}} = 628 \text{ nm}$) e diferentes concentrações de um derivado de hamatoporfirina (Photogem®), sobre a viabilidade de cepas de *Staphylococcus aureus*. Os resultados mostraram que a diminuição na viabilidade de micro-organismos é dependente da concentração, ocorrendo uma diminuição no número de bactérias (UFC mL^{-1}) com o aumento da concentração do FS Photogem®. Eles verificaram uma completa eliminação no UFC mL^{-1} (100%) sob iluminação de LED em 60 J cm^{-2} (aproximadamente 1 hora) nas maiores concentrações de FS testadas. Resultado similar ocorreu com a utilização do dispositivo laser, nas mesmas condições mencionadas. Os autores concluíram que ambos os dispositivos, *laser* e LED, são adequados e equivalentes para estudos de PACT *in vitro* (GOIS et al., 2010).

A maioria dos trabalhos publicados sobre PACT são focados em experimentos *in vitro*. A dificuldade da realização de estudos *in vivo* se deve ao fato de que a presença de meios complexos, como sangue, saliva e soro sanguíneo oferecem a certas bactérias proteção contra inativação. Isso ocorre porque as proteínas, presentes nesses meios, absorvem fótons de luz, diminuindo a disponibilidade destes para a interação com o FS. Além disso, as proteínas competem com as bactérias pela afinidade ao FS, diminuindo o número de moléculas de FS ligados a alvos específicos na célula bacteriana (ALBRECHT et al., 2011; ; ALBRECHT; GITTER, 2006; RYSKOVA; BUCHTA; SLEZAK, 2010).

Lambrechts e colaboradores avaliaram a eficácia da PACT, utilizando-se luz visível (lâmpada de halogênio) e a porfirina catiônica cloreto de 5-fenil- 10, 15, 20 (*N*-metil-4-piridil)porfirina, como FS, para inativar três espécies de micro-organismos conhecidos por estarem envolvidos em infecções de queimaduras: a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida Albicans*. Além disso, eles avaliaram a citotoxicidade *in vitro* da PACT sobre fibroblastos dérmicos humanos, na presença de tampão fosfato salino (PBS) e de diferentes concentrações de soro bovino no meio. Os autores concluíram que os fibroblastos mostram-se mais resistentes a PACT em relação aos micro-organismos *S. aureus* e *C. albicans*, sendo a bactéria *P. aeruginosa* mais resistente.

Eles concluíram também que, como o aumento da concentração de soro bovino aumenta-se a resistência dos fibroblastos à PACT, demonstrando o papel protetor do soro bovino no meio (LAMBRECHTS et al., 2005).

Lyon e colaboradores investigaram a aplicação clínica da PACT para o tratamento de cromoblastomicose. Essa patologia caracteriza-se por uma infecção que envolve a pele e o tecido subcutâneo e é causada por fungos. Eles trataram 10 pacientes com cromoblastomicose por meio da PACT, empregando azul de metileno como FS e dispositivo LED ($\lambda_{\text{máx}} = 660 \text{ nm}$) como fonte de luz. Os resultados mostraram que os dez pacientes tratados apresentaram redução na área da lesão após seis aplicações de PACT, ocorrendo uma redução no volume da lesão e cicatrização do tecido de 80 a 90%, quando comparado com as condições prévias da lesão. Porém não houve uma completa cura para nenhum paciente, mostrando a necessidade da combinação da PACT com tratamento à base de antifúngicos (LYON et al., 2011).

1.8 ARTEMIA SALINA

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes. Os ovos de *Artemia salina* são de baixo custo e permanecem viáveis por anos no estado seco, e são disponíveis em lojas como *pet shops* ou lojas de aquaristas (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006; MEYER et al., 1982; SIQUEIRA; BOMM; PEREIRA, 1998).

O ciclo de vida da *Artemia salina* (Figura 1.22) inicia-se a partir dos ovos, que contém um embrião com o metabolismo inativo. Para eclosão, seus ovos devem ser colocados em água salina, assim os ovos se reidratam e entram no primeiro estágio de desenvolvimento, após aproximadamente 24 horas, dando origem aos náuplios, que atingem a fase adulta em duas semanas. O ciclo de vida da *Artemia* completa-se em 21 dias (ARAÚJO, 2002).

Alguns fatores, como temperatura, salinidade, pH e aeração são de grande importância para o cultivo de *Artemia salina*. A temperatura ideal é de 25 a 30 °C, a água deve possuir uma salinidade cuja densidade seja próxima de 1,022 g mL⁻¹ e o pH deve estar próximo de 8,0. O nível de oxigênio deve ser mantido por meio de aeração constante (ARAÚJO, 2002; LIMA et al., 2009; MEYER et al., 1982).

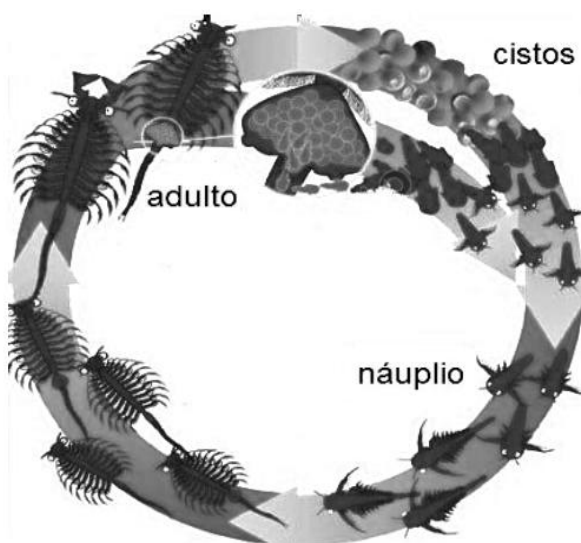


Figura 1.22- Ciclo de vida da *Artemia salina* (<http://aquaflash.blogspot.com/2009/03/32-artemia-alimento-vivo-o-mascota.html>)

Grupos de pesquisa em Química de Produtos Naturais utilizam o ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS) no estudo de substâncias bioativas. Além disso, o ensaio pode ser utilizado para análise de resíduos de pesticidas, de substâncias tóxicas em ambientes marinhos, para avaliar efeito de metais pesados, entre outros. O TAS é um teste rápido, de baixo custo, seguro e não exige técnicas assépticas (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006; SIQUEIRA; BOMM; PEREIRA, 1998).

O TAS pode ser utilizado como avaliação prévia de extratos de plantas, sendo as frações ou substâncias ativas posteriormente testadas em culturas de células tumorais, havendo boa correlação dos resultados (SIQUEIRA; BOMM; PEREIRA, 1998). O monitoramento da resposta no TAS possui como parâmetro a letalidade dos microcrustáceos. Esse teste é, assim, um bioensaio preliminar no estudo de compostos com atividade biológica. Os resultados são facilmente tratados estatisticamente.

As substâncias geralmente são tóxicas em altas concentrações. Uma substância será considerada biologicamente ativa se sua DL_{50} (dose letal média) for menor que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Pelo ensaio com *Artemia salina* é possível determinar a DL_{50} de compostos ativos e extratos em um meio salino (MEYER et al., 1982).

Além dos ensaios de toxicidade, a *Artemia salina* também é utilizada, como ensaio preliminar, para testes de atividade fotodinâmica (BALZER, 2010; GEROLA

et al., 2011; MENDES, 2008; PELOI et al., 2008; SILVA, 2009; SOARES, 2006; SWIECH, 2010).

1.9 ALBUMINA

A albumina é uma proteína solúvel e está presente no plasma humano em concentrações normais de 35 a 50 g L⁻¹. Nos mamíferos ela é sintetizada no fígado e possui uma meia vida de aproximadamente vinte dias. Por ser solúvel e de estrutura flexível, vários compostos se ligam reversivelmente a albumina, que age como principal proteína transportadora do sistema vascular. Ela transporta metais, ácidos graxos, colesterol, pigmentos biliares e fármacos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000; PETERS, 1995).

A albumina de soro bovino (BSA) é a proteína mais abundante no plasma do sangue bovino e é utilizada como modelo de proteína para vários estudos de interação (BOSE; DUBE, 2006; GAO et al., 2007; LI; SEEGER, 2009). A proteína BSA contém 582 aminoácidos, sendo dois triptofanos nas posições 134 e 214, e possui fluorescência intrínseca quando excitada na região do ultravioleta (260-280 nm). A Tabela 1.3 apresenta algumas características espectroscópicas de alguns aminoácidos aromáticos presentes no BSA (GAO et al., 2007; LI; SEEGER, 2009; SILVA, 2007).

Tabela 1.3 - Características espectroscópicas de alguns aminoácidos aromáticos presentes na proteína BSA (SILVA, 2007).

Aminoácido	Nº de resíduos	λ_{exc} (nm)	ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)
Fenilalanina	27	258	193	282
Tirosina	19	275	1405	304
Triptofano	2	279	5580	348
		290	3935	

A fluorescência dessa proteína é dominada pela emissão do triptofano, pois a absorvidade molar do indol desse resíduo é maior em relação aos outros. Pode-

se observar na Tabela 1.3 que o triptofano emite luz em 348 nm quando excitado por luz de comprimento de onda na região de 279 a 290 nm.

As proteínas são os principais alvos de foto-oxidação em células, devido à sua abundância, a presença de cromóforos endógenos (cadeias laterais de aminoácidos) e sua capacidade de se ligar a cromóforos exógenos. Assim, a previsão de consumo de oxigênio singlete para as proteínas é elevada (68,5%) se comparada com outros componentes celulares, como mostra a Figura 1.23 (DAVIES, 2003).

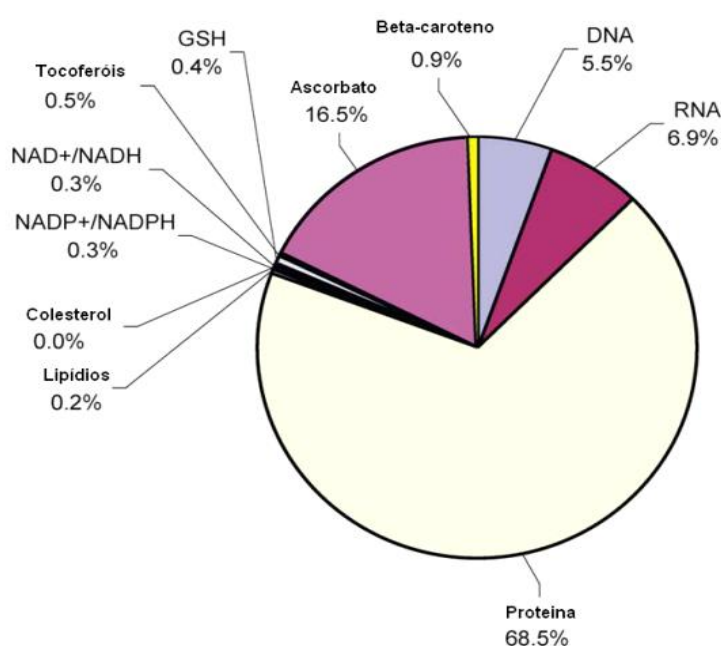


Figura 1.23 - Previsão de consumo de $^1\text{O}_2$ por alvos intracelulares (DAVIES, 2003).

A foto-oxidação de proteínas leva à degradação de seus aminoácidos, reduzindo sua fluorescência intrínseca. Além disso, a fluorescência da proteína também pode ser suprimida pela ligação com um FS. Esse comportamento espectroscópico possibilita uma maneira de estudar as interações entre FS e proteínas (TIAN et al., 2007).

Silvester e colaboradores investigaram a foto-oxidação de BSA por hematoporfirina (Hp, aniônico) e tetrametilpiridinoporfirina (TMPP, catiônico), e verificaram que a foto-oxidação de BSA ocorre nos resíduos de Cis-34, e em um ou nos dois resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-214). Verificaram também que o FS Hp foi responsável por maior supressão de fluorescência de BSA em relação ao

TMPP. Eles verificaram que a foto-oxidação da proteína BSA pode ocorrer por meio do mecanismo de transferência de elétron (Tipo I) como também por meio de transferência de energia (Tipo II) (SILVESTER; TIMMINS; DAVIES, 1998).

Tian e colaboradores investigaram a capacidade de interação entre tetrafenilporfirinas e a proteína BSA por meio dos métodos de fluorescência e UV, obtendo-se os valores das constantes de ligação. Eles verificaram que os compostos porfirínicos estudados foram capazes de se ligar fortemente a BSA, apresentando constante de ligação da ordem de 10^4 (TIAN et al., 2007).

Cavalcante e outros pesquisadores verificaram que alguns fármacos com aplicação clínica em TFD são capazes de foto-oxidar a proteína BSA utilizando-se LED ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) como fonte de luz (CAVALCANTE et al., 2009).

Li e Seeger investigaram a interação do composto *meso*-tetrakis(*p*-sulfonatofenil)porfirina (TPPS) com a proteína BSA em solução tampão fosfato (pH 7,4). A formação do complexo TPPS-BSA foi monitorado por mudanças na absorbância da banda *Soret* e emissão de fluorescência do TPPS, na ausência e na presença de diferentes concentrações de BSA. Eles concluíram que a banda *Soret* em 422 nm refere-se ao complexo TPPS-BSA, que possui constante de ligação de $(4,5 \pm 0,9) \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Além disso, eles investigaram a interação de BSA-TPPS por meio do decaimento do tempo de vida de fluorescência do BSA na ausência e na presença de diferentes concentrações de TPPS. A ligação entre o TPPS e BSA foi demonstrada pela diminuição do tempo de vida de fluorescência. O tempo de vida de fluorescência do TPPS livre foi de 5,21 ns, e para o complexo BSA-TPPS foi de 2,71 ns (LI; SEEGER, 2009).

1.10 TRANSPORTE E LOCALIZAÇÃO DE FS

A atividade fotodinâmica de um FS não é governada apenas por suas propriedades fotofísicas, mas também por sua especificidade de interação com biosistemas. Assim a localização de FS em células tumorais é uma propriedade importante, que pode afetar os resultados de morte celular.

O plasma sanguíneo é constituído por 90% de água e 10% de solutos, sendo que cerca de 70% dos solutos presentes no plasma são proteínas. Devido a essa abundância, o transporte de FS até as células é feito por proteínas presentes

no plasma. Após a administração do FS na corrente sanguínea, este irá se associar com proteínas, incluindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e albumina. A natureza dessa associação depende das características do FS e da proteína. A relação entre o caráter hidrofílico e hidrofóbico do FS influencia no seu transporte e localização nas células (BONNEAU; MORLIÈRE; BRAULT, 2004; LEHNINGER; NELSON; COX, 2000; SHARMAN; VAN LIER; ALLEN, 2004).

A razão da preferencial acumulação dos FS em células tumorais foi explicada, inicialmente, devido ao fato de essas células possuírem um elevado número de receptores de proteínas LDL. Esse elevado número de receptores para LDL deve-se à alta exigência de colesterol por células de proliferação rápida, sendo LDL a principal proteína transportadora de colesterol (BONNEAU; MORLIÈRE; BRAULT, 2004; SHARMAN; VAN LIER; ALLEN, 2004).

Kongshaug e colaboradores estudaram a correlação entre a lipofilicidade (caráter apolar) de alguns FS porfirínicos e a capacidade de se vincularem com proteínas do plasma humano. Os estudos apontaram que a proteína LDL não é a única envolvida no processo de transporte de FS, outras proteínas plasmáticas, como HDL e soroalbuminas também podem desempenhar um papel importante no transporte, bem como na retenção seletiva desses FS em tumores (KONGSHAUG; MOAN; BROWN, 1989).

Os pesquisadores verificaram que, em geral, a interação das porfirinas com o LDL aumenta com o aumento da lipofilicidade dessas. E que, ao contrário, a interação das porfirinas com proteínas, principalmente a proteína albumina de soro humano (HSA), diminui com o aumento da lipofilicidade. Porém, eles verificaram, também, que fatores como natureza química dos grupos laterais dos FS, agregação e distribuição de carga desempenham um papel importante para essa interação (KONGSHAUG; MOAN; BROWN, 1989).

Atualmente, acredita-se que os FS hidrofílicos tendem a associar-se com albuminas e globulinas do plasma, enquanto os FS lipofílicos associam-se às lipoproteínas, principalmente as LDL (BONNEAU; MORLIÈRE; BRAULT, 2004; CUNDERLÍKOVÁ et al., 2000).

O acúmulo preferencial dos FS em tecidos tumorais também pode ser explicado pelas características fisiológicas diferenciadas do tecido doente em relação ao tecido sadio. Estudos mostraram que, os tecidos tumorais possuem pH inferior a tecidos sadios. Enquanto o pH de células sadias é de aproximadamente

7,4, o pH em células tumorais é de aproximadamente 6,9 (GERWECK; SEETHARAMAN, 1996; TANNOCK; ROTIN, 1989). Essa propriedade, aliada ao maior número de receptores LDL em células tumorais, pode influenciar a captação do FS, uma vez que FS hidrofílicos tornam-se mais hidrofóbicos (lipofílicos) por meio de sua protonação, que pode aumentar sua ligação a lipoproteínas, facilitando sua entrada nas células. Além disso, o fato de as células tumorais crescerem desordenadamente, resultando em um volume celular maior e apresentarem drenagem linfática deficitária, também leva a maior captação do FS (BOHMER; MORSTYN, 1985; KUBÁT; LANG; ANZENBACHER, 2004).

A maioria dos FS fluorescem, assim a preferencial localização de alguns FS em diferentes tipos de células tumorais pode ser investigada (MORGAN; OSEROFF, 2001). A Figura 1.24 mostra a seletividade da protoporfirina IX após administração de metil aminolevulínico, mostrando a acumulação preferencial da porfirina no tumor em relação à pele saudável (BROWN et al., 2004).

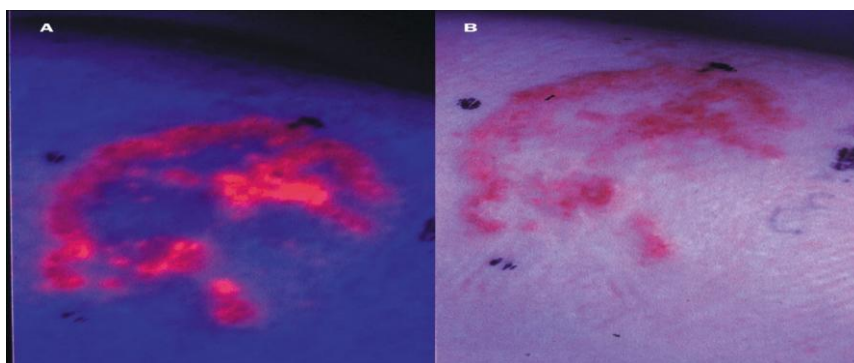


Figura 1.24 - Seletividade do metil aminolevulínico no tumor. (a) O padrão de fluorescência induzida por metil aminolevulínico é claramente limitado ao tecido tumoral; (b) quando comparado com o contorno do tumor, visto sob luz branca (BROWN et al., 2004).

Muitas porfirinas base livre e metaloporfirinas com metais de camada completa apresentam fluorescência. Zheng e colaboradores estudaram a emissão de fluorescência de várias porfirinas base livre e metaladas. Eles verificaram dois picos de emissão tanto para as porfirinas base livre (~650 e 720 nm) como para as metaloporfirinas (~600 e 650 nm) (ZHENG et al., 2008).

A técnica de fluorescência tem várias aplicações, ela pode ser empregada em fotodeteção para diagnosticar lesões tumorais, além de ser aplicada em estudos para investigar interações entre FS e proteínas. Compostos porfirínicos são

geralmente citados na fotodetecção em tecidos tumorais, por meio da fluorescência vermelha que eles emitem. Isso pode ser possível uma vez que esses compostos ficam retidos preferencialmente em tecidos neoplásicos quando comparado com tecidos normais (BROWN et al., 2004; LI; SEEGER, 2009; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001; RINCO et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a eficiência fotodinâmica, por meio de medidas espectroscópicas e ensaios biológicos, dos seguintes derivados porfirínicos: 5,10,15,20-tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil)porfirinato de sódio, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, 5,10,15,20-tetrakis (2,6-difluoro-5-sulfonatofenil) zinco II porfirinato de sódio, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, e 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatofenil) manganês (III) porfirinato de sódio, $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a absorvidade molar (ϵ) dos compostos em solução tampão fosfato.
- Verificar a possível fotodegradação dos compostos por meio do teste de fotobranqueamento.
- Analisar a capacidade de produção de oxigênio singlete dos compostos por meio do teste do ácido úrico.
- Investigar a eficiência de cada composto em causar a foto-oxidação da proteína BSA.
- Determinar a toxicidade e a eficiência fotodinâmica dos compostos frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.
- Avaliar a eficiência fotodinâmica dos compostos sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* de origem ATCC e hospitalar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Neste estudo foram utilizados os seguintes derivados porfirínicos aquo-solúveis: $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ (Figura 3.1 a), $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ (Figura 3.1 b) e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ (Figura 3.2). Os três compostos foram sintetizados pelo grupo de pesquisa da Prof.^a Dr.^a Shirley Nakagaki do Laboratório de Bioinorgânica e Catálise da Universidade Federal do Paraná, e foram cedidos para o desenvolvimento desta pesquisa.

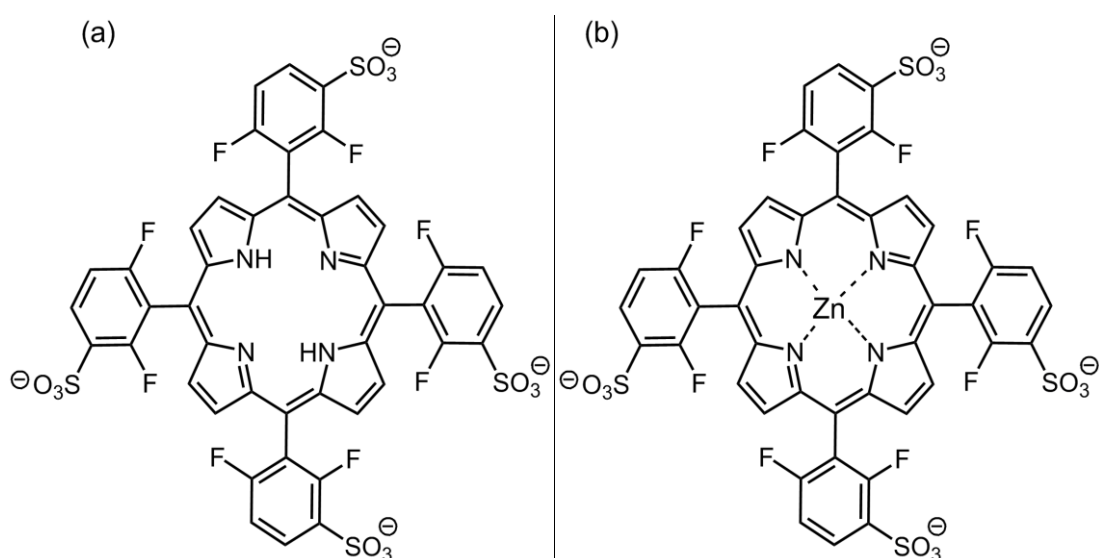


Figura 3.1 - Estrutura dos derivados porfirínicos (a) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e (b) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$.

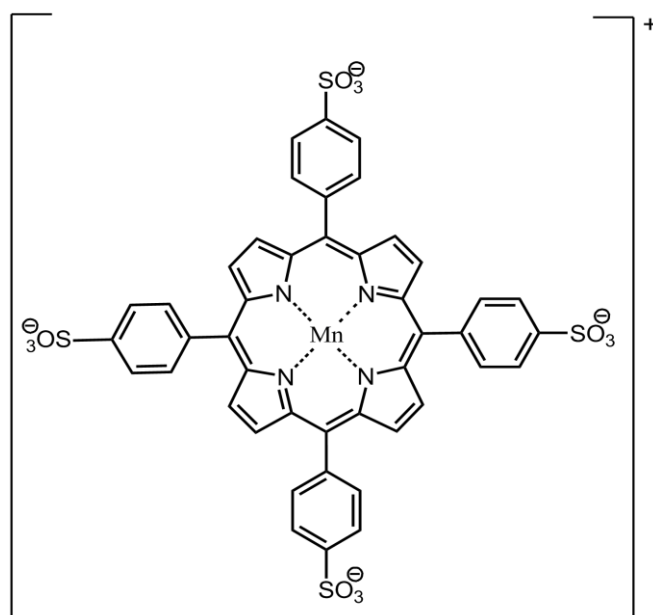


Figura 3.2 - Estrutura do derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$.

Para irradiação dos derivados porfirínicos foram utilizados sistemas de LED de diferentes faixas de emissão de comprimento de onda: alaranjado (emissão na faixa de 550 a 620 nm), vermelho (590 a 650 nm), verde (470 a 560 nm) e azul (420 a 500 nm), e potência entre 0,5 e 5 mW. O sistema de iluminação é composto por seis dispositivos LED dispostos em série, como mostra a Figura 3.3 (PELOI et al., 2008). O aparato utilizado para iluminação das soluções está apresentado na Figura 3.4.

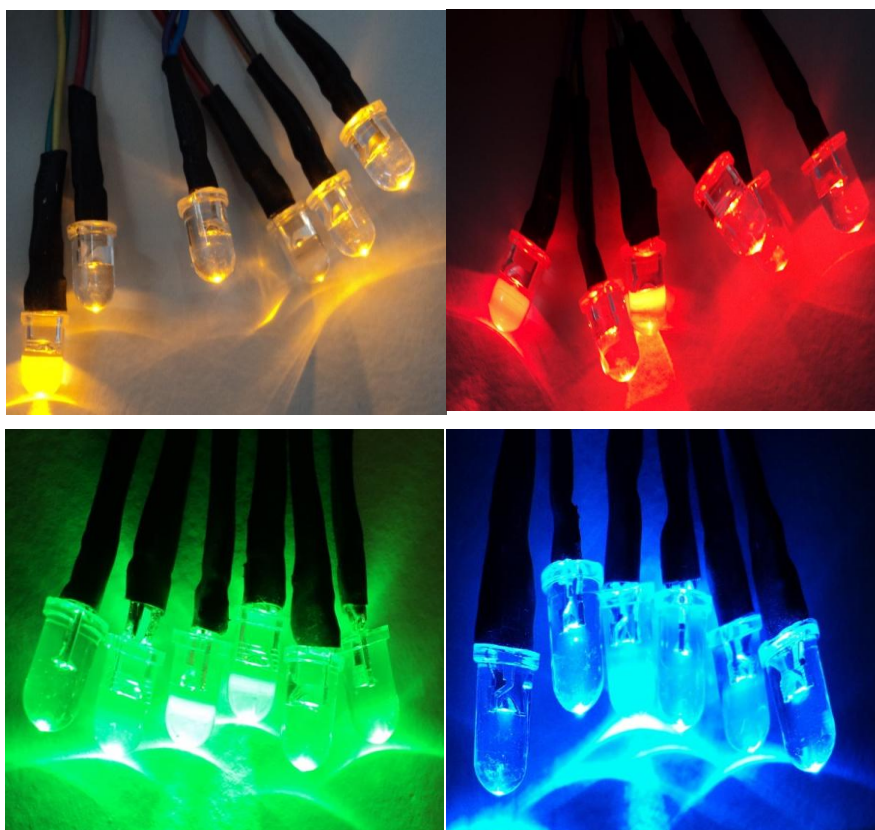


Figura 3.3 - Sistema de LED utilizados: alaranjado, vermelho, verde e azul.

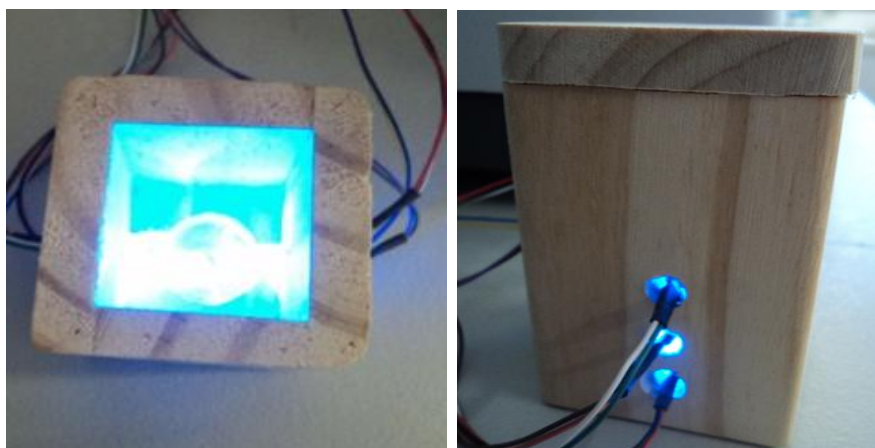


Figura 3.4 - Aparato utilizado para iluminação das soluções.

Os espectros de emissão dos LEDs foram obtidos em um Fluorímetro Cary Eclipse Varian, operando no modo luminescência e utilizando-se fenda de emissão de 1,5 nm.

As soluções dos compostos porfirínicos foram preparadas em concentrações na faixa de 1,0 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando-se água destilada.

A proteína albumina de soro bovino, BSA (INLAB, $\text{MM}=66,267 \text{ g mol}^{-1}$), foi utilizada para o teste de foto-oxidação.

Para preparar a solução de tampão fosfato salino (PBS) foram utilizados os seguintes reagentes: fosfato de potássio monobásico anidro, KH_2PO_4 (Vetec, $\text{MM} = 136,09 \text{ g mol}^{-1}$), fosfato de potássio dibásico anidro, K_2HPO_4 (BIOTEC, $\text{MM} = 174,18 \text{ g mol}^{-1}$) e cloreto de sódio, NaCl (BIOTEC, $\text{MM} = 58,44 \text{ g mol}^{-1}$). Todos os reagentes utilizados são de qualidade PA.

Para os testes com *Artemia salina* foram utilizados ovos de alta eclosão (Miramar®) lote 05061 e sal marinho Ocean Reef (PRODAC) com grau de pureza próximo a 100%. Nos testes de toxicidade foi utilizado dicromato de potássio, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merck, $\text{MM} = 294,19 \text{ g mol}^{-1}$) como controle positivo. Para oxigenação do aquário utilizou-se uma bomba BOYU®, modelo U-3600.

Os testes microbiológicos foram realizados utilizando-se Agar Mueller Hinton (Himedia) como meio de cultura. Utilizou-se um espectrofotômetro Coleman 6/8 Perkin-Elmer Junior III e estufa microbiológica QUIMIS. As fotos foram registradas utilizando-se uma câmera digital Sony Cyber-shot DSC W310, com resolução de 12.1 megapixels.

Foram utilizados a balança analítica eletrônica Q-500L210C QUIMIS e o pHmetro NTPhm C.G.C. Para centrifugar a solução de BSA utilizou-se centrífuga BE-4004 Bio Eng.

As medidas de absorção foram realizadas na região do ultravioleta e visível, utilizando-se espectrofotômetro Cary 100 Varian. Utilizaram-se cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm e 2 faces polidas.

O Fluorímetro Cary Eclipse Varian foi utilizado para medidas de fluorescência, com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm e 4 faces polidas. Os parâmetros de configuração do aparelho foram: voltagem da fotomultiplicadora: 600 V, velocidade de varredura: 600 nm min^{-1} , fenda de excitação e emissão de 5 nm. Foi utilizado comprimento de onda de 279 nm para excitação.

3.2 DETERMINAÇÃO DE ABSORTIVIDADE MOLAR DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS EM TAMPÃO FOSFATO

A absorptividade molar (ϵ) é uma característica intrínseca das substâncias e indica a quantidade de luz absorvida em determinado comprimento de onda. A lei de Lambert-Beer relaciona a absorptividade molar de uma substância à absorbância A , ao caminho óptico b e a concentração c .

$$A = \epsilon b c \quad (\text{equação 12})$$

Onde:

A = absorbância (adimensional)

ϵ = absorptividade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

b = caminho óptico (cm)

c = concentração da espécie absorvente (mol L^{-1})

De acordo com a lei de Lambert-Beer a concentração da espécie absorvente é proporcional a sua absorbância (A). Para determinar a absorptividade molar (ϵ) das bandas de absorção apresentadas pelos derivados porfirínicos foram preparadas cinco concentrações diferentes na faixa de 1,0 a 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os espectros de absorção ópticos de cada solução foram registrados na faixa de 300 a 700 nm. O ϵ das bandas investigadas foi obtido por meio da lei de Lambert-Beer.

3.3 ANÁLISE DE FOTOBRANQUEAMENTO DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS

Uma maneira de medir o fotobranqueamento de um FS é irradiá-lo com luz visível e monitorar o comportamento de seu espectro de absorção durante um determinado período. Caso ocorra fotobranqueamento, ele será detectado por meio da queda na intensidade de sua absorbância característica (BONNETT; MARTÍNEZ, 2002; GEROLA et al., 2011; SOARES, 2006).

Para analisar a possível fotodegradação dos derivados porfirínicos, preparou-se uma solução do composto $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ com concentração 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e soluções dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ na concentração 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em PBS. As soluções foram iluminadas utilizando-se

sistemas de LED vermelho, alaranjado, verde e azul, separadamente. O espectro de absorção das soluções foram registrados na faixa de 300 a 700 nm, monitorando-se o comportamento dos espectros a cada 10 minutos de exposição ao sistema de LED, por um período total de 60 minutos. Calculou-se a porcentagem de fotobranqueamento para cada sistema FS/LED. Os testes de fotobranqueamento foram realizados em triplicata.

3.4 TESTE DE FOTO-OXIDAÇÃO DE BSA

Por meio deste experimento investigou-se a eficiência do sistema derivado porfirínico/LED em causar foto-oxidação da proteína albumina de soro bovino (BSA). A foto-oxidação de BSA leva a uma diminuição de sua fluorescência intrínseca. Dessa forma, a eficiência fotodinâmica pode ser determinada por meio de cálculos dos valores das constantes de velocidade de foto-oxidação da proteína (CAVALCANTE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2007; SILVA, 2007).

Uma solução contendo $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de derivado porfirínico e $2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de BSA foi preparada em tampão fosfato (pH = 7,2). Essa solução foi irradiada durante 60 minutos com sistema de LED vermelho, alaranjado, verde e azul, separadamente. Nesse período, a cada 10 minutos de iluminação, acompanhou-se a foto-oxidação de BSA por meio da variação da intensidade do seu máximo de fluorescência, em 345 nm. Utilizou-se comprimento de onda de excitação de 279 nm. Os testes de foto-oxidação foram realizados em triplicata.

A partir do tratamento de dados foram obtidas as constantes de velocidade de foto-oxidação para cada um dos derivados porfirínicos por meio dos cálculos descritos a seguir.

3.4.1 Cálculo das constantes de velocidade

O oxigênio singlete é a principal espécie responsável pela foto-oxidação de biomoléculas. A geração dessa espécie reativa se dá por meio das reações do Tipo II, que estão representadas abaixo (BONNETT, 1995):



Onde:

${}^0\text{FS}$ = FS no estado singlete fundamental

${}^1\text{FS}$ = FS no estado singlete excitado

${}^3\text{FS}$ = FS no estado triplete excitado

${}^1\text{O}_2$ = Oxigênio singlete

O_2 = Oxigênio triplete (estado fundamental)

S = Substrato

k_1 e k_2 = Constante de velocidade

A última etapa (Equação 7) foi considerada como a mais lenta, assim ela determina a velocidade da reação:

$$d[\text{S}] / dt = -k_2 [{}^1\text{O}_2] \cdot [\text{S}] \quad (\text{equação 8})$$

Sendo k_2 a constante de velocidade de segunda ordem.

A concentração de O_2 é muito maior que a concentração da biomolécula de BSA. Como a concentração O_2 é proporcional a de ${}^1\text{O}_2$, pode-se considerar que a concentração de ${}^1\text{O}_2$ é aproximadamente constante. Portanto:

$$d[\text{S}] / dt \sim -k[\text{S}] \quad (\text{equação 9})$$

Integrando-se:

$$\ln ([\text{S}]/[\text{S}_0]) = -kt \quad (\text{equação 10})$$

Onde:

[S] = concentração do substrato (BSA) num dado momento

[S₀] = a concentração inicial (t = 0) do substrato

t = tempo

k = constante de velocidade da reação de foto-oxidação

A concentração do substrato (S) é proporcional à intensidade de fluorescência (F) da proteína BSA, assim, pode-se reescrever a equação 10:

$$\ln (F/F_0) = -kt \quad (\text{equação 11})$$

Essa equação indica que a cinética global é de pseudo-primeira ordem, uma vez que o gráfico de $\ln(F/F_0)$ contra t é uma reta cujo coeficiente angular é -k e corresponde à constante de velocidade de foto-oxidação (CAVALCANTE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2007). A eficiência fotodinâmica dos derivados porfirínicos foi avaliada com base nos valores determinados das constantes de velocidades de foto-oxidação da molécula de BSA. Os valores dessas constantes foram normalizados pelos valores de absorbância dos compostos analisados nos comprimentos de onda de emissão máxima dos LEDs alaranjado ($\lambda_{\text{máx}} = 596 \text{ nm}$), vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 632 \text{ nm}$), verde ($\lambda_{\text{máx}} = 513 \text{ nm}$) e azul ($\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$), uma vez que os derivados porfirínicos possuem diferentes valores de absortividade molar nos comprimentos de onda apresentados.

3.5 AVALIAÇÃO DA FOTO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ÚRICO

O teste do ácido úrico (AU) foi utilizado para analisar a capacidade de geração de oxigênio singlete dos derivados porfirínicos (CAVALCANTE et al., 2009; FISCHER et al., 1998; MAESTRIN et al., 2004; SOARES, 2006). Uma solução contendo AU, na concentração $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e os compostos $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, foram preparadas separadamente em PBS. O espectro de absorção das soluções foi registrado na faixa de 200 a 800 nm, monitorando-se o comportamento dos espectros a cada 10 minutos de exposição ao sistema de LED verde e azul, por um período total de 60 minutos. A capacidade de geração de oxigênio singlete dos FS

foi estimada com base na porcentagem de decaimento da banda do AU em 292 nm. Os testes de AU foram realizados em triplicata.

3.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO

3.6.1 Ensaio com *Artemia salina*

3.6.1.1 Incubação

Os ovos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir no interior de um aquário preenchido com 2 L de solução de sal marinho ($35,0 \text{ g L}^{-1}$), preparada com água destilada e deionizada. A solução do aquário foi mantida sob aeração constante com o auxílio de uma bomba BOYU®, modelo U-3600.

O aquário possui uma divisão interna contendo pequenos orifícios entre dois compartimentos. Um compartimento foi iluminado com uma lâmpada fria de 14 W para atrair os microcrustáceos eclodidos e o outro compartimento, protegido da luz, onde os ovos foram adicionados. A temperatura foi controlada para permanecer entre 20-25 °C. O pH foi ajustado entre 8,0 e 8,5. A contagem dos microcrustáceos ocorreu após 48 horas.

3.6.1.2 Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

Após a contagem, os dez microcrustáceos de *Artemia salina* foram transferidos para poços de cultura de célula, com o auxílio de uma micropipeta de 1000 µL. Em seguida adicionou-se a solução dos derivados porfirínicos, de modo que foram testadas as concentrações: 0,1; 1,0 e 10,0 µmol L⁻¹. Posteriormente, acrescentou-se solução de sal marinho ($35,0 \text{ g L}^{-1}$), em quantidade suficiente para completar o volume final de 3,0 mL em cada poço. Os poços foram protegidos da luz, e os microcrustáceos permaneceram em contato com a solução dos compostos durante 3 e 24 horas. Após esses períodos, com o auxílio de uma lupa, realizou-se a contagem dos microcrustáceos vivos e mortos em cada poço. Foi utilizado um

controle positivo, com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), e um controle negativo, somente com água salina. Os resultados foram analisados por meio da porcentagem de letalidade dos microcrustáceos (GEROLA et al., 2011; PELOI et al., 2008; SOARES, 2006).

3.6.1.3 Avaliação de atividade fotodinâmica frente à *Artemia salina*

Após a contagem, os 20 microcrustáceos de *Artemia salina* foram transferidos para poços de cultura de célula, da mesma maneira descrita para o teste de toxicidade (seção 3.6.1.2), utilizando-se as mesmas concentrações dos compostos porfirínicos.

As amostras foram divididas em quatro grupos: L-P- (ausência de luz e ausência de FS), L-P+ (ausência de luz e presença de FS), L+P- (presença de luz e ausência de FS) e L+P+ (presença de luz e presença de FS).

As amostras permaneceram por um período de 1 hora sem iluminação. Após esse período, os grupos L+P- e L+P+ foram iluminados durante 2 horas, em seguida, realizou-se a contagem dos microcrustáceos vivos e mortos em cada poço. Os resultados foram analisados por meio da porcentagem de letalidade dos microcrustáceos. Os testes com *Artemia salina* foram realizados em triplicata.

3.6.2 Avaliação de atividade fotodinâmica em cultura de micro-organismos

Para realização deste teste foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC (6538) e hospitalar. As cepas hospitalares foram obtidas do Hospital Bom Jesus, localizado em Ponta Grossa-Paraná. As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina 0,9% de NaCl. Foram realizadas leituras em um espectrofotômetro Coleman a 580 nm, até que a absorbância das suspensões atingisse aproximadamente 0,8, que corresponde a cerca de 10^8 UFC mL⁻¹, a qual foi diluída em solução salina, até que a concentração atingisse o equivalente a 10^5 UFC mL⁻¹. A partir dessa suspensão, transferiu-se uma alíquota de 100 µL em tubos contendo 900 µL de solução salina ou solução dos derivados porfirínicos $Na_4[Zn(TDFSPP)]$ e $Na_4[H_2(TDFSPP)]$ na concentração 1,0 µmol L⁻¹. Os tubos foram divididos em quatro grupos: L-P- (ausência de luz e ausência de FS), L-P+ (ausência

de luz e presença de FS), L+P- (presença de luz e ausência de FS) e L+P+ (presença de luz e presença de FS)

Os tubos permaneceram 30 minutos sem iluminação. Após esse período, os grupos L+P+ e L+P- foram iluminados com o sistema de LED azul ou verde durante 3 horas, sendo que, após 1 e 3 horas uma alíquota de 20 μL da suspensão (10^4 UFC mL^{-1}) foi semeada em placas de Petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton. Os grupos L-P- e L-P+ permaneceram sem iluminação e foram semeados nos mesmos períodos de tempo. Os tubos foram homogeneizados manualmente antes de cada semeadura. As placas foram levadas para estufa, onde permaneceram por 24 horas a 37 °C. Após esse período, as placas foram fotografadas e as colônias de bactérias foram contadas.

Os testes com micro-organismos foram realizados em duplicata. A atividade fotodinâmica dos sistemas derivado porfirínico/LED sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* foi investigada por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Um valor de $p < 0.05$ foi considerado significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA ABSORTIVIDADE MOLAR DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS EM TAMPÃO FOSFATO

Uma das técnicas empregadas para caracterização de porfirinas e seus derivados é a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, uma vez que esses compostos possuem absorção nessa faixa de comprimento de onda.

Os espectros de absorção característicos dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ são apresentados na Figura 4.1.

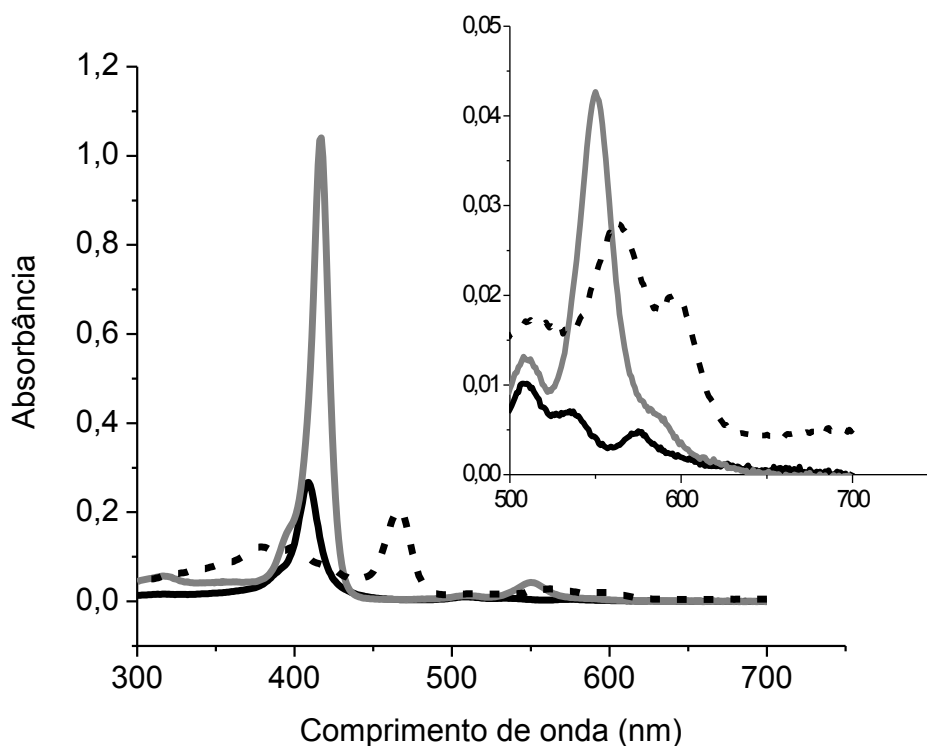


Figura 4.1 - Espectros de absorção no UV-Vis dos derivados porfirínicos (—) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, (---) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ e (.....) $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$, $[\text{FS}] \approx 3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, em PBS e espectros expandidos na faixa das bandas Q.

Os compostos apresentaram bandas características dos derivados porfirínicos na região do UV-Vis, observadas devido às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel porfirínico. Observa-se uma banda intensa na região de 400 nm, banda *Soret*, e, na

região de 500 a 700 nm são observadas as bandas Q, as quais possuem intensidade cerca de dez vezes menor em relação à banda *Soret*.

Quando um metal é coordenado ao anel porfirínico ocorre uma conjugação dos orbitais do metal com os elétrons π do anel. O metal torna-se mais eletropositivo, aumentando a energia deste orbital. O resultado desse aumento de energia pode ser observado por um deslocamento do espectro de metaloporfirinas para o vermelho e/ou aumento de intensidade da banda (GOUTERMAN, 1961).

Na Figura 4.1, pode-se observar que o derivados porfirínico metalado $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ apresentou maior absortividade molar e deslocamento de comprimento de onda para o vermelho, se comparado com a base livre, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$.

Os cálculos de absortividade molar (ϵ) dos derivados porfirínicos foram realizados utilizando cinco concentrações diferentes e, então, montou-se o gráfico da absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ dos compostos *versus* a concentração. Na Figura 4.2 é apresentado o gráfico obtido para o derivado $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$. O comportamento linear observado indica que o composto apresenta forma única na faixa de concentração estudada. Comportamento semelhante foi observado para os compostos $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$.

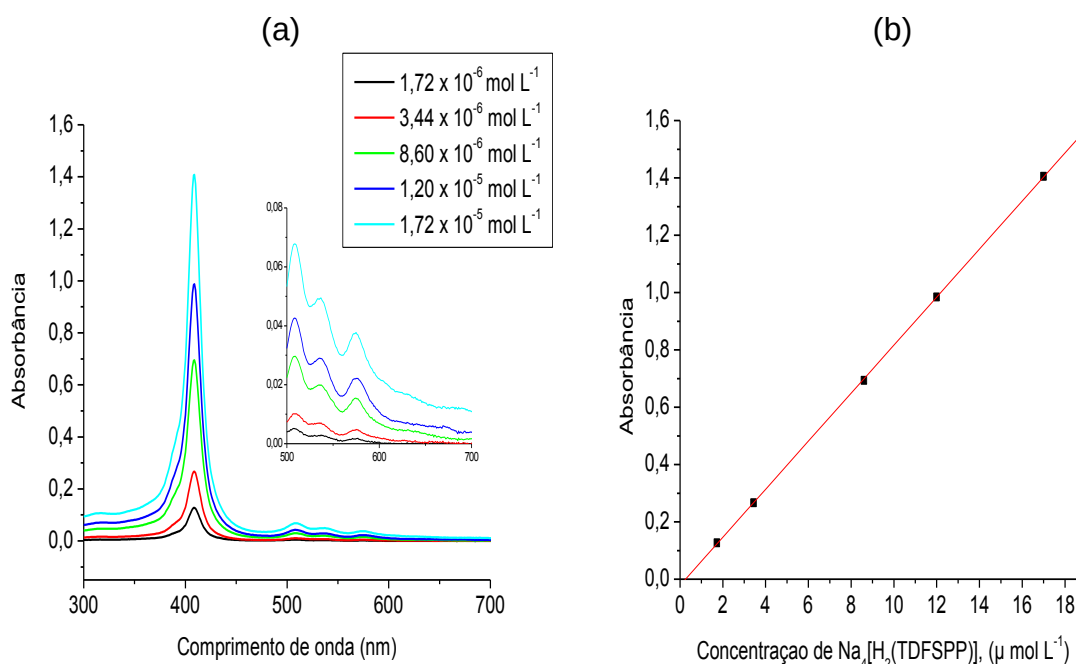


Figura 4.2 - (a) Espectros de absorção no UV-Vis do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ em PBS e espectros expandidos na faixa das bandas Q em diferentes concentrações, (b) Gráfico da variação da absorbância em 408 nm versus a concentração de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$.

Os $\lambda_{\text{máx}}$ para cada banda, assim como a absorptividade molar (ϵ) calculada para cada derivado porfirínico é apresentada na Tabela 4.1. Balzer determinou a absorptividade dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$, utilizando como solvente a água. Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os resultados apresentados por Balzer, para os mesmos compostos, observou-se concordância em relação à posição dos máximos de absorção e valores de ϵ próximos. Para a banda *Soret* dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$, Balzer encontrou ϵ de 134000 e 238000 $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, respectivamente (BALZER, 2010). O meio empregado para as duas determinações deve ser fator principal das diferenças de absorptividade molar observadas.

De acordo com a Tabela 4.1 pode-se observar que houve um deslocamento para o vermelho no $\lambda_{\text{máx}}$ das bandas do composto $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ em relação ao composto $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$. Além disso, os valores de ϵ são maiores para o derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$. Essas diferenças em relação às propriedades espectrais destes derivados porfirínicos ocorrem devido à coordenação do metal Zn (II) aos nitrogênios no centro no anel porfirínico do composto $\text{Na}_4[(\text{H}_2\text{TDFSP})]$.

Tabela 4.1 – Absorptividade molar (ϵ) e comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) para as bandas de absorção dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ em PBS.

Derivado porfirínico	<i>Soret</i> λ (nm)	ϵ ($\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)	QI λ (nm)	ϵ ($\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)	QII λ (nm)	ϵ ($\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)	QIII λ (nm)	ϵ ($\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
$\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$	408	82900	507	4000	535	2920	573	2270
$\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$	416	310000	509	4450	550	13600	588	2370
$\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$	466	54100	513	4024	562	6920	596	4850

Os valores de ϵ e $\lambda_{\text{máx}}$ para o derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ foram determinados por Harriman e Porter em meio aquoso (pH 7,00). Para a banda *Soret*, os autores observaram $\lambda_{\text{máx}}$ em 469 nm e ϵ de 95000 $\text{L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (HARRIMAN; PORTER, 1979).

Kadish e colaboradores determinaram valores de $\lambda_{\text{máx}}$ para as bandas de absorção da porfirina base livre $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TSPP})]$ em meio aquoso, encontrando quatro bandas de absorção: 418 (*Soret*), 515, 554, 590 e 642 nm. Os autores verificaram que na concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ o derivado porfirínico encontra-se em sua forma monomérica (KADISH et al., 1989). De acordo com a Tabela 4.1, observa-se, então, que o composto $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ apresenta um valor para o $\lambda_{\text{máx}}$ de 466 nm, portanto houve um deslocamento para o vermelho, quando comparado ao valor de Kadish. Esse deslocamento deve-se a presença do metal Mn(III), o que está de acordo com os espectros típicos de metaloporfirinas.

4.2 ANÁLISE DE FOTOBANQUEAMENTO DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS

Fotobranqueamento envolve reações químicas induzidas pela luz, que levam a redução na concentração do FS, com mudanças em suas características espectroscópicas, que pode ser prejudicial no uso da terapia fotodinâmica.

Para investigar a possível degradação dos derivados porfirínicos, as soluções dos compostos estudados foram iluminadas utilizando-se sistemas de LED com emissão em diferentes faixas de comprimento de onda na região da luz visível. Os espectros de emissão dos LEDs e seus comprimentos de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) são apresentados na Figura 4.3.

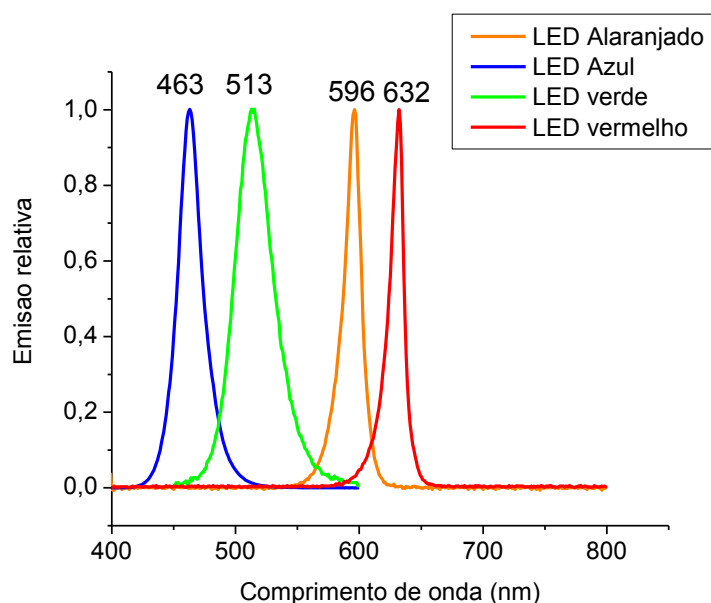


Figura 4.3 - Espectros de emissão normalizados dos sistemas de LED utilizados.

Existem dois tipos irreversíveis de fotobranqueamento que levam a mudanças na estrutura química de cromóforos: fotomodificação ou fotobranqueamento verdadeiro. Na fotomodificação ocorre redução na intensidade de absorbância ou de fluorescência em alguns comprimentos de onda do cromóforo, em decorrência de alterações estruturais resultantes de reações de fotoadição ou fotociclização, levando ao surgimento de uma nova banda, que se deve ao cromóforo em sua forma modificada. No fotobranqueamento verdadeiro as mudanças na estrutura dos cromóforos resultam na formação de pequenos fragmentos, decorrentes de reações de fotoredução ou foto-oxidação, que não possuem apreciável absorção na região do visível, ocorrendo diminuição da intensidade de absorbância (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001).

Os resultados do teste de fotobranqueamento para os derivados porfíricos associados aos sistemas de LED são ilustrados nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6, a seguir.

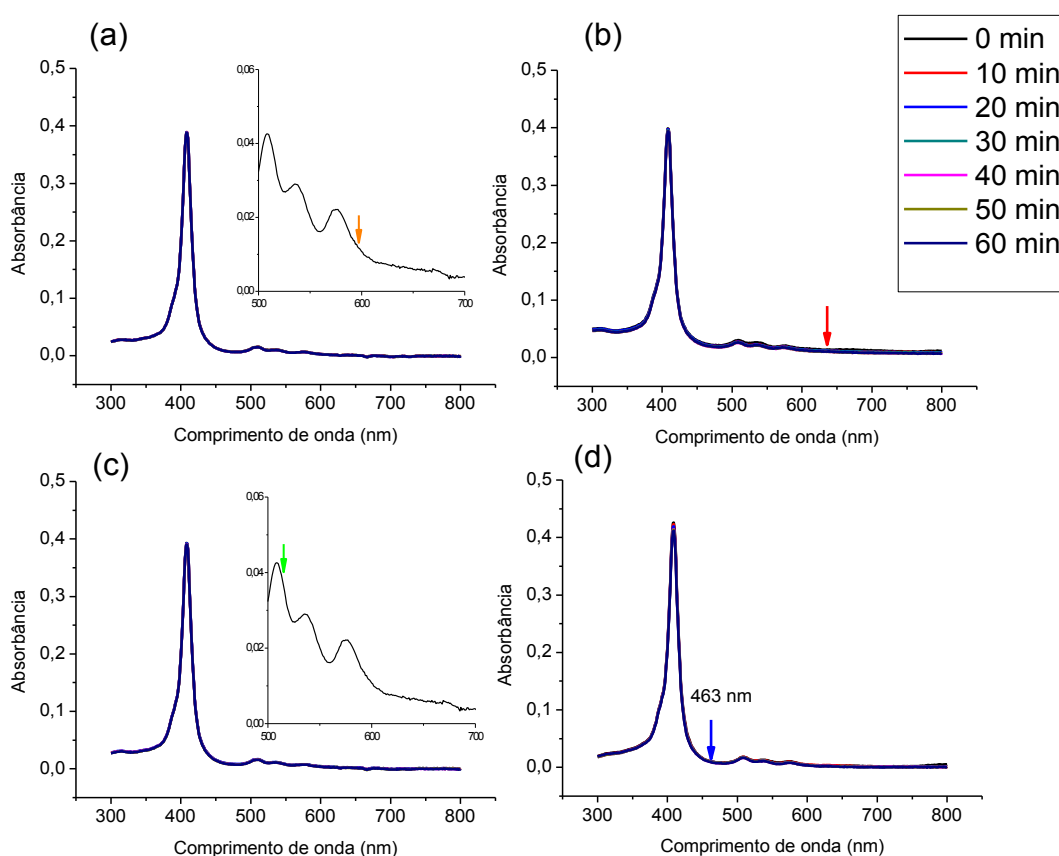


Figura 4.4 - Espectros de absorção no UV-Vis do derivado porfírico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS irradiado com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos, as setas indicam o $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ de emissão de cada sistema de LED utilizado.

Pode-se observar que o derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ manteve suas características espectroscópicas, ou seja, não houve deslocamento nem redução das bandas de absorção mesmo após 60 minutos de exposição aos diferentes sistemas de LED investigados. As Figuras 4.5 e 4.6, a seguir, mostram que o mesmo ocorreu para os compostos $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, que permaneceram estáveis frente ao sistemas de LED alaranjado, vermelho, verde e azul. Os átomos de halogênio nas posições orto do grupo fenila tornam o macrociclo porfirínico dos compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ estáveis, o que pode explicar a estabilidade destes compostos frente aos sistemas de LED.

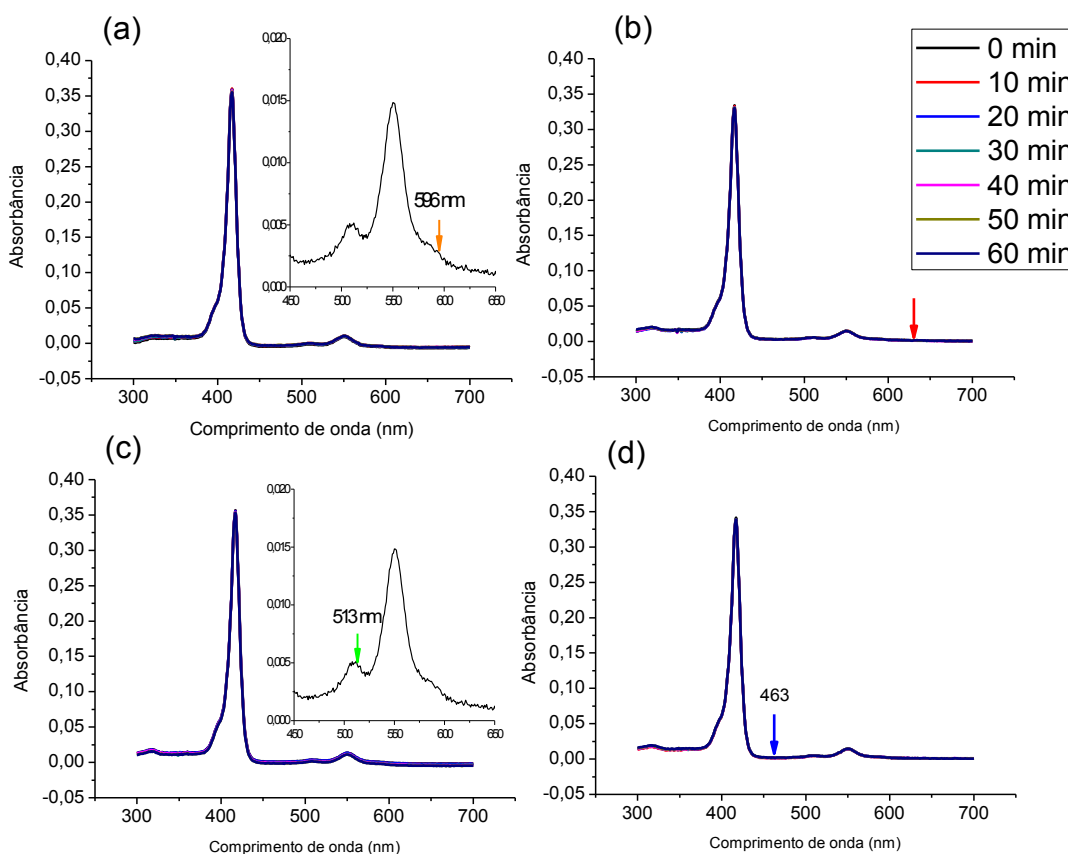


Figura 4.5 - Espectros de absorção no UV-Vis do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS irradiado com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos, as setas indicam o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de cada sistema de LED utilizado.

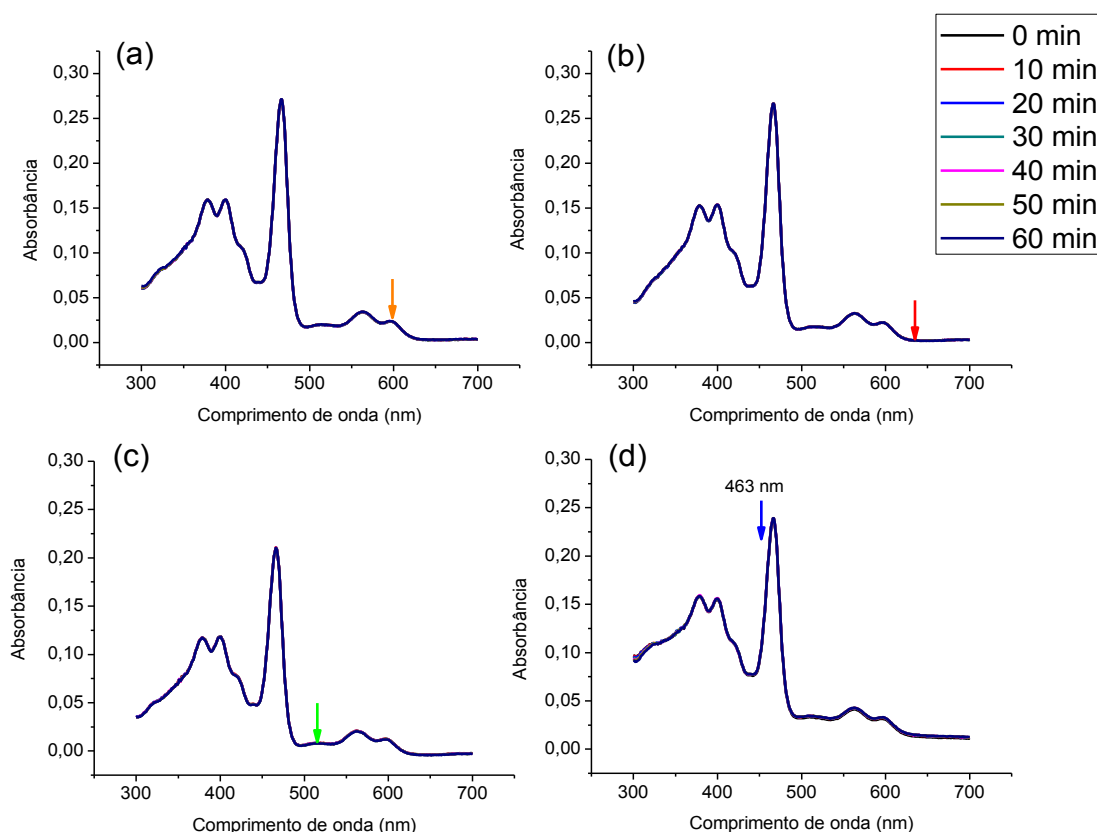


Figura 4.6 - Espectros de absorção no UV-Vis do derivado porfirínico $\{Na_4[Mn(TSPP)]\}^+$ $5,0 \mu mol L^{-1}$ em PBS irradiado com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos, as setas indicam o $\lambda_{m\acute{a}x}$ de emissão de cada sistema de LED utilizado.

Os resultados apresentados nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 indicam que os derivados porfirínicos analisados, associados aos sistemas de iluminação empregados, não sofreram fotomodificação, uma vez que não houve surgimento de novas bandas de absorção. Assim, não houve modificação na estrutura química dos compostos estudados. Também não se observou redução de intensidade nas bandas de absorção dos compostos, mostrando que estes não sofreram fotobranqueamento verdadeiro.

Dados da literatura apontam que o processo de fotobranqueamento é oxidativo, envolvendo oxigênio singlete ou outras espécies reativas de oxigênio. Estas espécies reativas, produzidas durante os processos fotoquímicos da TFD, podem reagir com as moléculas do FS e levar a degradação destas (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001; GEROLA et al., 2011; MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

Estudos sobre o fotobranqueamento da *meso*-tetrafenilporfirina mostraram que este processo envolve a adição de oxigênio singlete ao anel porfirínico, provocando sua quebra, como mostra a Figura 4.7 (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001).

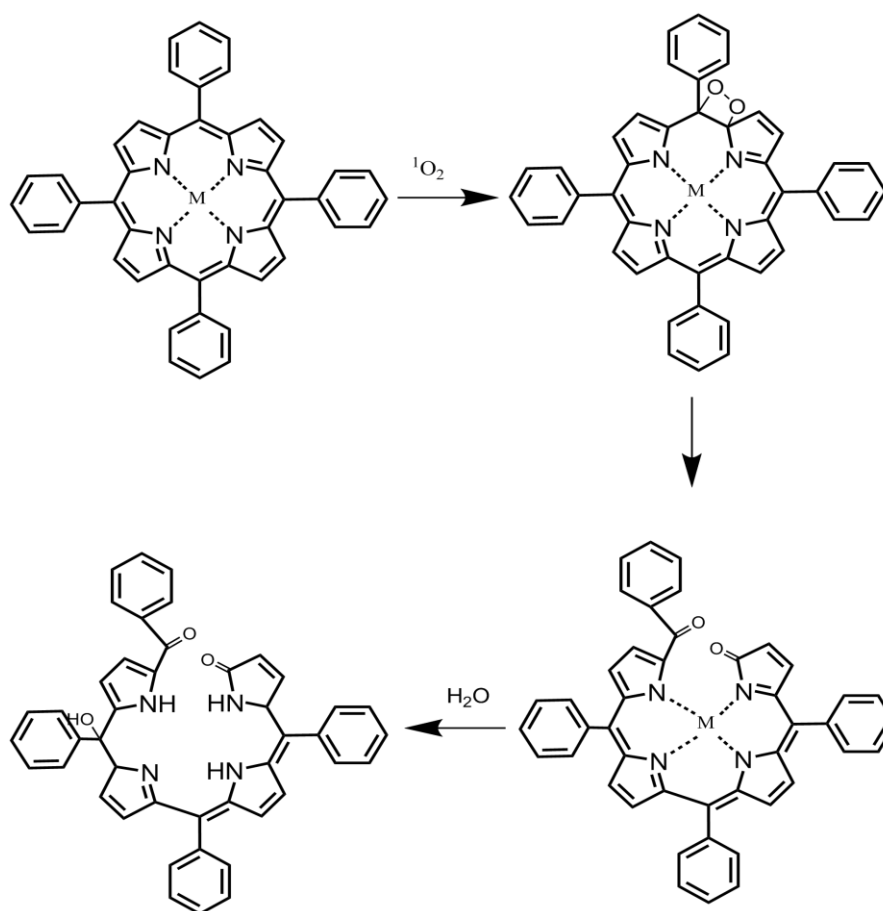


Figura 4.7 - Mecanismo de fotobranqueamento de complexos metálicos de *meso*-tetrafenilporfirina (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001).

Um estudo realizado com a porfirina *meso*-THPP, a clorina *meso*-THPC e a bacterioclorina *meso*-THPBC, usando radiação de laser, revelou que a porfirina mostrou-se mais fotoestável em relação aos outros compostos, e que, o oxigênio singlete estava envolvido nos três sistemas investigados. A porfirina *meso*-THPP foi irradiada por 24 h, apresentando decaimento de absorbância de aproximadamente 20% em duas de suas bandas (BONNETT; MARTÍNEZ, 2002). Soares verificou intenso fotobranqueamento da clorofila *a* (70%) em etanol, utilizando-se sistema de iluminação com LED vermelho durante 50 minutos (SOARES, 2006).

Gerola e colaboradores calcularam a constante de fotobranqueamento de derivados de clorofila utilizando sistema de LED vermelho. Os autores verificaram

que as amostras que foram borbulhadas com oxigênio apresentaram maior constante de fotobranqueamento em relação às amostras contendo apenas oxigênio em solução, demonstrando que o oxigênio participa deste processo. Porém, dois derivados de clorofila, que apresentaram alto rendimento quântico de oxigênio singlete mostraram-se fotoestáveis frente aos sistemas de LED estudados. Os autores concluíram que esses compostos apresentam baixa interação química com o $^1\text{O}_2$, mostrando que o processo de fotobranqueamento não pode ser relacionado apenas pela produção deste (GEROLA et al., 2011).

O fotobranqueamento do FS implica em menor quantidade de princípios ativos disponíveis, pois reduz a concentração do composto, o que diminui a ação fotodinâmica deste. Assim, a estabilidade dos compostos estudados frente aos LEDs de diferentes comprimentos de onda, foi o primeiro indicativo da potencialidade do uso dos sistemas derivados porfirínicos/LEDs em TFD.

4.3 TESTE DE FOTO-OXIDAÇÃO DE BSA

A albumina de soro bovino foi utilizada como modelo de proteína para o estudo de oxidação após irradiação com LED. Usou-se a constante de foto-oxidação como um parâmetro para avaliar a eficiência fotodinâmica dos derivados porfirínicos analisados. A foto-oxidação desta proteína leva a degradação de suas cadeias laterais devido à presença de aminoácidos suscetíveis como fenilalanina, triptofano e tirosina. A oxidação destes aminoácidos aromáticos leva a uma diminuição na intensidade de fluorescência da proteína. Assim, a constante de velocidade de foto-oxidação de BSA foi utilizada como parâmetro para avaliar a capacidade dos derivados porfirínicos em gerar espécies reativas de oxigênio (CAVALCANTE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2007; SILVA, 2007).

A Figura 4.8 apresenta os espectros de absorbância e fluorescência da proteína BSA, onde se pode observar que ela possui absorção máxima em 279 nm. Este $\lambda_{\text{máx}}$ foi utilizado como comprimento de onda de excitação, e observou-se a banda de fluorescência de BSA, que possui $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão em 345 nm.

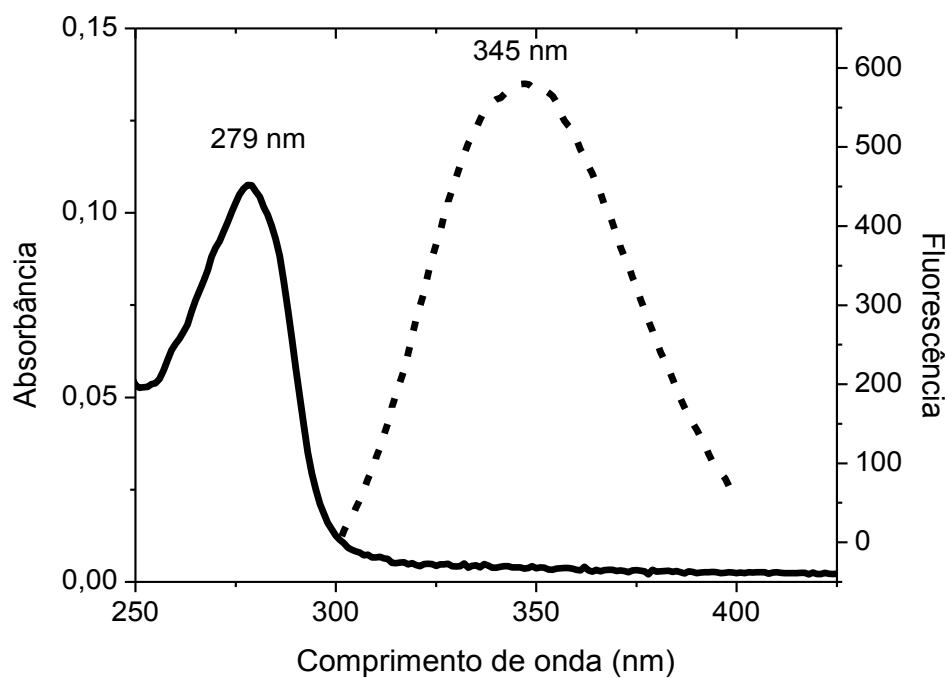


Figura 4.8 - Espectro de absorção ($\lambda_{\text{máx}} = 279 \text{ nm}$) (—) e emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{máx}} = 345 \text{ nm}$) (-----) de solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS.

Os resultados obtidos nos experimentos para a foto-oxidação da proteína BSA na presença dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ irradiadas com sistemas de LED alaranjado, vermelho, verde e azul estão apresentados a seguir, nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11.

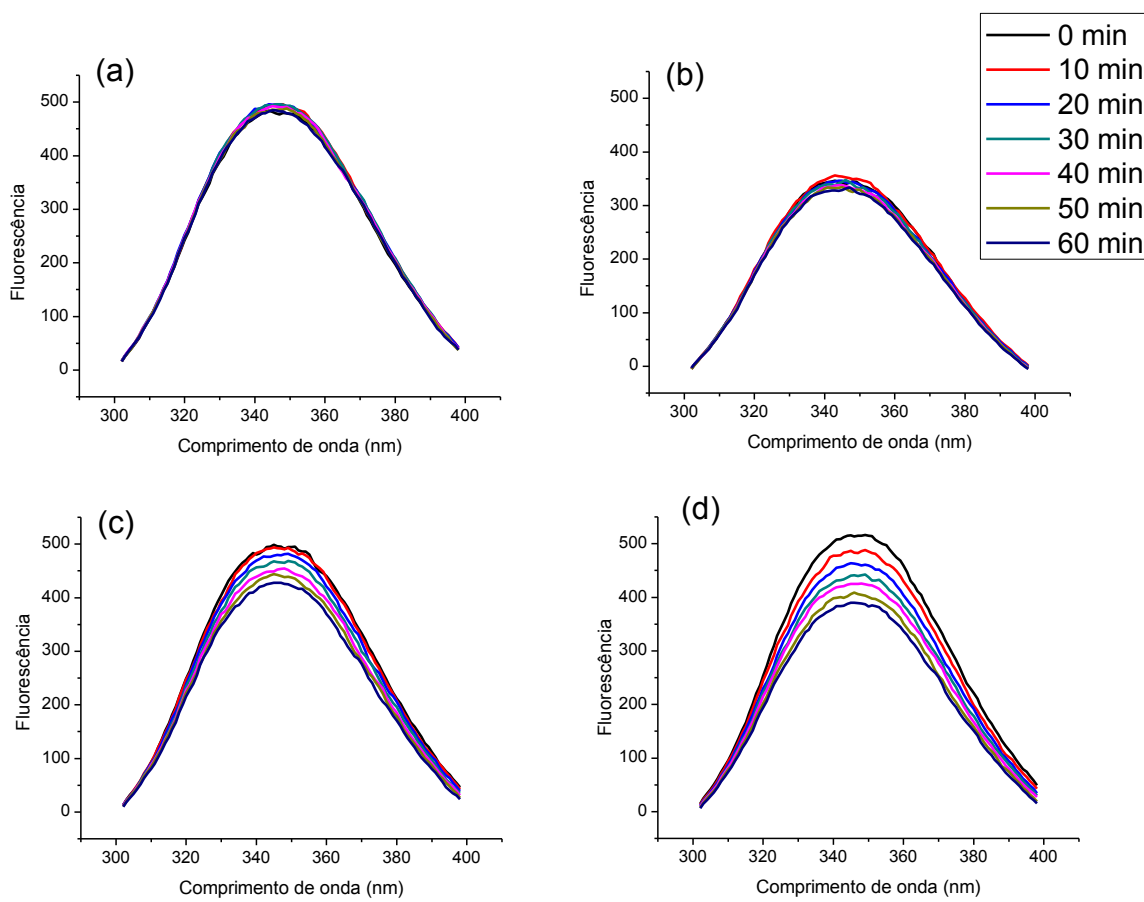


Figura 4.9 - Espectros de emissão de fluorescência da solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS na presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiada com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos [$\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$].

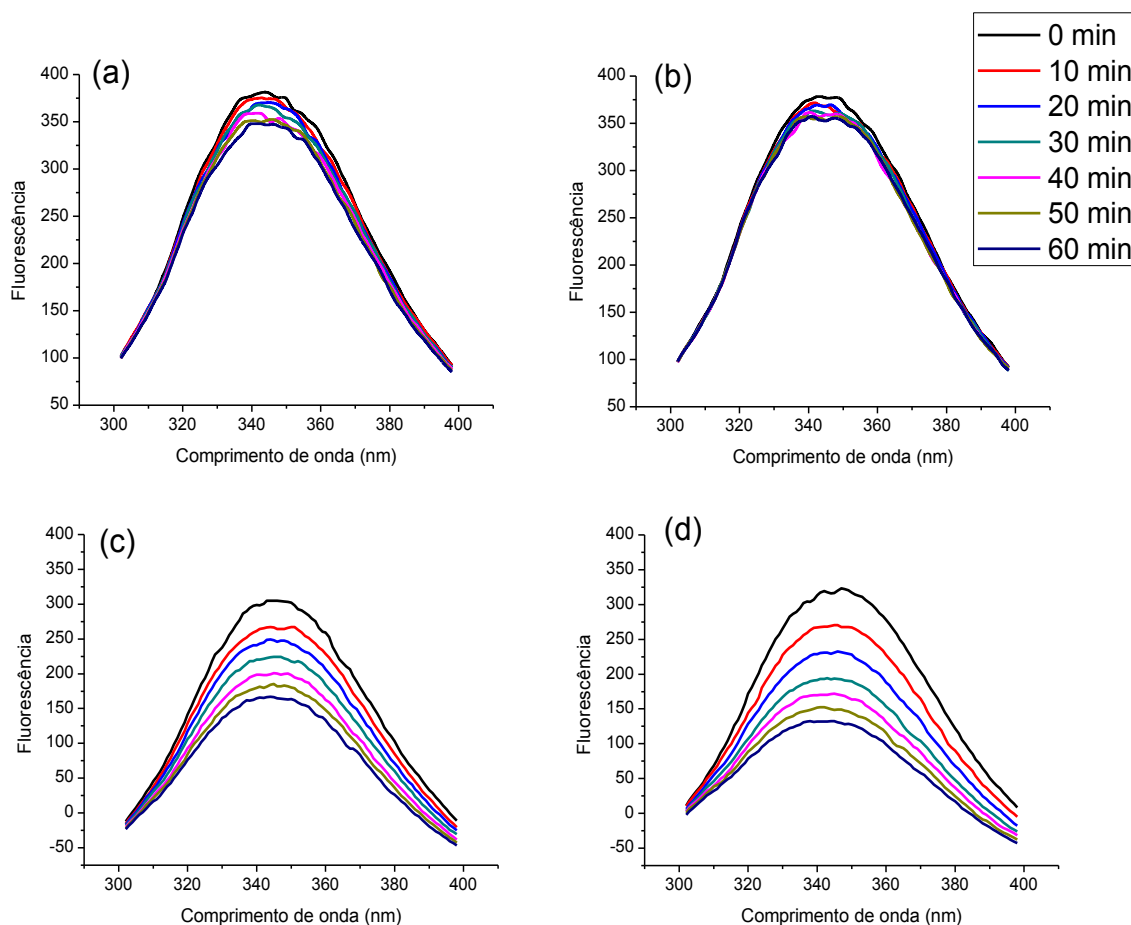


Figura 4.10 - Espectros de emissão de fluorescência da solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS na presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiada com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos [$\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$].

Analisando-se as Figuras 4.9 e 4.10, pode-se observar que houve redução na intensidade de fluorescência da proteína BSA com o aumento do tempo de irradiação, sendo essa redução mais significativa para os sistemas nos quais os derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ foram irradiados com o LED verde e azul, indicando que esses sistemas são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs).

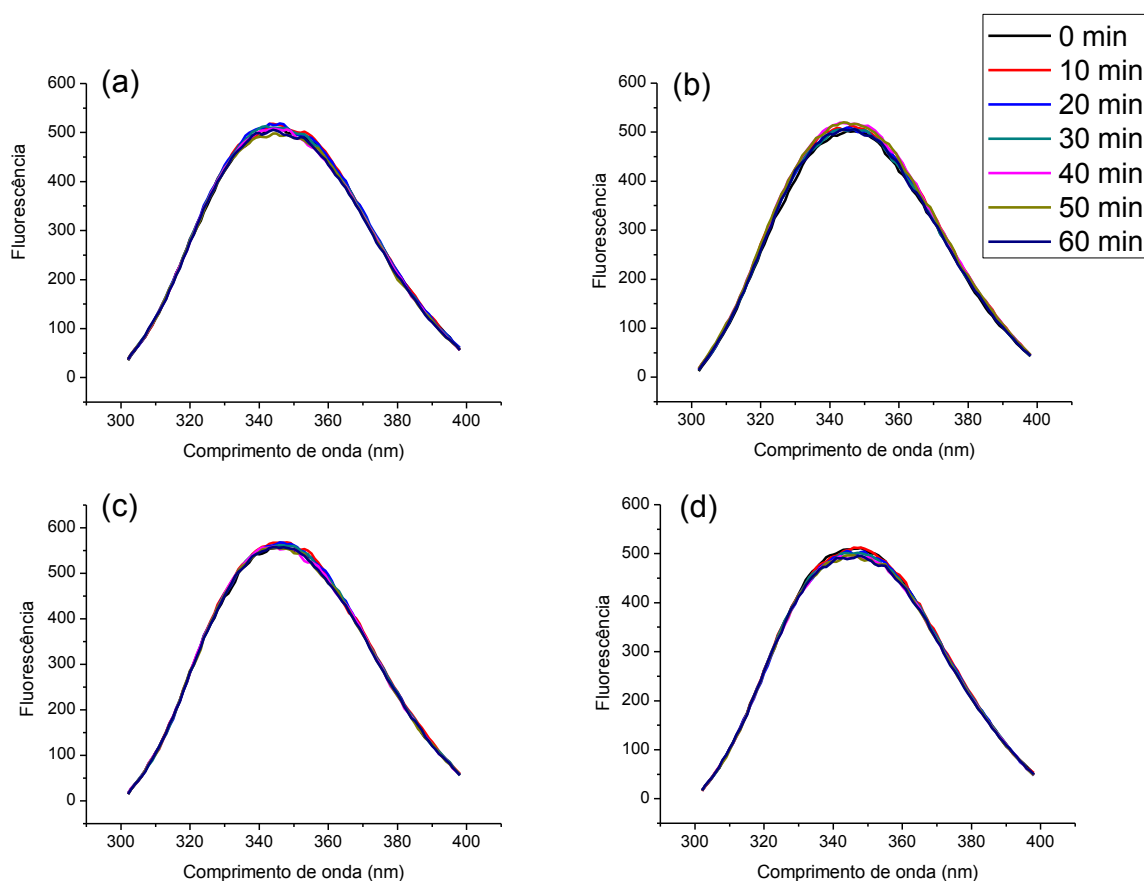


Figura 4.11- Espectros de emissão de fluorescência da solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS na presença do derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiada com sistemas de LED (a) alaranjado, (b) vermelho, (c) verde e (d) azul, durante 60 minutos [$\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$].

Os resultados obtidos nos experimentos onde utilizou-se o composto $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, exemplificado na Figura 4.11, mostraram que não houve redução significativa na intensidade da fluorescência de BSA durante o tempo de irradiação utilizado, indicando que nas condições testadas não houve produção de EROs.

Analisando as figuras 4.9, 4.10 e 4.11 verifica-se que não houve foto-oxidação significativa de BSA quando em presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ irradiado com os LEDs alaranjado e vermelho; e também quando utilizou-se $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ associado aos LEDs alaranjado, vermelho, verde e azul. Assim não foi possível calcular a constante de foto-oxidação para estes compostos quando iluminados com sistemas de LEDs citados.

O valor da intensidade de fluorescência do BSA em 345 nm foi utilizado para calcular o valor de $\ln (F/F_0)$ em relação a um determinado tempo de irradiação,

conforme citado no item 3. 5. 1, exemplos dos gráficos obtidos estão apresentados na Figura 4.12.

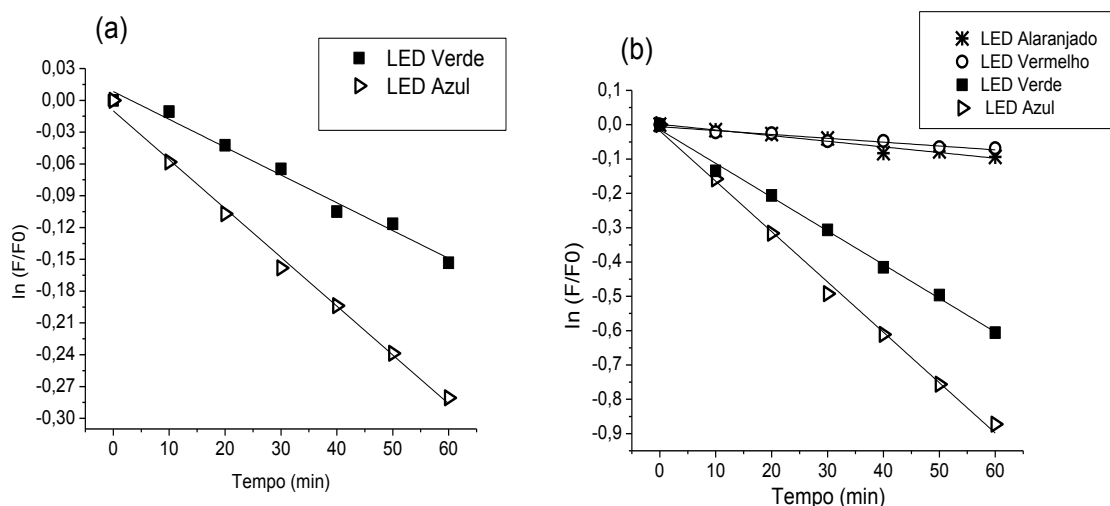


Figura 4.12 - Gráfico $\ln(F/F_0)$ versus o tempo de iluminação para a solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{máx}} = 345 \text{ nm}$) na presença dos derivados porfíricos (a) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e (b) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ irradiada com os sistemas de LED.

Os sistemas, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ verde e azul e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ alaranjado, vermelho, verde e azul apresentaram uma relação linear entre $\ln(F/F_0)$ e o tempo de irradiação, e utilizando-se as considerações citadas no item 3. 5. 1, determinou-se as constantes de velocidade de foto-oxidação de BSA (reação de primeira ordem). Os valores de coeficientes de correção linear para os sistemas de LED verde e azul ficaram acima de 0,98. Para os sistemas de LED alaranjado e vermelho, os valores dos coeficientes de correção linear ficaram próximos a 0,90.

Os valores das constantes de foto-oxidação obtidos, apresentados na Tabela 4.2, foram utilizados como parâmetros de comparação da eficiência fotodinâmica dos derivados porfíricos na foto-oxidação de BSA.

Os valores das constantes de foto-oxidação mostram que o derivado porfírico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ foi o FS mais eficiente na foto-oxidação da proteína BSA. Pode-se verificar também que os dois compostos apresentam uma maior constante quando associados ao sistema de LED azul.

Tabela 4.2 – Valores das constantes de velocidade de foto-oxidação da solução de BSA ($\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS, irradiados com LED alaranjado, vermelho, verde e azul durante 60 min, $\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$. Os valores representam a média de três experimentos.

LED	Derivado Porphirínico	
	$\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$	$\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$
	k (10^{-3} min^{-1})	k (10^{-3} min^{-1})
Alaranjado	-	$1,6 \pm 0,8$
Vermelho	-	$1,4 \pm 0,4$
Verde	$3,0 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,8$
Azul	$4,5 \pm 0,2$	$14,3 \pm 0,3$

Ribeiro e outros pesquisadores investigaram a foto-oxidação do aminoácido triptofano (Trp) na presença dos compostos *meso*-tetramesitilporfirina (*meso*-TMP), octaetilporfirina (OEP) e vanadil octaetilporfirina (VOOEP), sob iluminação com lâmpada de mercúrio durante 60 minutos, na presença de oxigênio. Eles verificaram que os três compostos foram capazes de foto-oxidar o Trp, apresentando os seguintes valores de constantes de foto-oxidação k ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$): $16,8 \pm 0,3$ (OEP); $4,86 \pm 0,5$ (VOOEP); $9,72 \pm 0,4$ (*meso*-TMP). Além disso, eles concluíram que o oxigênio singlete é a espécie reativa predominante no processo, responsável pela foto-oxidação do Trp (RIBEIRO et al., 2007).

Silva investigou a foto-oxidação da proteína BSA na presença dos fármacos Photofrin[®] (PF), Photosan[®] (PS), Photogem[®] (PG) e Photodithazine[®] (PZ) em tampão fosfato (pH 7,4) com irradiação durante 40 minutos com LED ($\lambda_{\text{máx}} = 630 \text{ nm}$). Os fármacos PF, PS e PG são derivados de hematoporfirina e o fármaco PZ é um derivado de clorina e-6. Ele encontrou os seguintes valores de constantes de foto-oxidação k ($\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$): $9,45 \pm 0,3$ (PZ); $9,63 \pm 0,4$ (PG); $8,97 \pm 0,2$ (PF) e $4,25 \pm 0,5$ (PS) (SILVA, 2007). Os resultados obtidos no presente estudo são da mesma ordem de grandeza aos obtidos por Silva.

Como os FS apresentam diferentes absorbâncias no comprimento de onda de irradiação dos sistemas de iluminação, para utilizar a constante de foto-oxidação como parâmetro de comparação da eficiência dos derivados porfirínicos, os dados

devem ser normalizados pela absorção destes nos comprimentos de onda máximo de emissão dos diferentes LEDs. Assim, os dados foram corrigidos em função da absorbância dos compostos no comprimento de onda da irradiação dos LEDs verde e azul, que foram os sistemas que apresentaram melhores resultados na foto-oxidação da proteína BSA, apresentados na Figura 4.13. Os valores das constantes de foto-oxidação corrigidos estão apresentados na Tabela 4.3.

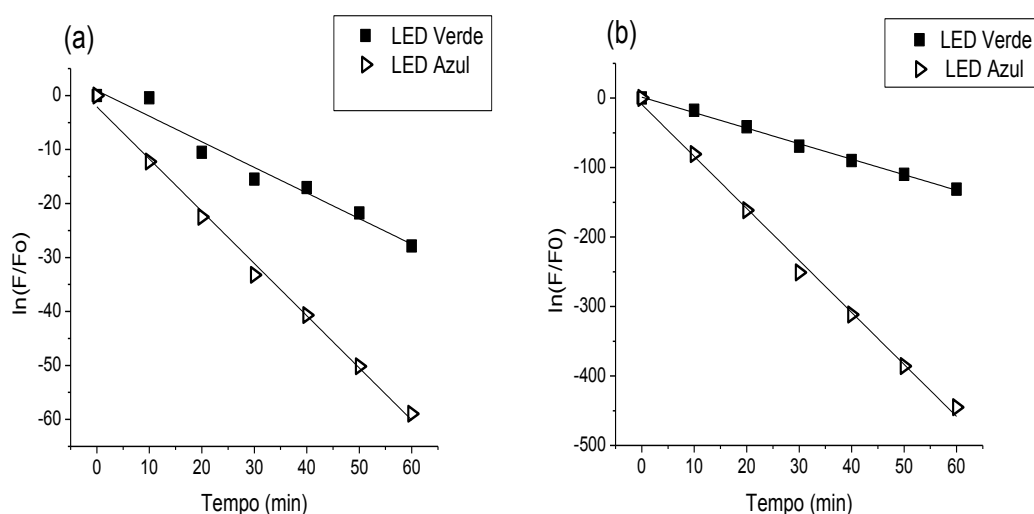


Figura 4.13 - Gráfico $\ln(F/F_0)$ versus o tempo de iluminação para a solução de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{máx}} = 345 \text{ nm}$) na presença dos derivados porfirínicos (a) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e (b) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, corrigido pelos valores das absorbâncias dos compostos no comprimento de onda máximo de emissão do LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 513 \text{ nm}$) e do LED azul ($\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$).

Tabela 4.3 - Valores das constantes de velocidade de foto-oxidação da solução de BSA ($\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS, irradiados com LED verde e azul durante 60 min. Correção realizada em função da absorbância dos compostos nos $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão do LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 513 \text{ nm}$) e azul ($\lambda_{\text{máx}} = 463 \text{ nm}$). Os valores representam a média de três experimentos.

LED	Derivado Porphirínico	
	$\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ k (min^{-1})	$\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ k (min^{-1})
Verde	$0,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$
Azul	$0,9 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,2$

Cavalcante determinou a constante de foto-oxidação corrigida em função da absorbância de cada fármaco analisado, no comprimento de onda máximo de emissão do LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 630 \text{ nm}$), obtendo os seguintes valores k (min^{-1}): $14,8 \pm 0,3$ (PZ); $9,8 \pm 0,5$ (PG); $3,2 \pm 0,7$ (PF) e $2,9 \pm 0,5$ (PS) (CAVALCANTE et al., 2009). Pode-se observar que o sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ azul apresentou constante de foto-oxidação maior que os fármacos PF e PS. O sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ verde apresentou constante de foto-oxidação próxima a do fármaco PF.

A redução na fluorescência da proteína BSA pode ser atribuída à destruição dos resíduos de triptofano, uma vez que estes são os principais contribuintes para a fluorescência de BSA. Assim, supõe-se que o principal mecanismo envolvido na foto-oxidação da proteína BSA envolve o oxigênio singlete. A Figura 4.14 mostra a reação do oxigênio singlete com o anel indol do triptofano (RIBEIRO et al., 2007; SILVESTER; TIMMINS; DAVIES, 1998). A redução da fluorescência pode ocorrer também devido a mudanças na organização estrutural da proteína (BOSE; DUBE, 2006; SILVESTER et al., 1998; RIBEIRO et al., 2007).

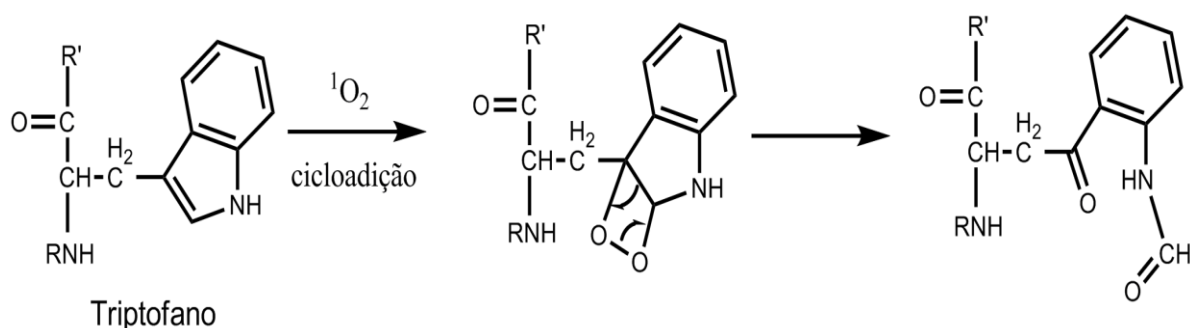


Figura 4.14 - Reação de cicloadição entre o $^1\text{O}_2$ e o triptofano (RIBEIRO et al., 2007).

Vários estudos demonstraram que diferentes derivados porfirínicos são capazes de interagir com a proteína BSA, levando a mudanças em suas características espectroscópicas (AN et al., 2009; KUBÁT; LANG; ANZENBACHER, 2004; LI, SEEGER, 2009; MA et al., 2009; SILVESTER; TIMMINS; DAVIES, 1998; TIAN et al., 2007; ZHANG; GÖRNER, 2011).

A Figura 4.15, a seguir, apresenta os espectros dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ na presença da proteína BSA. A adição da proteína levou a mudanças na posição da banda *Soret* dos

derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$. O comprimento de onda máximo do composto $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ passou de 408 nm (em PBS) para 413 nm (em PBS/BSA) e o comprimento de onda máximo do composto $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ passou de 416 nm (em PBS) para 424 nm (em PBS/BSA). Este deslocamento para o vermelho pode indicar uma interação entre os derivados porfirínicos e a proteína BSA. Porém o composto $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ na presença de BSA não apresentou deslocamento em sua banda *Soret*, que permaneceu em 466 nm tanto em PBS quanto em BSA, sugerindo uma fraca interação entre $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ e BSA. Este fato pode explicar as pequenas alterações observadas na fluorescência da proteína BSA, como observado na Figura 4.11.

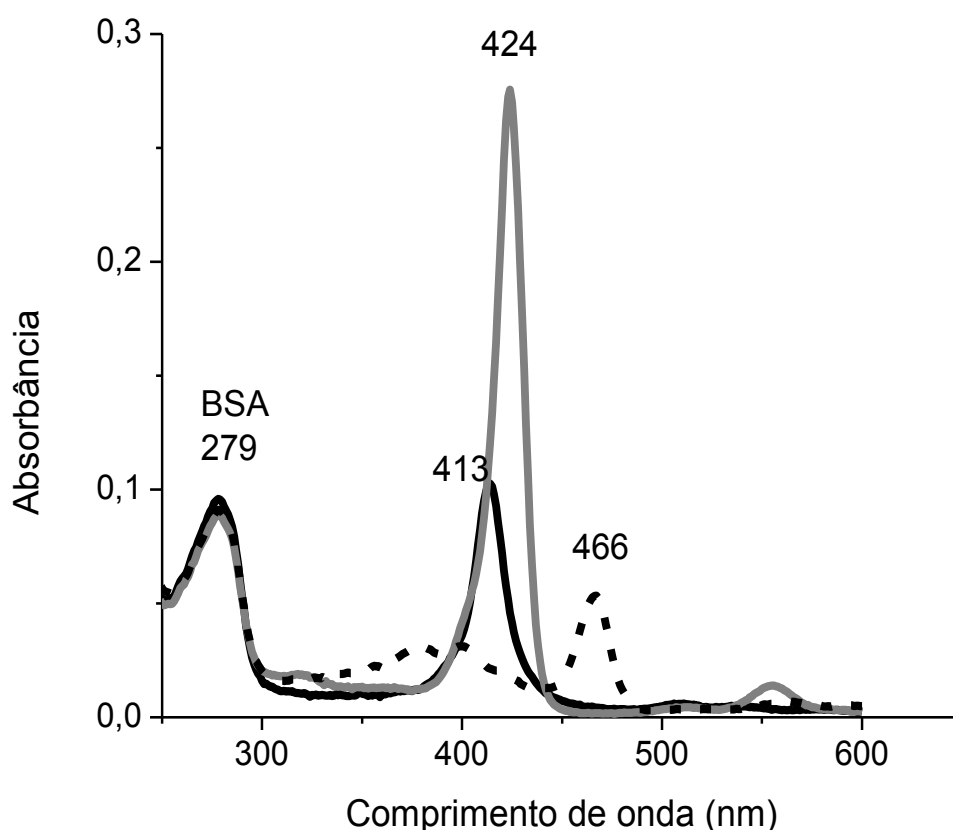


Figura 4.15 - Espectros de absorção no UV-Vis dos derivados porfirínicos (—) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, (—) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ e (-----) $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, $[\text{FS}] = 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, na presença de BSA $\approx 2,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS.

4.4 AVALIAÇÃO DA FOTO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico (AU) pode ser oxidado pelo oxigênio singlete, produzido durante os processos fotoquímicos da TFD. Assim o AU é utilizado como dosímetro químico na determinação da atividade fotodinâmica de um FS (CAVALCANTE et al., 2009; FISCHER et al., 1998; MAESTRIN et al., 2004). A reação de foto-oxidação do ácido úrico por oxigênio singlete pode levar a formação de produtos como triuréia, a alantoxaidina, o íon oxanato e dióxido de carbono, como apresentado na Figura 4.16 (FISCHER et al., 1998; MAESTRIN et al., 2004).

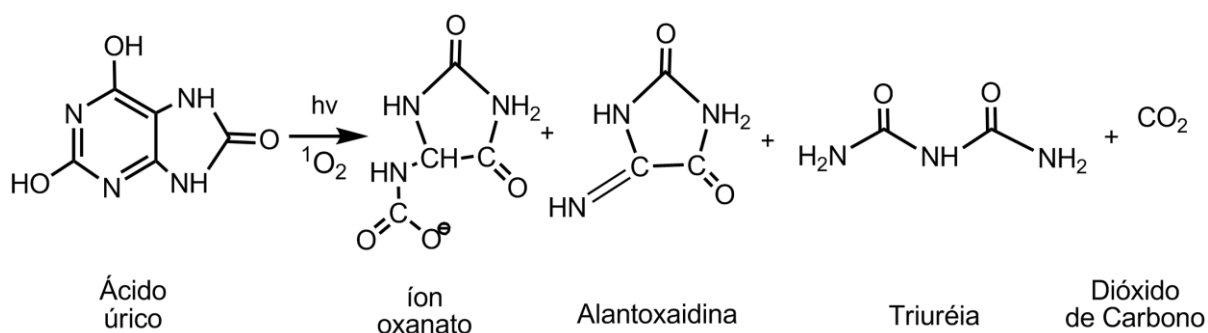


Figura 4.16 - Foto-oxidação do ácido úrico via oxigênio singlete (MAESTRIN et al., 2004).

A Figura 4.17 apresenta o espectro de absorção óptica do ácido úrico, onde observa-se a presença de duas bandas na região do UV. O ácido úrico não possui absorbância na região do visível, portanto, não absorve radiação dos LEDs utilizados. Assim, apenas o derivado porfirínico será fotoexcitado, durante a iluminação de solução contendo AU e derivados porfirínicos. O oxigênio singlete gerado oxida o ácido úrico o que pode ser monitorado pela diminuição da banda de absorção do AU em 292 nm.

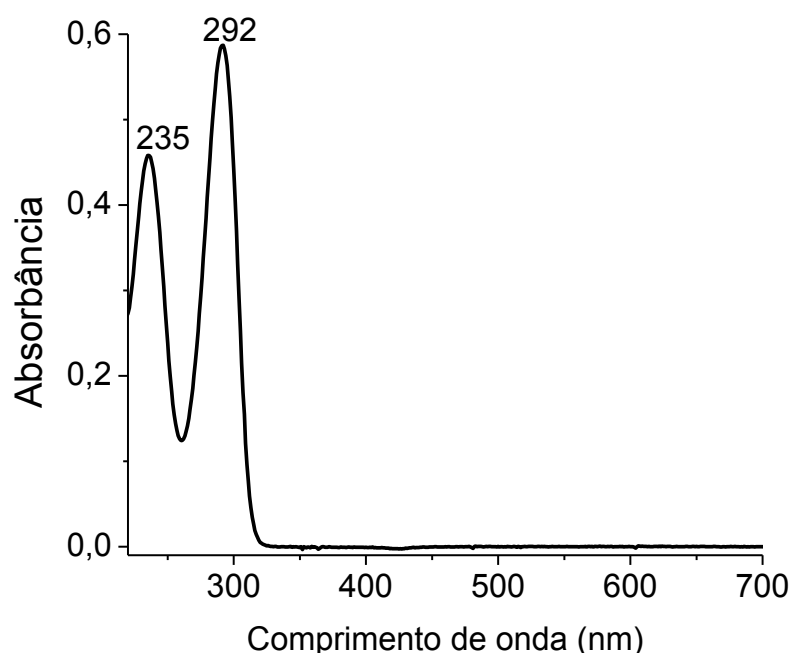


Figura 4.17 - Espectro de absorção no UV-Vis da solução de ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS.

Fischer e colaboradores propuseram uma equação para determinar a atividade fotodinâmica (AF) dos FS por meio da foto-oxidação do ácido úrico (FISCHER et al., 1998). Porém, outros autores mostraram que a referida equação só deve ser utilizada quando a fonte de iluminação empregada for monocromática (GEROLA et al., 2012).

Assim, neste estudo, o teste do ácido úrico foi utilizado apenas como um teste qualitativo, verificando-se qual sistema FS/LED foi capaz de causar maior decaimento de absorção da banda de maior intensidade do AU (292 nm). Quanto maior a geração de $^1\text{O}_2$, maior será o decaimento da banda de absorção do AU.

Foram realizados testes controle, onde se verificou que a solução de AU, no tampão fosfato utilizado, permaneceu estável durante o tempo total dos experimentos (60 minutos). Também foram realizados experimentos com a solução de AU submetida à iluminação com os LEDs verde e azul, para verificar se as fontes de luz utilizadas causariam decaimento na banda do AU. Como esperado, nenhum decaimento foi observado, uma vez que o AU absorve apenas na região do UV. Verificou-se também que a presença dos derivados porfirínicos em solução de AU, sem iluminação com LED, não alterou o espectro de absorção do ácido úrico.

Com a intenção de comparar a eficiência de geração de $^1\text{O}_2$ dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, soluções contendo os FS e ácido úrico foram submetidas a iluminação com sistema de LED azul e verde, e tiveram seus espectros de absorção analisados. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4.18 a 4.20. O LED verde foi selecionado com base em resultados satisfatórios, obtidos pelo grupo de pesquisa, para alguns derivados porfirínicos (BALZER, 2010; SWIECH, 2010). Além disso, no presente estudo, os resultados de foto-oxidação de BSA indicaram que os sistemas de LED verde e azul apresentam resultados interessantes para aplicação, como fonte de luz, em TFD. Assim, optou-se, por realizar os testes do AU, somente com os sistemas de LED azul e verde.

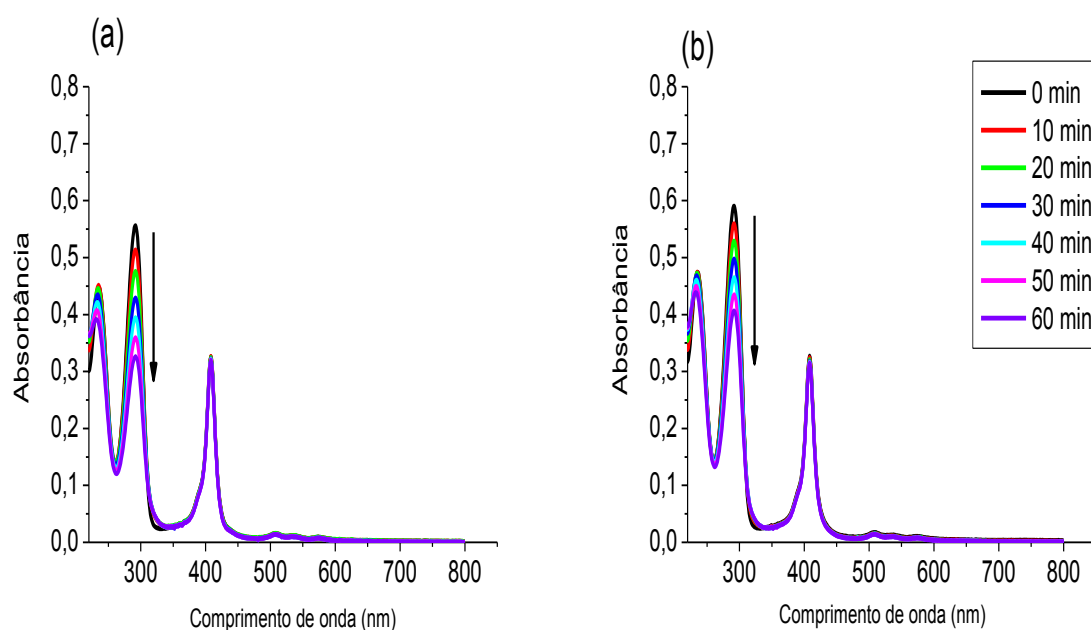


Figura 4.18 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde durante 60 min.

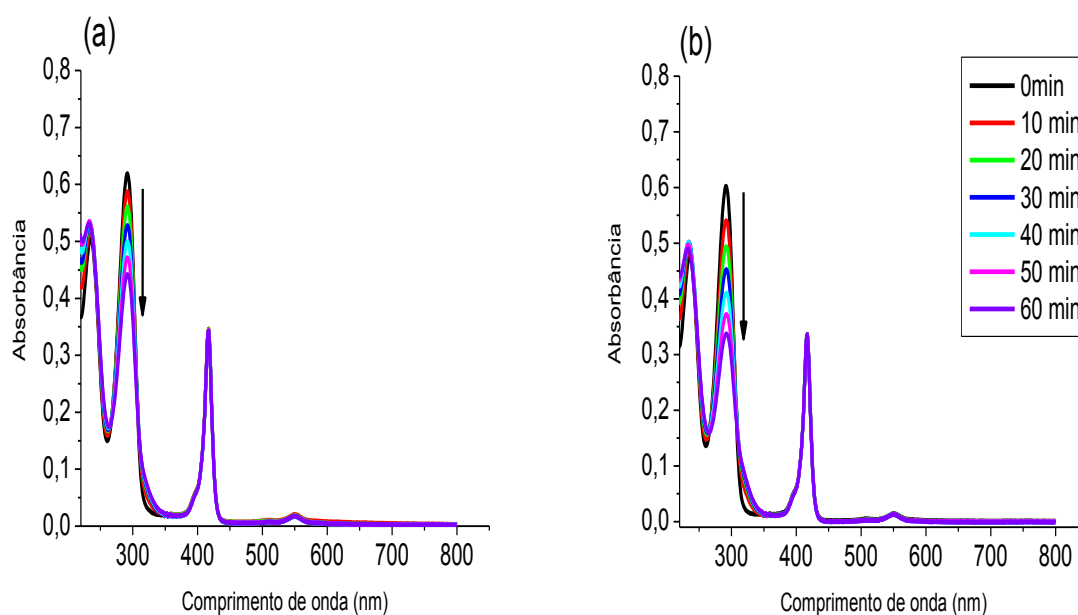


Figura 4.19 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde, durante 60 min.

Nas Figuras 4.18 e 4.19 observa-se que, para os derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, houve decaimento na banda do AU em 292 nm, que provavelmente se deve a oxidação deste composto pelo $^1\text{O}_2$ gerado, devido a excitação dos FS pelos sistemas de LED verde e azul.

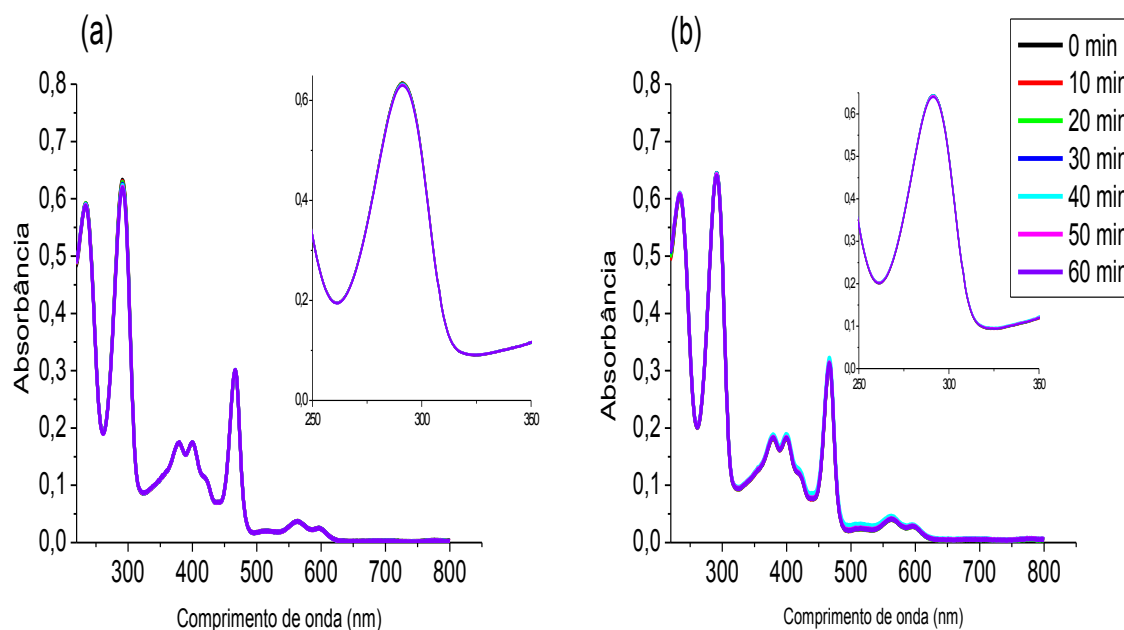


Figura 4.20 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSPP})]\}^+$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde, durante 60 min e espectro expandido da banda do AU.

Na presença do derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, não houve redução na banda do AU, indicando que este FS não produziu $^1\text{O}_2$ (Figura 4.20). Além disso, pode-se observar que não houve redução nas bandas *Soret* dos derivados porfirínicos, demonstrando que estes não sofreram reações de fotobranqueamento, como pode ser observado nas Figuras 4.18, 4.19 e 4.20. Os valores das porcentagens de decaimento da banda do AU estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Porcentagem de decaimento da banda de absorção do ácido úrico (292 nm) na presença dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS, irradiados com LED verde e azul durante 60 min.

LED	Derivado Porphirínico					
	$\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$		$\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$		$\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$	
	$\Delta A_{\text{A.U.}}$	% (média)	$\Delta A_{\text{A.U.}}$	% (média)	$\Delta A_{\text{A.U.}}$	% (média)
Verde	0,18	$31,2 \pm 0,9$	0,27	$45,1 \pm 1,5$	0,01	$0,9 \pm 0,2$
Azul	0,25	$43,8 \pm 3,6$	0,19	$31,4 \pm 3,9$	0,01	$2,1 \pm 0,1$

$\Delta A_{\text{A.U.}}$ = variação da intensidade da banda de absorção do AU em 292 nm, após o tempo total de irradiação.

Dados da literatura indicam que derivados porfirínicos coordenados a íons metálicos diamagnéticos, como Zn^{2+} , apresentam alto rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}), decorrente do longo tempo de vida do estado triplete (τ_T) e um, relativamente alto, rendimento quântico do estado triplete (Φ_T). Porém, complexos coordenados a metais paramagnéticos apresentam um valor de τ_T muito menor, apresentando baixo rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002). Isso pode explicar o baixo decaimento na banda do AU quando se utilizou o derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, uma vez que o íon metálico Mn^{3+} é paramagnético.

Maestrin e colaboradores calcularam a atividade fotodinâmica (AF) de hidroxinitrofenilporfirinas, por meio do teste do ácido úrico, utilizando-se laser como fonte de luz ($\lambda = 671 \text{ nm}$). Verificou-se que o composto 5,10,15,20-tetrakis(2-hidróxi-5-nitrofenil)porfirina apresentou maior atividade fotodinâmica, obtendo-se $\text{AF} = 138$ (MAESTRIN et al., 2004).

Membros do grupo de pesquisa calcularam a AF para diferentes sistemas derivados porfirínicos/LEDs, por meio do teste do AU, utilizando-se a equação elaborada por Fischer (BALZER, 2010; DOMARESKI, 2009; MENDES, 2008; SWIECH, 2010). Porém, como já dito, essa equação é válida somente quando a fonte de luz utilizada for monocromática, o que não é o caso dos sistemas de LED. Assim, no presente estudo, não foram calculadas as AF para os derivados porfirínicos estudados. As comparações realizadas a seguir foram feitas em relação à variação na banda de absorção do ácido úrico, em 292 nm.

Os resultados obtidos no presente trabalho, para os derivados $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, associados aos LED verde e azul, mostraram que estes sistemas apresentaram maior variação na banda de absorção do AU em relação a outros sistemas FS/LED já estudados pelo grupos de pesquisa (BALZER, 2010; DOMARESKI, 2009; SWIECH, 2010).

Domareski realizou estudo semelhante utilizando o sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TSPP})]$ /LED verde, obtendo-se $\Delta A_{\text{A.U}} = 0,03$ e $\text{AF} = 4,5$. Comparando-se os resultados obtidos por Domareski, com os dados obtidos para o sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ /LED verde ($\Delta A_{\text{A.U}} = 0,27$), pode-se notar que o derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ levou a uma redução na banda do AU (DOMARESKI, 2009). Este resultado indica que o derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ é capaz de produzir maior quantidade de oxigênio singlete em relação ao $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TSPP})]$, e, consequentemente, deve apresentar uma maior atividade fotodinâmica.

Porém, a comparação da eficiência de produção de oxigênio singlete não pode ser analisada apenas pela redução na banda do ácido úrico. O rendimento de produção de $^1\text{O}_2$ depende de fatores, como, por exemplo, o tipo de fonte de irradiação empregada (mono ou policromática), potência da fonte de luz, tempo total de irradiação, absortividade molar do FS no comprimento de onda da irradiação, sobreposição espectral entre o FS e a fonte de luz empregada, e também da taxa de fotobranqueamento dos FS. Uma sobreposição maior entre o FS e a fonte de luz, pode levar a uma maior quantidade de luz absorvida pelo FS, favorecendo os processos fotoquímicos para produção de oxigênio singlete.

A Figuras 4.21 mostra a sobreposição espectral entre os derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ e os sistemas de LED verde e azul. O derivado $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ associado ao sistema de LED verde e azul apresentou maior sobreposição espectral.

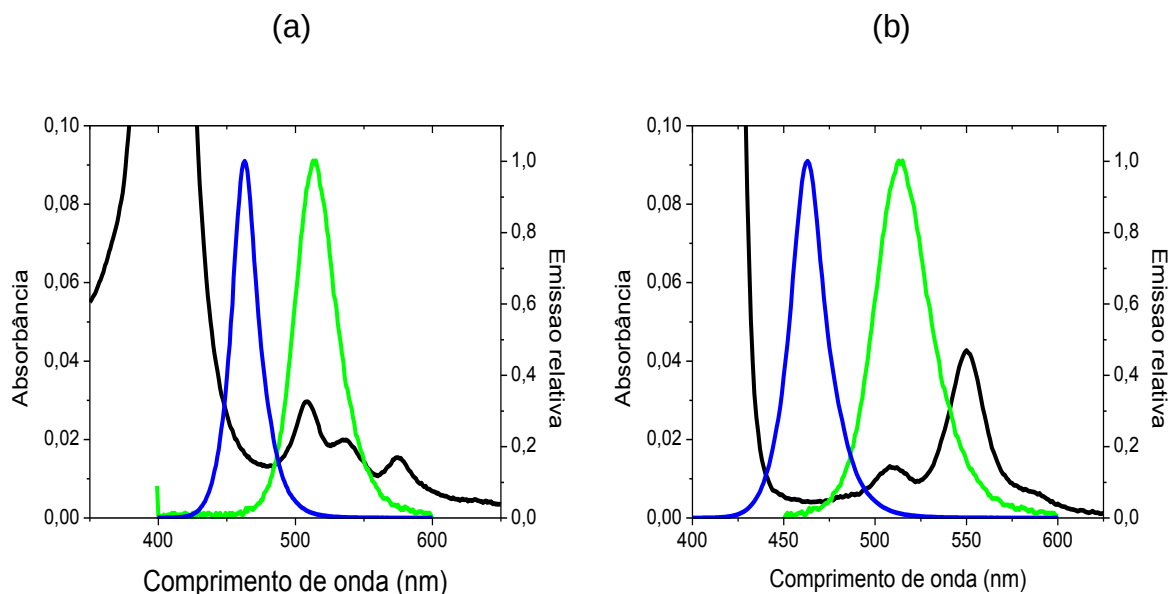


Figura 4.21 - Sobreposição espectral dos derivados porfirínicos (a) $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e (b) $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ com os sistemas de LED (— verde e — azul).

A porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ é um dos compostos mais investigados como possível FS para aplicação em TFD, e tem mostrado bons resultados (ALVES et al., 2009; BANFI et al., 2006; KASSAB, 2009; QUIROGA; ALVAREZ; DURANTINI, 2010; RAGÀS; AGUT; NONELL, 2010; TITA; PERUSSI, 2001). Assim, o teste do AU foi realizado com a porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, com a finalidade de comparar os valores de porcentagem de degradação do AU. Utilizou-se as concentrações de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, que foram as concentrações testadas para os derivados porfirínicos analisados. Os resultados estão apresentados nas Figuras 4.22 e 4.23.

Observou-se um rápido decaimento na banda do AU na presença da porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, em ambas concentrações, associada aos LEDs verde e azul. A maior concentração da porfirina ($5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) levou rapidamente ao deslocamento na banda do AU de 292 nm para 305 nm, sugerindo a completa oxidação da molécula de AU e formação de uma nova espécie em solução. Os valores das porcentagens de degradação da banda do AU na presença de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ estão apresentados na Tabela 4.5.

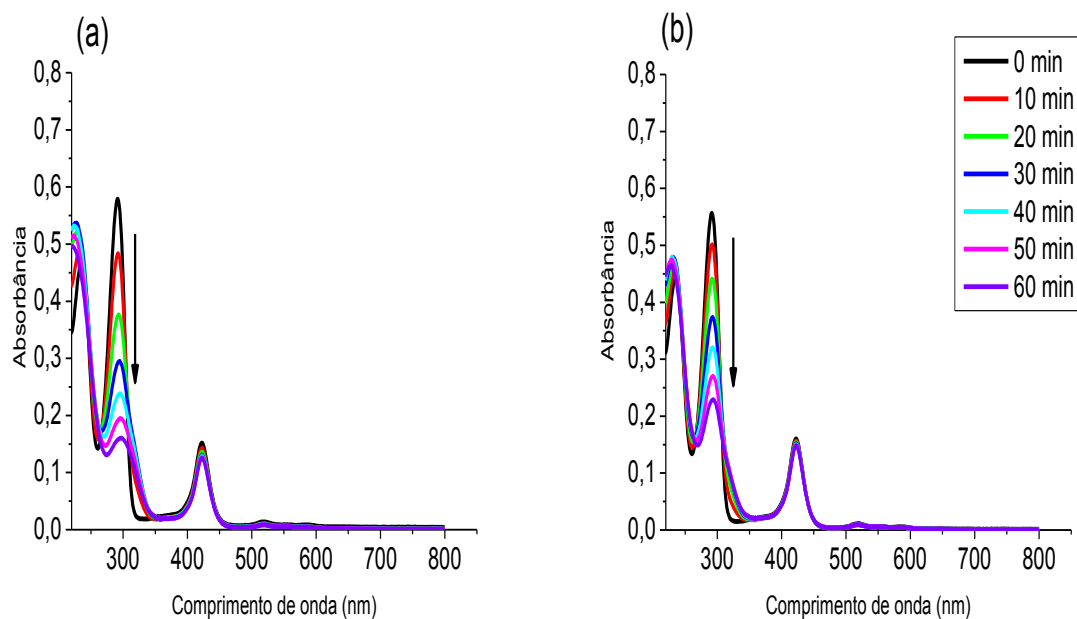


Figura 4.22 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $[H_2(TMPyP)]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde, durante 60 min.

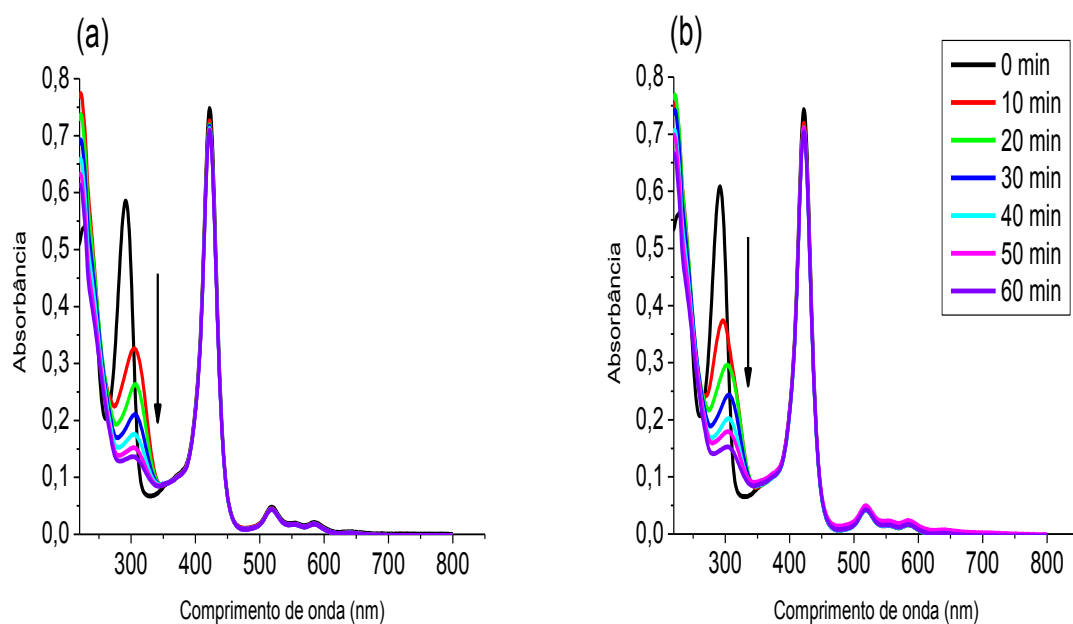


Figura 4.23 - Espectros de absorção no UV-Vis da solução de $[H_2(TMPyP)]$ $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ contendo ácido úrico $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS sob iluminação de LED (a) azul e (b) verde, durante 60 min.

Tabela 4.5 - Porcentagem de decaimento da banda de absorção do ácido úrico (292 nm) na presença do derivado porfirínico [H₂(TMPyP)] nas concentrações 1,0 e 5,0 µmol L⁻¹, em PBS, irradiados com LED verde e azul durante 60 min.

LED	Derivado Porphirínico			
	[H ₂ (TMPyP)]			
	1,0 µmol L ⁻¹		5,0 µmol L ⁻¹	
	ΔA _{A.U.}	% (média)	ΔA _{A.U.}	% (média)
Verde	0,33	58,2 ± 1,2	0,46	76,4 ± 0,6
Azul	0,40	70,7 ± 2,9	0,44	77,7 ± 0,4

Mendes realizou estudo semelhante utilizando o sistema [H₂(TMPyP)]/LED vermelho, obtendo-se ΔA_{A.U.} = 0,05 (MENDES, 2008).

Por meio das Figuras 4.22 e 4.23 observa-se que, além da oxidação do AU, a própria molécula de [H₂(TMPyP)] sofreu decaimento em sua banda *Soret*, ou seja, sofreu fotobranqueamento. Na concentração 1,0 µmol L⁻¹ a porcentagem de fotobranqueamento da porfirina foi de 14,5% (LED azul) e 8,2% (LED verde); e na concentração 5,0 µmol L⁻¹ foi de 5,9% (LED azul) e 4,9% (LED verde).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.4, a porfirina [H₂(TMPyP)] (5,0 µmol L⁻¹) associada aos sistemas de LED azul e verde foi responsável por maior decaimento da banda do AU, e, possivelmente, produz maior quantidade de ¹O₂.

Os resultados obtidos com a porfirina [H₂(TMPyP)] mostram que este composto leva a um maior decaimento na banda do AU se comparado com os derivados porfirínicos Na₄[H₂(TDFSP)], Na₄[Zn(TDFSP)] e {Na₄[Mn(TSP)]}⁺. Porém a porfirina [H₂(TMPyP)] sofreu fotobranqueamento, o que não ocorreu para os compostos investigados no presente estudo.

4.5 ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO

4.5.1 Ensaio com *Artemia salina*

Por se tratar de um teste simples, rápido e de baixo custo, o ensaio com *Artemia salina* foi realizado para analisar a toxicidade e a atividade fotodinâmica dos derivados porfirínicos sobre esses microcrustáceos. Para que os compostos sejam biologicamente ativos o valor de sua DL_{50} deve ser mínimo. O método anteriormente empregado pelo grupo foi modificado para obtenção de uma maior reprodutibilidade (BALZER, 2010; SWIECH, 2010). Os parâmetros foram alterados com a intenção de manter os microcrustáceos em um ambiente propício para seu desenvolvimento, sem que as condições do meio levassem a morte desses. Assim substituiu-se a solução de cloreto de sódio por sal marinho, o pH foi regulado por meio de adição de NaOH para ficar entre 8,0 e 8,5 e utilizou-se uma bomba para manter a concentração de oxigênio constante. Decidiu-se investigar, primeiramente, o composto $[H_2(TMPyP)]$, uma vez que este já foi bastante estudado pelo grupo de pesquisa e por outros grupos (ALVES et al., 2009; BANFI et al., 2006; MENDES, 2008; SWIECH, 2010).

Os resultados obtidos no teste de toxicidade, avaliados por um período de 3 e 24 horas, estão apresentados na Figura 4.24. De acordo com os dados, observa-se que o derivado porfirínico $[H_2(TMPyP)]$ apresentou toxicidade para a *Artemia salina*, que aumentou com a concentração deste. Pode-se observar também que essa toxicidade foi igual tanto para 3 como para 24 horas. Porém, os resultados obtidos para o grupo controle ausência de luz e ausência de porfirina (L-P-) apresentaram mortalidade igual às concentrações 1,0 e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo um resultado não consistente.

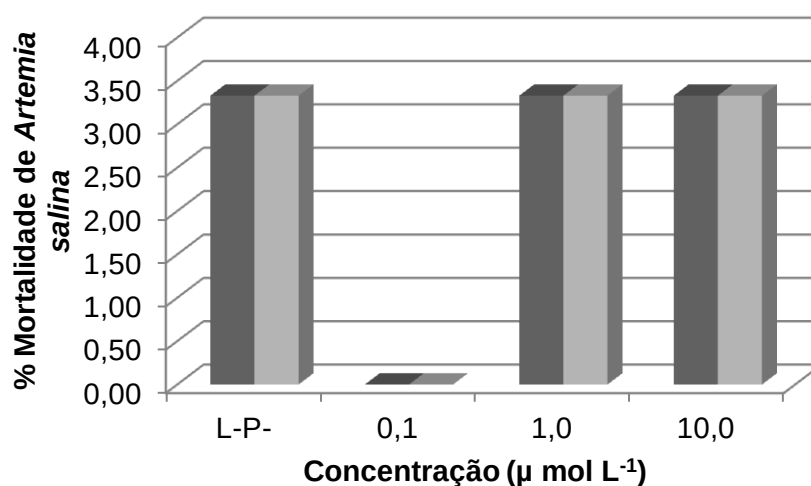


Figura 4.24 - Média de mortalidade de *Artemia salina* para soluções aquosas de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ em diferentes concentrações durante (■) 3 horas e (▒) 24 horas, grupo L-P- (ausência de luz e FS).

Além do ensaio de toxicidade também foram realizados testes de atividade fotodinâmica para avaliar a eficiência de diferentes concentrações do composto $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ associado aos sistemas de LED alaranjado, vermelho, verde e azul. Porém, os resultados não foram reprodutíveis, sendo difíceis de serem interpretados. Um dos resultados obtidos está apresentado na Figura 4.25, onde pode-se observar que para os sistemas de LED vermelho e alaranjado, a concentração do composto não apresentou linearidade de mortalidade com o aumento da concentração. Além disso, apenas a presença de LED vermelho foi capaz de levar a uma mortalidade de aproximadamente 5% dos microcrustáceos. Já os sistemas de LED azul e verde apresentaram linearidade com o aumento da concentração do composto. Porém, a porcentagem de mortalidade observada no teste de toxicidade para o grupo L-P- (aproximadamente 4 %), invalida os resultados obtidos para o teste de atividade fotodinâmica sobre *Artemia salina*.

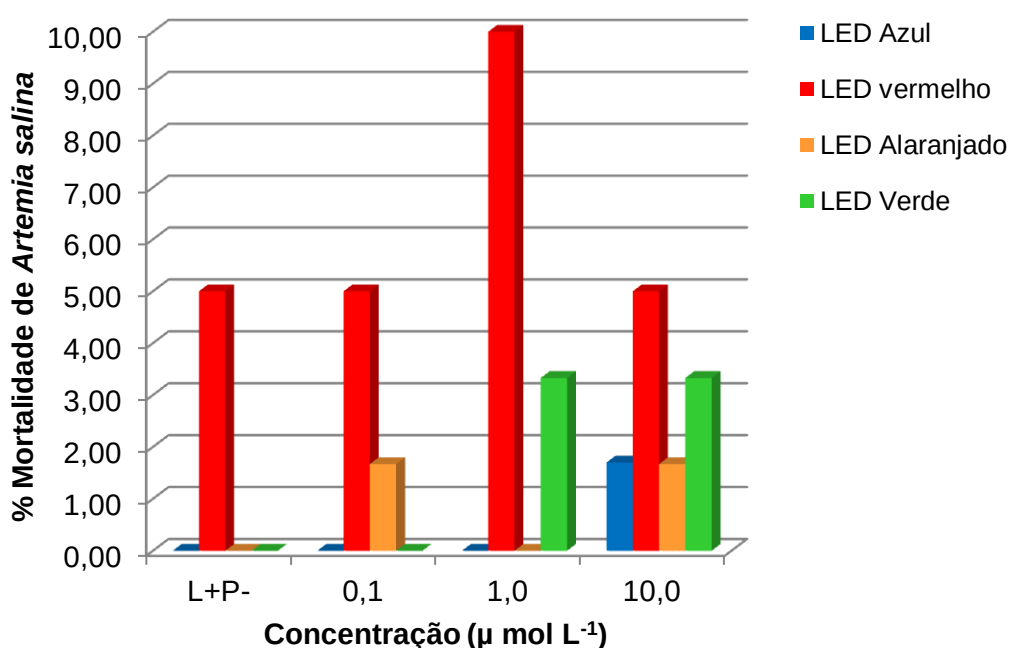


Figura 4.25 - Média de mortalidade de *Artemia salina* para soluções aquosas de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, em diferentes concentrações, associado aos sistemas de LED azul, vermelho, alaranjado e verde, grupo L+P- (presença de luz e ausência de FS).

Devido à falta de reprodutibilidade entre os vários testes realizados, de toxicidade e atividade fotodinâmica sobre os microcrustáceos, os resultados obtidos nos ensaios com *Artemia salina* não foram considerados neste trabalho.

4.5.2 Avaliação de atividade fotodinâmica em cultura de micro-organismo

A terapia fotodinâmica antimicrobiana é uma interessante opção terapêutica para eliminação ou redução de micro-organismos patogênicos. Essa nova modalidade de tratamento é bastante investigada atualmente, empregando-se diferentes classes de FS e fontes de luz, na inativação de diferentes micro-organismos, apresentando resultados promissores (CORMICK et al., 2009; COSTA et al., 2011; GEROLA et al., 2011; ROLIM et al., 2012).

Zolfaghari e colaboradores observaram atividade fotodinâmica significativa sobre *S. aureus* metilicina resistente, em feridas de ratos, usando o sistema azul de metileno/laser (ZOLFAGHARI et al., 2009).

Cassidy, Donnelly e Tunney verificaram que doses sub-letais de PACT não afetaram a susceptibilidade de *S. aureus* e *P. aeruginosa* a antibióticos rotineiramente usados para tratamentos de infecções causadas por essas bactérias. Assim, concluiu-se que a PACT pode ser utilizada sozinha ou em combinação com tratamentos com antibióticos convencionais, sem que ocorra desenvolvimento de resistência bacteriana (CASSIDY; DONNELLY; TUNNEY, 2010). Desse modo, a combinação desses tratamentos poderia ser útil para eliminação mais significativa de bactérias hospitalares.

Devido às interessantes propriedades físico-químicas dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$, associados aos dispositivos de LED verde e azul, já investigadas neste trabalho, estes sistemas foram selecionados para avaliar a eficiência fotodinâmica sobre as bactérias patogênicas, *S. aureus* ATCC e hospitalar. Os tempos foram escolhidos com base em resultados anteriores do grupo e da literatura (ALVES et al., 2009; BANFI et al., 2006; CAMINOS, DURANTINI, 2007; SWIECH, 2010).

Os resultados obtidos do número médio de UFC mL^{-1} de *S. aureus* ATCC e hospitalar para os diferentes grupos testados frente ao sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]/\text{LED}$ azul estão representados na Tabela 4.6. A análise estatística dos dados, apontado na Tabela 4.7, indicou que esse sistema apresenta efeito fotodinâmico sobre o número de micro-organismos após o período de três horas de exposição. Além disso, pode-se observar também que o período de uma hora de exposição ao LED azul foi suficiente para causar redução no número de UFC das cepas de *S. aureus* ATCC, obtendo-se um valor de $p < 0,001$. Os dados podem ser visualizados na Figura 4.26.

A partir dos dados analisados observou-se que a exposição por uma hora não foi suficiente para redução significativa no número de UFC para a cepa hospitalar, sugerindo que para essa bactéria, nas condições testadas, o tempo de exposição foi determinante. Esse resultado era esperado uma vez que as bactérias hospitalares apresentam alta resistência a vários antibióticos. Porém, estudos sugerem que essas bactérias podem ser eliminadas utilizando-se a PACT ou a combinação entre PACT e administração de antibióticos (CASSIDY; DONNELLY; TUNNEY, 2010; ZOLFAGHARI et al., 2009).

Tabela 4.6 - Média de UFC mL⁻¹ das cepas de *S. aureus* ATCC e hospitalar, obtidas para os diferentes grupos experimentais frente ao sistema Na₄[H₂(TDFSP)]/LED azul.

Cepa	GRUPOS							
	Tempo de exposição (1 hora)				Tempo de exposição (3 horas)			
	L-P-	L-P+	L+P-	L+P+	3L-P-	3L-P+	3L+P-	3L+P+
<i>S. aureus</i> (ATCC)	3,60x10 ²	3,18x10 ²	3,16x10 ²	6,00x10 ¹	2,04x10 ²	1,43x10 ²	2,02x10 ²	5,00x10 ¹
<i>S. aureus</i> (hospitalar)	1,07x10 ⁴	9,60x10 ³	1,03x10 ⁴	7,00x10 ³	8,25x10 ³	1,07x10 ⁴	8,05x10 ³	2,50x10 ¹

Grupos: L-P- ausência de luz e FS; L-P+ ausência de luz e presença de FS; L+P- presença de luz e ausência de FS; L+P+ presença de luz e FS.

Tabela 4.7 - Resultados da análise estatística (ANOVA – Teste de Tukey) para os diversos grupos referente ao sistema Na₄[H₂(TDFSP)]/LED azul.

Cepa	Grupos	p < 0,05	Intensidade do efeito
<i>S. aureus</i> (ATCC)	L-P- vs L+P+	Sim	***
	L-P- vs L+P-	Não	ns
	L-P- vs L-P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P+	Sim	**
	3L-P- vs 3L+P-	Não	ns
	3L-P- vs 3L-P+	Não	ns
<i>S. aureus</i> (hospitalar)	L-P- vs L+P+	Não	ns
	L-P- vs L+P-	Não	ns
	L-P- vs L-P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P+	Sim	***
	3L-P- vs 3L+P-	Não	ns
	3L-P- vs 3L-P+	Não	ns

ns = não significativo; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

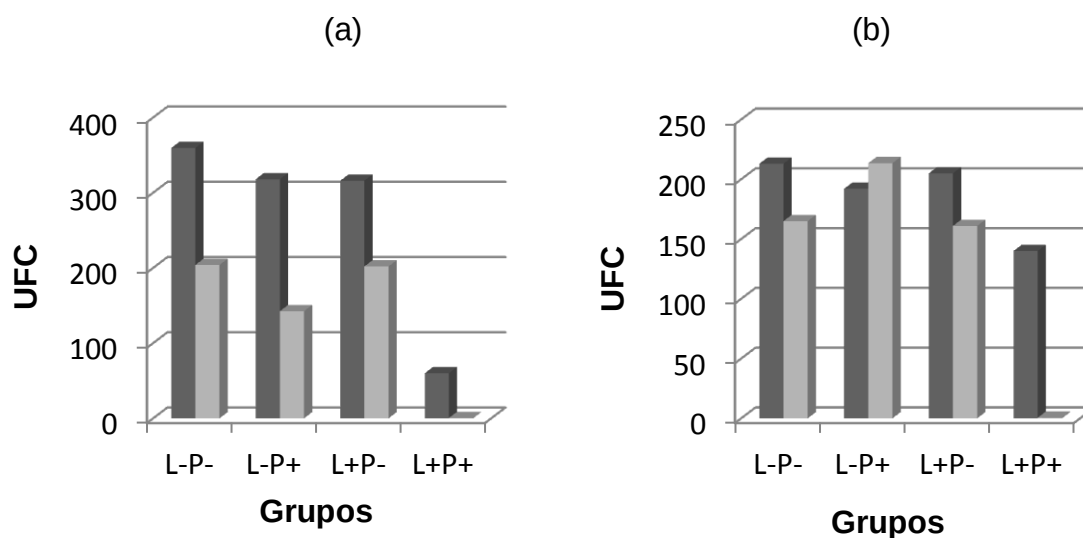


Figura 4.26 - Média de UFC dos diferentes grupos experimentais para as bactérias (a) *S. aureus* ATCC e (b) *S. aureus* hospitalar, utilizando-se o sistema Na₄[H₂(TDFSP)] 1,0 μmol L⁻¹ / LED azul, durante (■) 1 hora e (□) 3 horas de iluminação.

Os resultados do efeito antimicrobiano do sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ azul, estão apresentados na Tabela 4.8. Pode-se observar que o derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ apresentou efeito fotodinâmico significativo associado ao LED azul (L+P+), somente após 3 horas de irradiação, sobre as cepas bacterianas de *S. aureus* ATCC e hospitalar (Tabela 4.9). A Figura 4.27 ilustra essas diferenças.

Tabela 4.8 - Média de UFC mL^{-1} das cepas de *S. aureus* ATCC e hospitalar, obtidas para os diferentes grupos experimentais frente ao sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ azul.

Cepa	GRUPOS							
	Tempo de exposição (1 hora)				Tempo de exposição (3 horas)			
	L-P-	L-P+	L+P-	L+P+	3L-P-	3L-P+	3L+P-	3L+P+
<i>S. aureus</i> (ATCC)	$3,83 \times 10^3$	$3,90 \times 10^3$	$3,85 \times 10^3$	$2,08 \times 10^3$	$5,25 \times 10^3$	$3,53 \times 10^3$	$1,98 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$
<i>S. aureus</i> (hospitalar)	$8,80 \times 10^3$	$8,03 \times 10^3$	$6,15 \times 10^3$	$5,70 \times 10^3$	$9,43 \times 10^3$	$5,65 \times 10^3$	$3,75 \times 10^3$	$1,50 \times 10^2$
Grupos: L-P- ausência de luz e FS; L-P+ ausência de luz e presença de FS; L+P- presença de luz e ausência de FS; L+P+ presença de luz e FS.								

Tabela 4.9 - Resultados da análise estatística (ANOVA – Teste de Tukey) para os diversos grupos referente ao sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ azul.

Cepa	Grupos	p < 0,05	Intensidade do efeito
<i>S. aureus</i> (ATCC)	L-P- vs L+P+	Não	ns
	L-P- vs L+P-	Não	ns
	L-P- vs L-P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P+	Sim	*
	3L-P- vs 3L+P-	Não	ns
	3L-P- vs 3L-P+	Não	ns
<i>S. aureus</i> (hospitalar)	L-P- vs L+P+	Não	ns
	L-P- vs L+P-	Não	ns
	L-P- vs L-P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P+	Sim	*
	3L-P- vs 3L+P-	Não	ns
	3L-P- vs 3L-P+	Não	ns

ns = não significativo; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

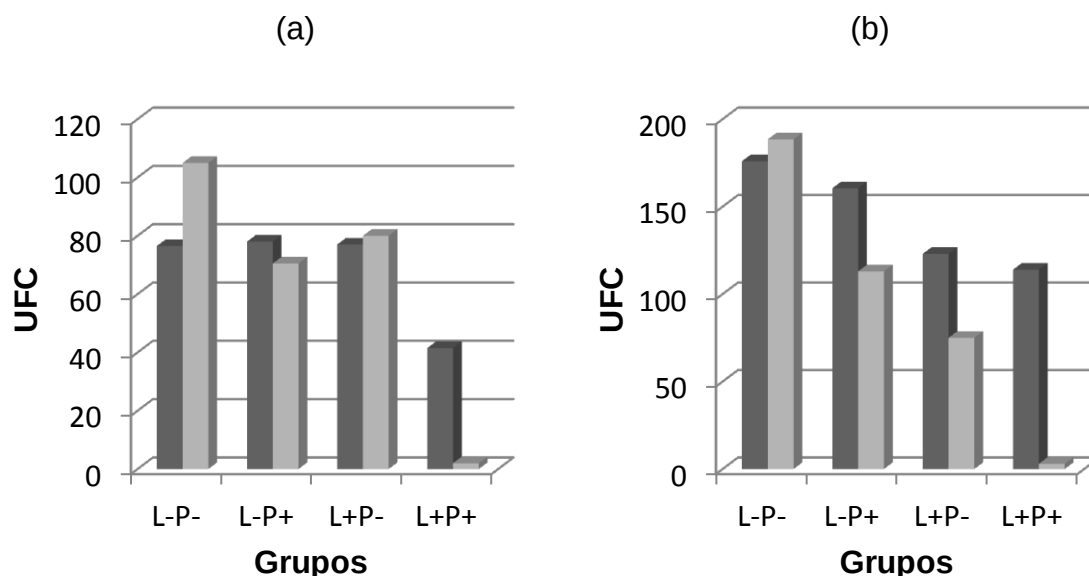


Figura 4.27- Média de UFC dos diferentes grupos experimentais para as bactérias (a) *S. aureus* ATCC e (b) *S. aureus* hospitalar, utilizando-se o sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ / LED azul, durante (*) 1 hora e (*) 3 horas de iluminação.

Comparando-se a eficiência dos derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, ambos associados ao LED azul, verificou-se que o primeiro apresentou maior atividade fotodinâmica, uma vez que, a intensidade do efeito obtida apresentou um valor de $p < 0,001$ sobre a *S. aureus* hospitalar e um valor de $p < 0,01$ sobre a *S. aureus* ATCC, após três horas de irradiação. Enquanto o derivado $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ apresentou um valor de $p < 0,05$ para ambas as cepas, após o mesmo período de tempo. Além disso, para o composto $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ o tempo de exposição de uma hora já apresentou efeito fotodinâmico significativo para as cepas de *S. aureus* ATCC ($p < 0,001$).

As Figuras 4.28 a 4.31 ilustram as diferenças obtidas no número de UFC das bactérias *S. aureus* (ATCC e hospitalar), para o grupo controle, L-P-, em relação ao grupo L+P+, para os sistemas $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ /LED azul e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ /LED azul.

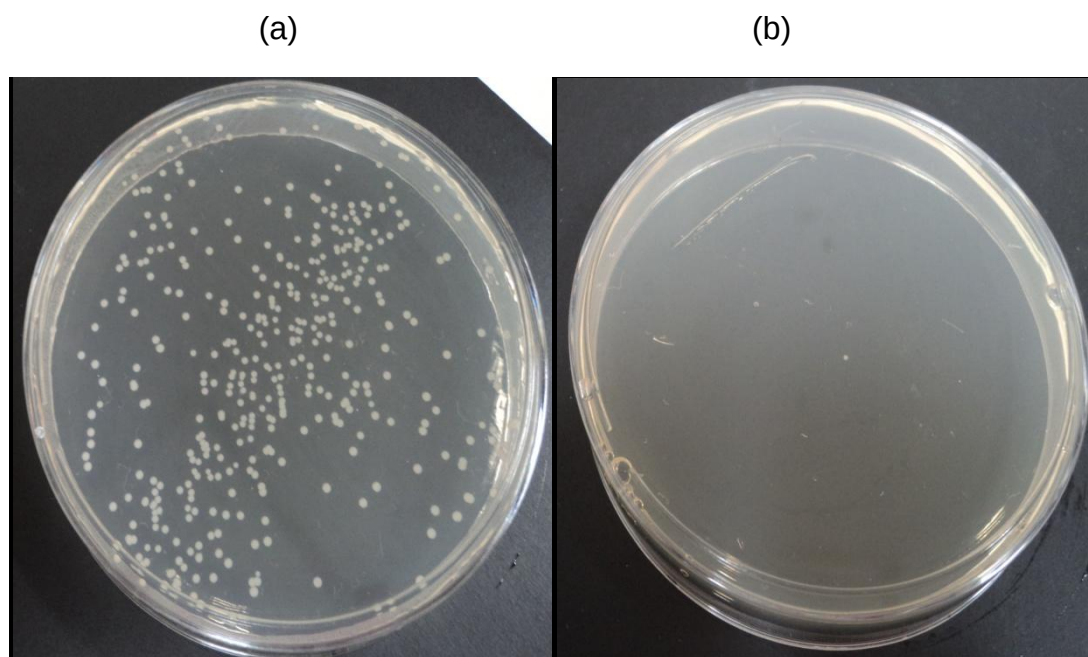


Figura 4.28 - Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônias de *S. aureus* ATCC, (a) Controle ausência de LED e derivado porfirínico (L-P-) (b) presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado com LED azul durante 3 horas (L+P+).

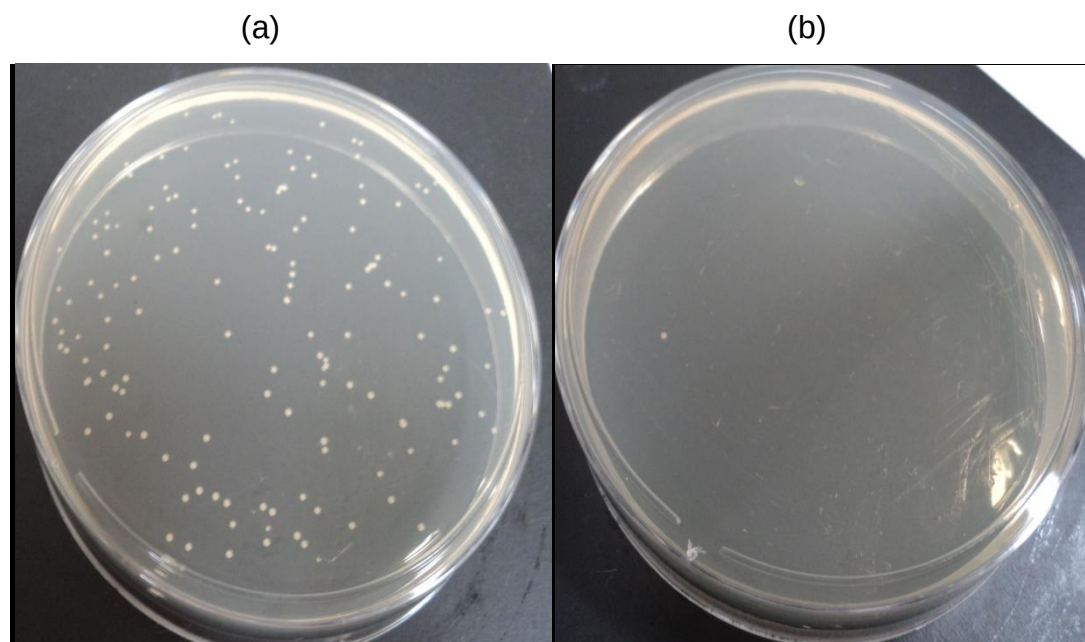


Figura 4.29 - Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônias de *S. aureus* hospitalar, (a) Controle ausência de LED e derivado porfirínico (L-P-) (b) presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado com LED azul durante 3 horas (L+P+).

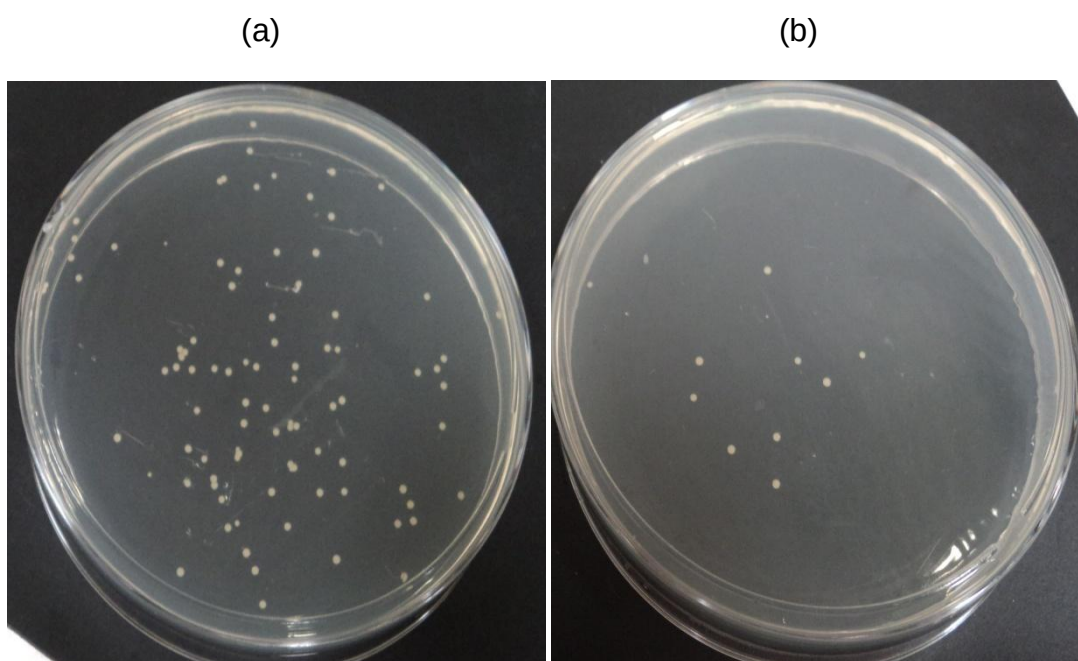


Figura 4.30 - Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônias de *S. aureus* ATCC, (a) Controle ausência de LED e derivado porfirínico (L-P-) (b) presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado com LED azul durante 3 horas (L+P+).

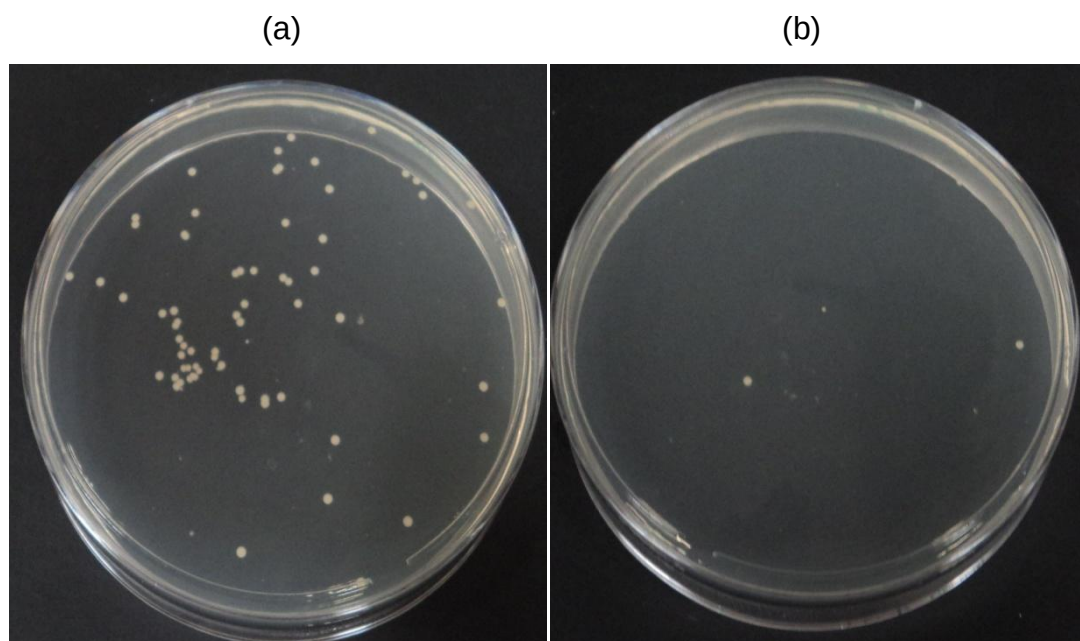


Figura 4.31 - Placas de Petri contendo unidades formadoras de colônias de *S. aureus* hospitalar, (a) Controle ausência de LED e derivado porfirínico (L-P-) (b) presença do derivado porfirínico $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$ $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado com LED azul durante 3 horas (L+P+).

Com a intenção de comparar a eficiência dos sistemas de LED, os mesmos derivados porfirínicos, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$, foram associados ao LED verde. A atividade fotodinâmica desses sistemas foi, então, investigada, sobre as cepas de *S. aureus* ATCC e hospitalar.

As Tabelas 4.10 e 4.11 apresentam o número médio de colônias e a análise estatística, respectivamente, para o sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ /LED verde. De acordo com os dados, pode-se observar que esse sistema não possui atividade fotodinâmica significativa para ambas as cepas de *S. aureus* investigadas. O mesmo ocorreu para o sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ /LED verde, cujos resultados estão apresentados nas Tabelas 4.12 e 4.13.

Tabela 4.10 - Média de UFC mL^{-1} das cepas de *S. aureus* ATCC e hospitalar, obtidas para os diferentes grupos experimentais frente ao sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ /LED verde.

Cepa	GRUPOS							
	Tempo de exposição (1 hora)				Tempo de exposição (3 horas)			
	L-P-	L-P+	L+P-	L+P+	3L-P-	3L-P+	3L+P-	3L+P+
<i>S. aureus</i> (ATCC)	$2,09 \times 10^3$	$2,48 \times 10^3$	$3,08 \times 10^3$	$2,28 \times 10^3$	$1,74 \times 10^3$	$2,43 \times 10^3$	$2,55 \times 10^3$	$2,25 \times 10^3$
<i>S. aureus</i> (hospitalar)	$8,85 \times 10^3$	$1,02 \times 10^4$	$1,03 \times 10^4$	$5,48 \times 10^3$	$5,63 \times 10^3$	$4,78 \times 10^3$	$6,83 \times 10^3$	$1,20 \times 10^3$

Grupos: L-P- ausência de luz e FS; L-P+ ausência de luz e presença de FS; L+P- presença de luz e ausência de FS; L+P+ presença de luz e FS.

Tabela 4.11 - Resultados da análise estatística (ANOVA – Teste de Tukey) para os diversos grupos referente ao sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ /LED verde.

Cepa	Grupos	p < 0,05	Intensidade do efeito
<i>S. aureus</i> (ATCC)	L-P- vs L+P+	Não	ns
	L-P- vs L+P-	Não	ns
	L-P- vs L+P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P-	Não	ns
	3L-P- vs 3L-P+	Não	ns
<i>S. aureus</i> (hospitalar)	L-P- vs L+P+	Não	ns
	L-P- vs L+P-	Não	ns
	L-P- vs L+P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P-	Não	ns
	3L-P- vs 3L-P+	Não	ns

ns = não significativo; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Tabela 4.12 - Média de UFC/mL das cepas de *S. aureus* ATCC e hospitalar, obtidas para os diferentes grupos experimentais frente ao sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]/\text{LED}$ verde.

Cepa	GRUPOS							
	Tempo de exposição (1 hora)				Tempo de exposição (3 horas)			
	L-P-	L-P+	L+P-	L+P+	3L-P-	3L-P+	3L+P-	3L+P+
<i>S. aureus</i> (ATCC)	$7,08 \times 10^3$	$5,58 \times 10^3$	$8,22 \times 10^3$	$2,88 \times 10^3$	$4,50 \times 10^3$	$5,65 \times 10^3$	$5,46 \times 10^3$	$5,50 \times 10^2$
<i>S. aureus</i> (hospitalar)	$2,15 \times 10^3$	$2,38 \times 10^3$	$3,08 \times 10^3$	$1,98 \times 10^3$	$1,65 \times 10^3$	$2,33 \times 10^3$	$2,55 \times 10^3$	$7,50 \times 10^2$

Grupos: L-P- ausência de luz e FS; L-P+ ausência de luz e presença de FS; L+P- presença de luz e ausência de FS; L+P+ presença de luz e FS.

Tabela 4.13 - Resultados da análise estatística (ANOVA – Teste de Tukey) para os diversos grupos referente ao sistema $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]/\text{LED}$ verde.

Cepa	Grupos	p < 0,05	Intensidade do efeito
<i>S. aureus</i> (ATCC)	L-P- vs L+P+	Não	ns
	L-P- vs L+P-	Não	ns
	L-P- vs L-P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P-	Não	ns
	3L-P- vs 3L-P+	Não	ns
<i>S. aureus</i> (hospitalar)	L-P- vs L+P+	Não	ns
	L-P- vs L+P-	Não	ns
	L-P- vs L-P+	Não	ns
	3L-P- vs 3L+P+	Não	Ns
	3L-P- vs 3L+P-	Não	Ns
	3L-P- vs 3L-P+	Não	Ns

ns = não significativo; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

Assim, os resultados do presente trabalho indicam que o LED azul é mais eficiente em relação ao verde, levando a uma significativa redução no número de UFC de *S. aureus* ATCC e hospitalar, associado a ambos os derivados porfirínicos analisados, sendo que o sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]/\text{LED}$ azul apresentou maior atividade fotodinâmica, indicando que poderá ser aplicado, com êxito, em PACT.

Os resultados mostraram ainda, que os derivados porfirínicos na ausência de luz (L-P+) e a irradiação com LED na ausência do FS (L+P-) não apresentaram redução significativa no número de cepas bacterianas nos intervalos de tempo testados.

Estudos demonstram que vários derivados porfirínicos, tem potencial para serem usados com sucesso para inativar diferentes espécies de micro-organismos,

e indicam que porfirinas catiônicas são mais ativas que as aniônicas ou neutras na destruição de bactérias (ALVES et al., 2009; CORMICK et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

Oliveira e colaboradores estudaram a eficiência de derivados porfirínicos neutros e catiônicos empregando-se, como fonte de luz, lâmpada de quartzo/halogênio de 250 W (400-800 nm) para inativação do *Bacillus cereus*, utilizado como modelo de bactéria endósporo. Eles verificaram que o FS neutro, mono e dicatiônico levaram a uma insignificante inativação da bactéria. Por outro lado, os derivados porfirínicos tri- e tetra-catiônico apresentaram bons resultados (OLIVEIRA et al., 2009).

Cormick e pesquisadores investigaram a atividade fotodinâmica de derivados porfirínicos catiônicos associados a uma lâmpada de 150 W, sobre a levedura *Candida albicans*, e empregaram a porfirina [$H_2(TSPP)$], como modelo de FS aniônico. Eles verificaram que a porfirina aniônica não mostrou significativa inativação para a cultura de *C. albicans*. Eles concluíram que a baixa atividade fotodinâmica da [$H_2(TSPP)$] se deve a fraca ligação entre a porfirina e as células da levedura. Por outro lado, as porfirinas catiônicas mostraram-se eficientes, apresentando alta afinidade por células de *C. albicans* (CORMICK et al., 2009).

Apesar de ser um estudo inicial, e dos resultados da literatura apontarem a baixa eficiência fotodinâmica de derivados porfirínicos aniônicos, os resultados do presente estudo, indicam que, o sistema, $Na_4[H_2(TDFSPP)]/LED$ azul apresenta atividade fotodinâmica sobre as cepas de *S. aureus*, de origem ATCC e hospitalar.

Com relação aos sistemas de irradiação, dados da literatura indicam que os sistemas de LED podem ser eficientes para uso em PACT, apresentando resultados satisfatórios (COSTA et al., 2011; GEROLA et al., 2011; GOIS et al., 2010; PELOI et al., 2008). Peloi e colaboradores verificaram que a utilização de LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 663 \text{ nm}$) associado ao corante azul de metileno (AM) apresentou efeito fotodinâmico contra cepas de *S.aureus* ATCC. Os autores concluíram que a vantagem na utilização do LED se deve a sobreposição espectral entre a emissão deste e o espectro de absorção do AM (PELOI et al., 2008).

Costa e colaboradores verificaram que as cepas de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* foram significativamente reduzidas por meio da PACT, empregando-se o composto eritrosina e LED verde (COSTA et al., 2011).

Gerola e colaboradores investigaram o uso da PACT, utilizando como FS derivados de clorofila associados ao LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} \sim 660 \text{ nm}$) para inativação dos micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Os autores concluíram que o FS que apresentou maior rendimento de oxigênio singlete foi o responsável por maior atividade fotodinâmica frente aos micro-organismos (GEROLA et al., 2011).

No presente trabalho, verificou-se que o LED azul apresentou eficiência fotodinâmica apenas associado aos derivados porfirínicos (L+P+), não apresentando efeitos térmicos significativos (L+P-) contra as cepas bacterianas investigadas.

4.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE OS RESULTADOS

Os resultados dos experimentos para determinação da absorvidade molar indicaram que os compostos não estão agregados na faixa de concentração utilizada. Os dados obtidos no teste de fotobranqueamento mostraram que os derivados porfirínicos apresentaram-se estáveis quando irradiados com diferentes sistemas de LED nas condições testadas.

Os testes com a proteína BSA e com ácido úrico (AU) indicam que os sistemas FS/LED investigados são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, a estabilidade dos compostos pode ser explicada pela baixa tendência de interação química entre as EROs e os derivados porfirínicos estudados. Esta característica é interessante para aplicação destes compostos em Terapia Fotodinâmica, uma vez que, as EROs geradas ficam livres para reagir apenas com as células alvo, possibilitando um aumento do efeito fotodinâmico.

Os resultados obtidos no teste do AU indicaram que os sistemas investigados são capazes de gerar oxigênio singlete, levando a uma diminuição na banda de absorção do AU. Porém, esse teste foi qualitativo, indicando apenas se os sistemas investigados são capazes de gerar $^1\text{O}_2$. Assim, uma pequena diferença na porcentagem de degradação de AU, não mostra, necessariamente, que um sistema apresente uma maior eficiência fotodinâmica.

Os dados obtidos nos experimentos de foto-oxidação de BSA também indicaram que os derivados porfirínicos analisados apresentaram ação fotodinâmica quando irradiados com LED, exceto o derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, que mostrou baixa constante de foto-oxidação de BSA. Os valores das constantes de foto-oxidação de BSA obtidas para os compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]$, utilizando-se os LEDs verde e azul, são comparáveis aos descritos na literatura para outros compostos, inclusive para fármacos já usados clinicamente em TFD, apontando, que estes podem ser eficientes quando utilizados em terapia fotodinâmica.

A eficiência fotodinâmica dos sistemas FS/LED foi comprovada por meio dos ensaios microbiológicos, uma vez que os sistemas $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ azul e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ azul apresentaram atividade fotodinâmica sobre cepas de *S. aureus* hospitalar e ATCC, sendo que o sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSPP})]/\text{LED}$ azul mostrou-se mais eficiente.

5 CONCLUSÃO

Os derivados porfirínicos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$, $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ e $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$ não apresentaram alterações significativas nos espectros de absorção no UV-Vis quando irradiados com sistemas de LED alaranjado, vermelho, verde e azul, indicando que são fotoestáveis nas condições testadas.

Os sistemas FS/LED estudados levaram a oxidação da proteína BSA, exceto para o derivado porfirínico $\{\text{Na}_4[\text{Mn}(\text{TSP})]\}^+$, que apresentou baixa degradação desta, quando irradiado com os diferentes LEDs utilizados. Os valores das constantes de foto-oxidação obtidos, assim como os resultados do teste de ácido úrico, para os compostos $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$, utilizando-se os LEDs verde e azul, indicam que estes compostos podem ser eficientes em terapia fotodinâmica.

Ambos os sistemas, $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ /LED azul e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ /LED azul, apresentaram atividade fotodinâmica antimicrobiana, promovendo significativa redução no número de UFC das cepas de *S. aureus* ATCC e hospitalar, sendo que o sistema $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ /LED azul apresentou maior atividade fotodinâmica.

Os resultados obtidos para os sistemas $\text{Na}_4[\text{H}_2(\text{TDFSP})]$ /LED azul e $\text{Na}_4[\text{Zn}(\text{TDFSP})]$ /LED azul mostram que estes sistemas poderão ser aplicados em Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana e estimulam a realização de outros experimentos para avaliação complementar da atividade fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 250-281, 2011.

ALBRECHT, V.; GITTER, B. **Método de destruição de bactéria numa área de tratamento do paciente e composição antimicrobiana de terapia fotodinâmica**. PI 0414331-0 A, 07 nov. 2006.

ALBRECHT, V.; WIELAND, G.; GITTER, B.; NEUBERGER, W. **Enhanced Anti-Microbial PDT**. WO 2011/090885 A2, 28 jul. 2011.

ALVES, E.; COSTA, L.; CARVALHO, C. M. B.; TOMÉ, J. P. C.; FAUSTINO, M. A.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic *meso*-substituted porphyrins. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 70, p. 1-13, 2009.

AN, W.; JIAO, Y.; DONG, C.; YANG, C.; INOUE, Y.; SHUANG. Spectroscopic and molecular modeling of the binding of *meso*-tetrakis(4-hydroxyphenyl)porphyrin to human serum album. **Dyes and Pigments**, v. 81, p. 1-9, 2009.

ARAÚJO, F. R. P.; MARACAJÁ, P. B. **A sustentabilidade da exploração da artemia (*Artemia sp*): O caso do município de Grossos-RN**. Mossoró, 2002. Disponível em: <<http://monografias.com.br/trabalhos/exploracao-artemia/exploracaoartemia4.shtml>>. Acesso em 14 jan. 2011.

BAGNATO, V. S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; SANKARANKUTTY, A. K.; ZUCOLOTO, S.; SILVA, O. C. New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases. An overview of the experimental work performed in collaboration between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of the University of São Paulo. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 3-11, 2006.

BALZER, R. **Estudo físico-químico e biológico dos compostos [H₂(TDFSP)] e [Zn(TDFSP)] visando aplicação em terapia fotodinâmica (TFD)**. 2010, 113 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

BANFI, S.; CARUSO, E.; BUCCAFURNI, L.; BATTINI, V.; ZAZZARON, S.; BARBIERI, P.; ORLANDI, V. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, p. 28-38, 2006.

BERG, K.; SELBO, P. K.; WEYERGANG, A.; DIETZE, A.; PRASMICKAITE, L.; BONSTED, A.; ENGESAETER, B. O.; ANGELLPETERSEN, E.; WARLOE, T.; FRANDSEN, N.; HØGSET, A. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. **Journal of Microscopy**, v. 218, p. 133-147, 2005.

BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K.; TROJANOWICZ, M. Porphyrins in analytical chemistry: A review. **Talanta**, v. 51, p. 209-224, 2000.

BOHMER, R. M.; MORSTYN, G. Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells: effect of serum, pH, temperature and cell size. **Cancer Research**, v. 45, p. 5328-5334, 1985.

BONNEAU, S.; MORLIÈRE, P.; BRAULT, D. Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p.1443-1452, 2004.

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

BONNETT, R.; MARTÍNEZ, G. Photobleaching of compounds of the 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)-porphyrin series (*m*-THPP, *m*-THPC, and *m*-THPBC). **Organic Letters**, v. 4, n. 12, 2002.

BONNETT, R.; MARTÍNEZ, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, n. 591, p. 9513-9547, 2001.

BOSE, B.; DUBE, A. Interaction of chlorin p6 with bovine serum albumin and photodynamic oxidation of protein. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 86, p. 49-55, 2006.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **The Lancet Oncology**, v. 5, p. 497-508, 2004.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; Photodynamic therapy: update 2006. Part1: Photochemistry and photobiology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, p. 293-302, 2007.

CAMINOS, D. A.; DURANTINI, E. N. A Simple experiment to show photodynamic inactivation of bacteria on surfaces. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 35, n. 1, p. 64-69, 2007.

CASSIDY, C. M.; DONNELLY, R. F.; TUNNEY, M. M. Effect of sub-lethal challenge with Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) on the antibiotic susceptibility of clinical bacterial isolates. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 99, p. 62-66, 2010.

CAVALCANTE, R. S.; IMASATO, H.; BAGNATO, V. S.; PERUSSI, J. R. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 6, n. 1, p. 64-70, 2009.

CORMICK, M. P.; ALVAREZ, M. G.; ROVERA, M.; DURANTINI, E. N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 1592-1599, 2009.

COSTA, A. C. B. P.; RASTEIRO, V. M. C.; PEREIRA, C. A.; HASHIMOTO, E. S. H. S.; JUNIOR, M. B.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. **Archives of Oral Biology**, v. 56, p. 1299-1305, 2011.

CUNDERLÍKOVÁ, B.; KONGSHAUG, M.; GANGESKARB, L.; MOAN, J. Increased binding of chlorin e6 to lipoproteins at low pH values. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, p. 759-768, 2000.

DAVIES, M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v. 305, p. 761-770, 2003.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233, n. 234, p. 351-371, 2002.

DING, H.; YU, H.; DONG, Y.; TIAN, R.; HUANG, G.; BOOTHMAN, D. A.; SUMER, B. D.; GAO, J. Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. **Journal of Controlled Release**, v. 156, p. 276-280, 2011.

DOLMANS, D.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature**, v. 3, p. 380-387, 2003.

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.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

FISCHER, F.; GRASCHEW, G.; SINN, H. J.; MAIER-BORST, W.; LORENZ, W. J.; SCHLAG, P. M. A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. **Clinica chimica Acta**, v. 274, p. 89-104, 1998.

GAO, D.; TIAN, Y.; LIANG, F.; JIN, D.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; YU, A. Investigation on the pH-dependent binding of eosin Y and bovine serum albumin by spectral methods. **Journal of Luminescence**, v. 127, p. 515-522, 2007.

GEROLA, A. P.; SEMENSATO, J.; PELLOSI, D. S.; BATISTELA, V. R.; RABELLO, B. R.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: New calculation methodology considering the influence of photobleaching. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 232, p. 14-21, 2012.

GEROLA, A. P.; SANTANA, A.; FRANÇA, P. B.; TSUBONE, T. M.; OLIVEIRA, H. P. M.; CAETANO, W.; KIMURA, E.; HIOKA, N. Effects of metal and the phytol chain on chlorophyll derivatives: physicochemical evaluation for photodynamic inactivation of microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 87, p. 884-894, 2011.

GERWECK, L. E.; SEETHARAMAN, K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. **Cancer Research**, v. 56, p. 1194-1198, 1996.

GOIS, M. M.; KURACHI, C.; SANTANA, E. J. B.; MIMA, E. G. O.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; PELINO, J. E. P.; BAGNATO, V. S. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. **Lasers in Medical Science**, v. 25, p. 391-395, 2010.

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

GUILFOILE, P. G. **Antibiotic-resistant bacteria**. New York: Chelsea House Publishers, 2007.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, p. 436-450, 2004.

HARRIMAN, A.; PORTER, G. Photochemistry of manganese porphyrins. Part 1.- Characterisation of some water soluble complexes. **The Royal Institution**, p. 1532-1542, 1979.

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. **Metal-Based Drugs**, p. 1-24, 2008.

KADISH, K. M.; MAIYA, G. B.; ARAULLO, C.; GUILARD, R. Micellar effects on the aggregation of tetraanionic porphyrins. Spectroscopic characterization of free-base *meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin, (TPPS)H₂ and (TPPS)M (M= Zn(II), Cu(II), VO²⁺) in aqueous micellar media. **Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 14, 1989.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389-413, 2000.

KASSAB, K. Evaluating the antitumor activity of combined photochemotherapy mediated by a *meso*-substituted tetracationic porphyrin and adriamycin. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 41, p. 892-899, 2009.

KHARKWAL, G. B.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y-Y.; DAI, T.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p. 755-767, 2011.

KOLÁROVÁ, H.; MOSINGER, J.; LENOBEL, R.; KEJLOVÁ, K.; JÍROVÁ, D.; STRNAD, M. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. **Toxicology in Vitro**, v. 17, p. 775-778, 2003.

KONGSHAUG, M.; MOAN, J.; BROWN, S. B. The distribution of porphyrins with different tumour localising ability among human plasma proteins. **British Journal of Cancer**, v. 59, p.184-188, 1989.

KUBÁT, P.; LANG, K.; ANZENBACHER, P. J. Modulation of porphyrin binding to serum albumin by pH. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1670, p. 40-48, 2004.

LAMBRECHTS, S. A. G.; SCHWARTZ, K. R.; AALDERS, M. C. G.; DANKERT, J. B. Photodynamic inactivation of fibroblasts by a cationic porphyrin. **Lasers in Medical Science**, v. 20, p. 62-67, 2005.

LANG, K.; MOSINGER, J.; WAGNEROVÁ, D. M.; Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules: models for photodynamic therapy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, p.321-350, 2004.

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

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

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*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 7-11, 2009.

LI, Q.; SEEGER, S. Deep UV sensing of the interaction of porphyrin with bovine serum albumin protein. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 139, p.118-124, 2009.

LYON, J. P.; AZEVEDO, C. M. P. S.; MOREIRA, L. M.; LIMA, C. J.; RESENDE, M. A. Photodynamic antifungal therapy against chromoblastomycosis. **Mycopathologia**, v. 172, p. 293-297, 2011.

MA, H-M.; CHEN, X.; ZHANG, N.; HAN, Y-Y.; WU, D.; DU, B.; WEI, Q. Spectroscopic studies on the interaction of a water-soluble cationic porphyrin with proteins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 72, p. 465-469, 2009.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p.105-129, 2001.

MACHADO, A. E. H.; Terapia fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

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 the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 708-713, 2004.

MAISCH, T. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future? **Lasers in Medical Science**, v. 22, p. 83-91, 2007.

MAISCH, T.; BAIER, J.; FRANZ, B.; MAIER, M.; LANDTHALER, M.; SZEIMIES, R-M.; BAUMLER, W. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 17, p. 7223-7228, 2007.

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

MANTAREVA, V.; KUSSOVSKI, V.; ANGELOV, I.; BORISOVA, E.; AVRAMOV, L.; SCHNURPFEL, G.; WOHRLE, D. Photodynamic activity of water-soluble phthalocyanine zinc(II) complexes against pathogenic microorganisms. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 4829-4835, 2007.

MARTINS, B. M. R.; CARVALHO, M.; MOREIRA, M. E. L.; LOPES, J. M. A. Avaliação da eficácia clínica de uma nova modalidade de fototerapia utilizando diodos emissores de luz. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 3, p. 253-258, 2007.

MENDES, M. C. **Estudo das propriedades das porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ para potencial aplicação em terapia fotodinâmica**. 2008, 122 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a conveniente general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MILGROM, L. R. **The colours of life: An introduction to chemistry of porphyrins and related compounds**. New York: 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.

MORGAN, J.; OSEROFF, A. R. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 49, p. 71-86, 2001.

NOWIS, D.; MAKOWSKI, M.; STOKŁOSA, T.; LEGAT, M.; ISSAT, T.; GOŁĄB, J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. **Review Acta Biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 339-352, 2005.

NYMAN, E. S.; HYNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 73, p. 1-28, 2004.

O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 1053-1074, 2009.

OLIVEIRA, A.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, C. M. B.; TOMÉ, J. P. C.; FAUSTINO, M. A. F.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, Â. Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 1986-1995, 2009.

PARIJA, S.C. **Textbook of Practical Microbiology**. New Delhi: Ahuja Publishers, 2006.

PELOI, L. S.; SOARES, R. R. S.; BIONDO, C. E. G.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N.; KIMURA, E. Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue. **Journal of Bioscience**, v. 33, n. 2, p. 231-237, 2008.

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

PETERS JÚNIOR, T. **All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications**. New York: Academic Press, 1995.

PLAETZER, K.; KRAMMER, B.; BERLANDA, J.; BERR, F.; KIESSLICH, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, p. 259-268, 2009.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.; KLEIN, D. **Microbiology**. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2002.

QUIROGA, E. D.; ALVAREZ, M. G.; DURANTINI, E. N. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic action of 5,10,15,20-tetra(4-*N*-methylpyridyl)porphyrin in different media. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 60, p. 123-131, 2010.

RAGÀS, X.; AGUT, M.; NONELL, S. Singlet oxygen in *Escherichia coli*: New insights for antimicrobial photodynamic therapy. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 770-776, 2010.

RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A.; SILVA, A. R. da; FLORES, A. V.; RONCHI, L. M.; TEDESCO, A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2007.

RIBEIRO, J. N.; SILVA, A. R. da; JORGE, R. A. Involvement of mitochondria in apoptosis of câncer cells induced by photodynamic therapy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 6, p. 383-390, 2004.

RINCO, O.; BRENTON, J.; DOUGLAS, A.; MAXWELL, A.; HENDERSON, M.; INDRELIE, K.; WESSELS, J.; WIDIN, J. The effect of porphyrin structure on binding to human serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 208, p. 91-96, 2009.

ROLIM, J. P. M. L.; de-MELO, M. A. S.; GUEDES, S. F.; ALBUQUERQUE-FILHO, F. B.; SOUZA, J. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; ZANIN, I. C. J.; RODRIGUES, L. K. A. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 106, p. 40-46, 2012.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

RYSKOVA, L.; BUCHTA, V.; SLEZAK, R. Photodynamic Antimicrobial Therapy. **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 4, p. 400-406, 2010.

SAHU, K.; BANSAL, H.; MUKHERJEE, C.; SHARMA, M.; GUPTA, P. K. Atomic force microscopic study on morphological alterations induced by photodynamic action of toluidine blue O in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, p. 9-16, 2009.

SAKAMOTO, F. H.; TOREZAN, L.; ANDERSON, R. Photodynamic therapy for acne vulgaris: A critical review from basics to clinical practice. Part II. Understanding parameters for acne treatment with photodynamic therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 195-211, 2010.

SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E.; ALLEN, C. M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 53-76, 2004.

SILVA, J. D. **Caracterização espectroscópica e ensaios químico – biológicos de H₂(TNBPyP) e Zn(TPPS₄) visando utilização em terapia fotodinâmica**. 2009, 122 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007, 71 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SILVESTER, J. A.; TIMMINS, G. S.; DAVIES, M. J. Photodynamically generated bovine serum albumin radicals: evidence for damage transfer and oxidation at cysteine and tryptophan residues. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 5, p. 754-766, 1998.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, p. 557-559, 1998.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**, Porto Alegre: Bookman, 2002.

SNYDER, J. W.; SKOVSEN, E.; LAMBERT, J. D. C.; POULSEN, L.; OGILBY, P. R. Optical detection of singlet oxygen from single cells. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, p. 4280-4293, 2006.

SOARES, R. R. S. **Estudo de Propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando Terapia Fotodinâmica**. 2006, 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SOBSEY, M. D.; GOLD, A.; CASTEEL, M. J. **Inactivation of pathogens by porphyrins**. WO 02/02153 A1, 10 jan. 2002.

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

STRONG, A.; HAO, Y. **Combination of photodynamic therapy and anti- VEGF agents in the treatment of unwanted choroidal neovasculation**. WO 2010/069073 A1, 24 jun. 2010.

SWIECH, J. N. **Estudo das propriedades fotodinâmicas dos compostos [Fe(TPPS₄)] e [H₂(TMPyP)] para potencial aplicação como fármaco em terapia fotodinâmica**. 2010, 108 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

TANNOCK, I. F.; ROTIN, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. **Cancer Research**, v. 49, p. 373-4384, 1989.

TAO, J-S.; CURAUDEAU, A. H.; HUNT, D.; BONIFACE, G.; RUBINACHIK, V. **Photodynamic therapy of sebaceous gland disorders**. WO 2009/093144 A2, 30 jul. 2009.

TIAN, J.; LIU, X.; ZHAO, Y.; ZHAO, S. Studies on the interaction between tetraphenylporphyrin compounds and bovine serum albumin. **Luminescence**, v. 22, p. 446-454, 2007.

TITA, S. P. S.; PERUSSI, J. R. The effect of porphyrins on normal and transformed mouse cell lines in the presence of visible light. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p.1331-1336, 2001.

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

ZHANG, Y.; GÖRNER, H. Photooxidation of lysozyme or serum albumin bound to *meso*-tetra-arylporphyrins. **Dyes and Pigments**, v. 90, p. 163-169, 2011.

ZHENG, W.; SHAN, N.; YU, L.; WANG, X. UV-visible, fluorescence and EPR properties of porphyrins and metalloporphyrins. **Dyes and Pigments**, v. 77, p. 153-157, 2008.

ZOLFAGHARI, P. S.; PACKER, S.; SINGER, M.; NAIR, S. P.; BENNETT, J.; STREET, C.; WILSON, M. *In vivo* killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 27, p. 1-8, 2009.

WILSON, B. C.; PATTERSON, M.S; The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, p. 61-109, 2008.