



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Terapia fotodinâmica aplicada à erradicação de *Escherichia coli* e
Staphylococcus aureus: avaliação *in vitro* da eficiência de diferentes
fármacos fotossensíveis”.**

Vania Maria De Paoli

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área:
Química

RIBEIRÃO PRETO -SP

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Terapia fotodinâmica aplicada à erradicação de *Escherichia coli* e
Staphylococcus aureus: avaliação *in vitro* da eficiência de diferentes
fármacos fotossensíveis”.**

Vania Maria De Paoli

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2005



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Terapia fotodinâmica aplicada à erradicação de *Escherichia coli* e
Staphylococcus aureus: avaliação *in vitro* da eficiência de diferentes
fármacos fotossensíveis”.**

Vania Maria De Paoli

Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2005

"Uma coisa aprendi na minha longa vida: que a nossa ciência, contraposta à realidade, é primitiva e infantil. Não obstante, é a coisa mais preciosa que temos".

(Albert Einstein)

Primeiramente a Deus,

força maior a reger a minha vida, porque nada disso seria
possível sem Sua vontade.

*Eu não consigo entender, mas continuo confiando em meu Bom Pastor, porque sei
que Ele não me conduzirá a nenhum caminho que Ele não queria que eu percorra.*

(Alice Marquardt)

Eu acredito no sol, mesmo quando não posso vê-lo;

Eu acredito no amor, mesmo quando não posso senti-lo;

Eu acredito em Deus, mesmo quando Ele está em silêncio.

(Autor Desconhecido)

Dedico, também, às pessoas mais importantes de minha vida:

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”.

(Saint-Exupery)

Meus queridos pais, *Carlos e Elza*, a quem devo tudo o que tenho e tudo o que sou, e expresso o meu respeito e sincero agradecimento pelo amor, compreensão, dedicação e, principalmente, pelas oportunidades, apoio e incentivos dispensados durante toda minha vida.

Às minhas irmãs *Sueli, Silvia e Flávia*, que dão um sentido especial à minha vida e tanto contribuem para tornar a jornada mais suave. Obrigada pela amizade sincera e apoio incondicional.

Para *Yu-Wei*, por tornar minha vida mais feliz.

O TAMANHO DAS PESSOAS

(William Shakespeare)

Os tamanhos variam conforme o grau de envolvimento. Ela é enorme para você, quando fala do que leu e viveu, quando trata você com carinho e respeito, quando olha nos olhos e sorri destravado. É pequena para você quando só pensa em si mesma, quando se comporta de uma maneira pouco gentil, quando fracassa justamente no momento em que teria que demonstrar o que há de mais importante entre duas pessoas: a amizade, o respeito, o carinho, o zelo e até mesmo o amor.

Uma pessoa é gigante para você quando se interessa pela sua vida, quando busca alternativas para o seu crescimento, quando sonha junto com você. É pequena quando desvia do assunto.

Uma pessoa é grande quando perdoa, quando compreende, quando se coloca no lugar do outro, quando age não de acordo com o que esperam dela, mas de acordo com o que espera de si mesma. Uma pessoa é pequena quando se deixa reger por comportamentos clichês.

Uma mesma pessoa pode aparentar grandeza ou miudeza dentro de um relacionamento, pode crescer ou decrescer num espaço de poucas semanas. Uma decepção pode diminuir o tamanho de um amor que parecia ser grande. Uma ausência pode aumentar o tamanho de um amor que parecia ser ínfimo.

É difícil conviver com esta elasticidade: as pessoas se agigantam e se encolhem aos nossos olhos. Nosso julgamento é feito não através de centímetros e metros, mas de ações e reações, de expectativas e frustrações.

Uma pessoa é única ao estender a mão e, ao recolhê-la inesperadamente, se torna mais uma. O egoísmo unifica os insignificantes.

Não é a altura, nem o peso, nem os músculos que tornam uma pessoa grande. É a sua sensibilidade sem tamanho...

Agradecimento Especial

Se sua visão for para um ano, plante trigo.

Se sua visão for para dez anos, plante árvores.

Se sua visão for para a vida inteira, plante pessoas.

(Antigo Provérbio Chinês)

Um homem caminhava por uma região deserta. Ele se perdeu e não sabia

como sair dali. Outro homem veio-lhe ao encontro.

— Estou perdido. O senhor pode ensinar-me o caminho da saída?

— Não, respondeu o desconhecido, não posso ensinar-lhe o caminho da saída; mas,

se caminharmos juntos, talvez possamos encontrá-lo.

(Emery Nester)

Ao meu pai de ciência, *Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco*,
por me aceitar em seu grupo de pesquisa, pelos projetos e oportunidades
e, em especial, por permanecer ao meu lado em todos os momentos da
jornada. Obrigada pela confiança depositada, por todo apoio, pela boa
vontade e pela enorme paciência dispensada em todos os momentos.

Agradeço Também

Ao *Prof. Dr João Baptista Sargi Bonilha (in memorian)*, sempre presente em meus pensamentos e orações, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e por todas as lições ensinadas.

À *Profª. Drª. Ana Lúcia da Costa Darini*, pela doação do microorganismo *Staphylococcus aureus* e pela ajuda na adequação das condições experimentais. Obrigada pela atenção, boa vontade e paciência.

À técnica *Isabel Cristina V. Palazzo*, pela boa vontade, pela paciência e pela ajuda dispensadas sempre que precisei.

Ao *Prof. Dr. Pietro Ciancaglini* e seu grupo de pesquisa, que tantas vezes dividiram comigo o espaço de trabalho e que, apesar do incômodo causado, sempre me receberam de braços abertos.

Ao *Prof. Dr. Richard John Ward*, por permitir o uso de sua autoclave nos últimos meses do trabalho.

À todos os funcionários do Departamento de Química, em especial ao *Milton, Olímpia e Dias*, por toda a ajuda e boa-vontade.

Aos meus “escravos”, *Ísis e Luís Felipe (Magrelo)*, pela boa vontade e paciência que sempre tiveram e, em especial, pelo auxílio na lavagem do material.

A todas as pessoas que dividiram o espaço de trabalho no período de 1996 a 2005 (*Lázaro, Nei Marcos, Ana Paula Romani, Fabiana Sguilla, Adriano, Simara, Silvia, Saulo, Claire, Patrícia Ceron, Daniela Cremones, Bernadete, Ana Paula Vilela, Ana Paula Garcia, Anderson, Flávia Vena, Fabiana Bonilha, Isabel, Daniela Manfrim, Marcelo, Rubens, Rosane, Karina, Jeane, Andreza, Patrícia Macaroff, Alessandra, Leandro, Fernando, Ísis, Adriana, Luís Felipe, Olímpia, Profª. Laura,*

André, Juliana, Santônes, Tadeu, Cristina, Mariana, Ana Paula, Amanda, Jacques, Marília, Daniel, Jean e Evaldo). Alguns deixaram marcas, outros nem tanto, mas certamente todos contribuíram para o meu processo de aprendizagem e crescimento profissional e pessoal.

Aos amigos *Daniela Manfrim, Bernadete, Olímpia, Adriana, Isis, Fernando, Leandro, Claire e Jeane*, pela agradável convivência e, em especial, pela amizade e força dispensada em momentos difíceis e de desânimo.

À *Alessandra, Andreza e Patrícia Macaroff*, que me forneceram lições únicas.

À *Silvia*, minha amiga e espelho, que mesmo distante sempre se fez tão presente. Obrigada pelas infinitas colaborações.

À *Flávia*, minha maior companheira nos últimos anos, por permanecer ao meu lado e por acreditar em mim em todos os momentos desta jornada. Obrigada por tudo.

Aos meus cunhados, *Alexandre e Lucas*, pelo apoio.

À *Daniela Bertolucci*, pela fé contagiante e pela amizade e apoio nos momentos difíceis e de desânimo.

Ao *Adriano e Christiane Malta*, pela amizade dispensada em todos os momentos.

À Capes e à Fapesp (Processo 01/05364-3), pelo auxílio financeiro concedido.

“De tudo, ficaram:

A certeza de que estava começando,

A certeza de que seria interrompido antes de terminar,

Fazer da interrupção um novo caminho,

Fazer da queda um passo de dança,

Do medo uma escada, do sonho uma ponte,

Da procura um encontro”.

(Fernando Sabino)

ÍNDICE

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

I. INTRODUÇÃO	15
I.1. Resistência a Antibióticos	15
I.2. Terapia Fotodinâmica: Princípios e Histórico	20
I.2.1. Terapia Fotodinâmica na Erradicação de Bactérias	24
I.3. Os Mecanismos de Fotossensibilização	27
I.3.1. Oxigênio Singlete na Terapia Fotodinâmica.....	27
I.3.1.1. Determinação do Rendimento Quântico de Produção do Oxigênio Singlete	27
I.3.2. Radicais Livres de Oxigênio na Terapia Fotodinâmica	27
I.3.3. Espécies Reativas de Oxigênio na Erradicação de Bactéria	29
I.4. Os Microorganismos Utilizados: <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	33
I.5. Os Fármacos Fotossensíveis Utilizados no Projeto	37
I.6. Lipossomas como Sistemas de Liberação de Fármacos	35
I.7. Princípio Básico das Técnicas de Espectroscopia no Estado Estacionário e Resolvido no Tempo	38
I.7.1. Espectroscopia de Absorção no Estado Fundamental	38

I.7.2. Espectroscopia de Fluorescência	39
I.7.3. Fotólise por Pulso de Laser	39
II. OBJETIVOS	51
III. SEÇÃO EXPERIMENTAL	54
III.1. Materiais e Soluções	54
III.2. Aparelhagem	56
III.3. Metodologias	58
III.3.1. Preparação e Caracterização dos Sistemas de Liberação de Fármaco	59
III.3.1.1. Preparação e Caracterização da Estabilidade dos Lipossomas	59
III.3.1.2. Medida de Tamanho das Partículas dos Lipossomas	60
III.3.2. Caracterização Fotofísica dos Fármacos Fotossensíveis	61
III.3.2.1. Determinação das Propriedades Fotofísicas no Estado Estacionário	61
III.3.2.2. Determinação da Constante de Dimerização	61
III.3.2.3. Determinação do Rendimento Quântico de Fluorescência	62
III.3.2.4. Determinação dos Espectros de Absorção e Tempo de Vida do Transiente	63
III.3.2.5. Determinação do Rendimento Quântico de Formação do Estado Triplete	64

III.3.2.6. Determinação do Rendimento Quântico de Produção do Oxigênio Singlete	65
III.3.3. Estudos Envolvendo os Microorganismos	66
III.3.3.1. Controle da Assepsia do Local de Trabalho e Materiais Utilizados na Manipulação dos Microorganismos	66
III.3.3.2. Estocagem e Preservação das Culturas Bacterianas	67
III.3.3.3. Teste de Coloração de Gram dos Microorganismos	68
III.3.3.4. Determinação da Curva de Crescimento de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	69
III.3.3.5. Preparação dos Microorganismos para os Ensaios Fotodinâmicos	69
III.3.3.6. Determinação da Concentração dos Fármacos Fotossensíveis Acumulados por <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	70
III.3.3.7. Estudos Fotodinâmicos para a Erradicação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	71
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
IV.1. Preparação e Caracterização dos Sistemas de Liberação de Fármacos	74
IV.1.1. Preparação e Caracterização da Estabilidade dos Lipossomas	74
IV.1.2. Medida de Tamanho das Partículas dos Lipossomas	79
IV.2. Caracterização Fotofísica dos Fármacos Fotossensíveis	81
IV.2.1. Determinação das Propriedades Fotofísicas no Estado Estacionário	82

IV.2.2. Determinação da Constante de Dimerização	90
IV.2.3. Determinação do Rendimento Quântico de Fluorescência	99
IV.2.4. Determinação dos Espectros de Absorção e Tempo de Vida do Transiente	104
IV.2.5. Determinação do Rendimento Quântico de Formação do Estado Triplete	110
IV.2.6. Determinação do Rendimento Quântico de Produção do Oxigênio Singlete	116
IV.3. Estudos Envolvendo Microorganismos	120
IV.3.1. Determinação da Curva de Crescimento de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	120
IV.3.2. Determinação da Concentração dos Fármacos Fotossensíveis Acumulados por <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	122
IV.3.3. Estudos Controle para a Determinação da Toxicidade da Luz e a Toxicidade Intrínseca dos Fármacos Fotossensíveis para <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	130
IV.3.4. Estudos Fotodinâmicos para a Erradicação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	137
IV.3.5. Influência do Tempo de Incubação Sobre a Eficiência Fotodinâmica dos Fármacos Fotossensíveis na Erradicação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	154
V. CONCLUSÕES	157
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema I.1: Reação do oxigênio singlete com algumas biomoléculas29

Esquema I.2: Estrutura molecular dos fármacos fotossensíveis utilizados neste trabalho: (A) TMPyPH₂, (B) VBBO e (C) ZnPc.....36

Esquema IV.1: Estrutura proposta para o dímero da TMPyPH₂98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Estrutura esquemática da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	26
Figura I.2: Digrama de Jablonski para um sistema fotoluminescente.	28
Figura I.3: Diagrama de orbital molecular para o oxigênio molecular.	
Figura I.4: Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares π^* do oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$) e no estado excitado singlete ($^1\Delta_g, ^1\Sigma_g^+$).	
Figura I.5: Radicais livres produzidos por reações em cadeia nos sistemas biológicos.	
Figura I.6: Estrutura esquemática de um lipossoma mostrando a bicamada unilamelar fosfolipídica e o centro aquoso.	32
Figura I.7: Diferenças estruturais dos diferentes lipossomas.	
Figura I.8: Representação esquemática do sistema utilizado em experimentos de fotólise por pulso de Laser.	40
Figura III.1: Espectro de transmitância dos filtros ópticos utilizados para selecionar radiação na faixa de comprimento de onda de (-) 400 – 500 nm e (-) 600 – 700 nm.	
Figura III.2: Micrografia dos microorganismos (A) <i>S. aureus</i> e (B) <i>E coli</i> corados pelo teste de Gram.	69

Figura IV.1: Perfil de degradação do lipossoma catiônico de (A) DPPC/ colesterol/ DDAB/ LPC e (B) PC/ colesterol/ DDAB/ LPC, ambas formulações na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04.	78
Figura IV.2. Espectro de absorção da TMPyPH ₂ 5,0 µM em água.	83
Figura IV.3. Espectro de emissão de fluorescência da TMPyPH ₂ 5,0 µmol.L ⁻¹ em água.	84
Figura IV.4. Espectro de absorção normalizado da ZnPc em (A) meio orgânico de (-) etanol e (-) DMSO/DMF 50% (v/v) e (B) lipossomas catiônicos de (-) DPPC/colesterol/DDAB/LPC e (-) PC/colesterol/DDAB/LPC, ambas formulações na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04.	85
Figura IV.5. Espectro de emissão de fluorescência normalizado da ZnPc em (A) meio orgânico de (-) etanol e (-) DMSO/DMF 50% (v/v) e (B) lipossomas catiônicos de (-) DPPC/colesterol/DDAB/LPC e (-) PC/colesterol/DDAB/LPC, ambas formulações na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04).	87
Figura IV.6: Espectro de absorção normalizado do VBBO em (-) água e (-) solução fisiológica.	89
Figura IV.7: Espectro de emissão de fluorescência do VBBO 11,0 µmol.L ⁻¹ em água.	90
Figura IV.8: Variação no espectro de absorção do VBBO com o aumento de sua concentração em (A) água e (B) solução fisiológica. A concentração do fármaco em solução (µmol.L ⁻¹) foi (-) 0,58; (-) 3,0; (-) 6,0; (-) 9,0; (-) 12,0; (-) 15,0; (-) 18,0; (-) 24,0; (-) 30,0; (-) 35,0; (-) 47,0; (-) 58,0.	92

Figura IV.9: Determinação da constante de dimerização para o VBBO em (♦) água e (*) solução fisiológica. Inseto: Regressão utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt para o VBBO em solução fisiológica.	95
Figura IV.10. Espectro de emissão de fluorescência corrigido normalizado para a ZnPc em (-) etanol e lipossomas de (-) DPPC/colesterol/DDAB/LPC e (-) PC/colesterol/DDAB/LPC.	101
Figura IV.11: Espectros de absorção e emissão de fluorescência (inseto) normalizado do violeta de cresila em metanol.	103
Figura IV.12: Espectro de absorção do transiente da ZnPc em (♦) etanol, (*) DMSO/DMF 50% (v/v) e lipossomas de (●) de DPPC/colesterol/DDAB/LPC e (▲) PC/colesterol/DDAB/LPC, ambas formulações com a razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04. As leituras de absorção do transiente foram determinadas 9 ns após o pulso de excitação do laser.	105
Figura IV.13: Decaimento do transiente da ZnPc em etanol. O sinal do transiente foi detectado 9 ns após o pulso de excitação do laser.	106
Figura IV.14: Espectro de absorção do transiente da TMPyPH ₂ em água. As leituras de absorção do transiente foram determinadas 13 ns após o pulso de excitação do laser.	108
Figura IV.15: Decaimento do transiente VBBO em água. O sinal do transiente foi detectado 9 ns após o pulso de excitação do laser.	109
Figura IV.16: Espectros de (-) absorção no estado fundamental, (♦) absorção do transiente e (●) absorção do transiente corrigido $\Delta A(t)$ para o Feoforbide-a em benzeno.	112

Figura IV.17: Espectros de (–) absorção no estado fundamental, (♦) absorção do transiente e (●) absorção do transiente corrigido ($\Delta A(t)$) para a TMPyPH ₂ em água.	113
Figura IV.18: Espectros de (–) absorção no estado fundamental, (♦) absorção do transiente e (●) absorção do transiente corrigido ($\Delta A(t)$) para a ZnPc em DMSO/DMF 50% (v/v).	113
Figura IV.19: Decaimento de fosforescência do ¹ O ₂ gerado pela ZnPc em etanol.	117
Figura IV.20: Curvas de crescimento para os microorganismos estudados em caldo-BHI.	121
Figura IV.21: Estudos controle da toxicidade da luz e da TMPyPH ₂ contra (A) <i>E. coli</i> e (B) <i>S. aureus</i>	132
Figura IV.22: Estudos controle da toxicidade da luz e da ZnPc incorporada em lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC (razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04) contra (A) <i>E. coli</i> e (B) <i>S. aureus</i>	135
Figura IV.23: Estudos controle da toxicidade da luz e do VBBO contra (A) <i>E. coli</i> e (B) <i>S. aureus</i>	136
Figura IV.24: Decréscimo do número de colônias viáveis de <i>S. aureus</i> como função da dose de radiação aplicada para a ativação da TMPyPH ₂ nas concentrações de (A) 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e (B) 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	140
Figura IV.25: Decréscimo do número de colônias viáveis de <i>E. coli</i> como função da dose de radiação aplicada para a ativação da TMPyPH ₂ nas concentrações de (A) 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e (B) 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	141

Figura IV.26: Decréscimo do número de colônias viáveis de *S. aureus* como função da dose de radiação aplicada para a ativação da TMPyPH₂ nas concentrações de (A) 0,5 μmol.L⁻¹ e (B) 5,0 μmol.L⁻¹.144

Figura IV.27: Decréscimo do número de colônias viáveis de *E. coli* como função da dose de radiação aplicada para a ativação da TMPyPH₂ nas concentrações de (A) 0,5 μmol.L⁻¹ e (B) 5,0 μmol.L⁻¹.145

Figura IV.28: Ação fotodinâmica da ZnPc sobre (A) *S. aureus* e (B) *E. coli* como função da dose de radiação aplicada após incubação da suspensão bacteriana com uma alíquota de solução estoque do fármaco em DMSO/DMF 50% (v/v).150

Figura IV.29: Decréscimo do número de colônias viáveis de (A) *S. aureus* e (B) *E. coli* como função da dose de radiação aplicada para a ativação da ZnPc. A ftalocianina de zinco foi liberada a partir de lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04. A concentração do fármaco encapsulado foi de aproximadamente 3,0 μmol.L⁻¹.151

Figura IV.30: Espectros de absorção da ZnPc incorporada em lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04 mostrando o fotobranqueamento do fármaco na região das bandas Q. A dose fotodinâmica foi (J.cm⁻²): (—) 0; (—) 27; (—) 53; (—) 80; (—) 106; (—) 159; (—) 212; (—) 265.153

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1: Resistência a antibióticos por diferentes bactérias patogênicas	16
Tabela I.2: Dano foto-induzido em bactérias	30
Tabela I.3: Nomenclatura e tamanho aproximado de vários lipossomas	
Tabela I.4: Características representativas de diversos lasers pulsados	41
Tabela IV.1: Tamanho das vesículas lipossomais catiônicas	80
Tabela IV.2. Posição dos máximos de absorção da ZnPc em meio orgânico e lipossomas	86
Tabela IV.3. Posição dos máximos espectrais da ZnPc em meio orgânico e lipossomas	88
Tabela IV.4: Valores da constante de dimerização e dos coeficientes de absortividade molar do monômero e do dímero para o VBBO	96
Tabela IV.5: Valores da constante de dimerização e dos coeficientes de absortividade molar do monômero e do dímero para TMPyPH ₂ e ZnPc	97
Tabela IV.6: Rendimentos quânticos de fluorescência da ZnPc em diferentes meios	101
Tabela IV.7: Tempo de vida do transiente da ZnPc em meio orgânico e lipossomas	107

Tabela IV.8: Coeficiente de Absortividade Molar do estado excitado triplete para os fármacos fotossensíveis	114
Tabela IV.9: Rendimento quântico de formação do estado triplete excitado para os fármacos fotossensíveis	115
Tabela IV.10: Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete para os fármacos ZnPc e TMPyPH ₂ nos diferentes ambientes estudados.	118
Tabela IV.11: Concentração da TMPyPH ₂ incorporada por 10 ⁸ células de <i>E. coli</i> e/ou <i>S. aureus</i>	125
Tabela IV.12: Concentração do VBBO incorporado por 10 ⁸ células de <i>E. coli</i> e/ou <i>S. aureus</i>	127
Tabela IV.13: Concentração do ZnPc incorporado por 10 ⁸ células de <i>E. coli</i> e/ou <i>S. aureus</i> . A ZnPc foi liberada de lipossomas catiônicos constituídos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04	129

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

TMPyPH₂: 5,10,15,20-meso-tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirina

VBBO: Victoria Blue BO

ZnPc: Ftalocianina de Zinco

H_p: Hematoporfirina

H_pD: Derivado de Hematoporfirina

TFD: Terapia Fotodinâmica

F: Fármaco Fotossensível

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

¹O₂: Oxigênio Singlete

•OH: Radical Hidroxila

O₂^{•-}: Ânion Radical Superóxido

HO₂[•]: Radical Hidroperoxila

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

A: Absorbância

A_F: Absorção no Estado Fundamental

A_T: Absorção Triplete

ε: Coeficiente de Absortividade Molar

ε_T: Coeficiente de Absortividade Molar do Estado Triplete

ε_M: Coeficiente de Absortividade Molar do Monômero

ε_D: Coeficiente de Absortividade Molar do Dímero

α: Fração de Espécies Excitadas no Estado Triplete

K_D = Constante de Dimerização

[M]: concentração do Monômero

[D]: concentração do Dímero

Φ_F: Rendimento Quântico de Fluorescência

Φ_T : Rendimento Quântico de Produção do Estado Triplete

τ_T : Tempo de Vida do Transiente

I: Intensidade de Fosforescência do Oxigênio Singlete

Φ_Δ : Rendimento Quântico de Produção de Oxigênio Singlete

τ_Δ : Tempo de Vida do Oxigênio Singlete

SUV: (*Small Unilamellar Vesicles*) Vesículas Unilamelares Pequenas

LUV: (*Large Unilamellar Vesicles*) Vesículas Unilamelares Grande

MLV: Vesículas Multilamelares

ULV: Vesículas Unilamelares

PEG: Polietilenoglicol

DPPC: L- α -Dipalmitoilfosfatidilcolina

PC: Fosfatidilcolina de Ovo

DDAB: Brometo de Dimetildioctadecilamônio

LPC: Lisofosfatidilcolina

BHI: Brain Heart Infusion

UFC: Unidade Formadora de Colônia

N: Número de Moléculas de Fármaco Fotossensível por Mililitro de Solução

N_A : Constante de Avogadro ($6,02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

N_C : Número de Molécula do Fármaco Fotossensível por Célula Bacteriana

D_{TFD} : Dose Fotodinâmica

DMSO: Dimetil-sulfóxido

DMF: Dimetil-formamida

S_1 : Primeiro Estado Excitado Singlete

S_n : Estado Excitado Singlete mais energético

T_1 : Primeiro Estado Excitado Triplete

T_n : Estado Excitado Triplete mais energético

RESUMO

Microorganismos podem desenvolver resistência, rapidamente, ao ataque de drogas antimicrobiais em suas respostas evolucionárias. Isto faz muitos deles tolerantes a altas doses de drogas que são esperadas inibir suas fases de crescimento. Conseqüentemente, observou-se o crescimento do número de microorganismos resistentes na última década, fazendo antibióticos potentes e baratos tornarem-se completamente obsoletos rapidamente, levando ao aumento no número de mortes em hospitais e centros públicos de assistência à saúde. Considerando tal aumento na resistência a antibióticos por algumas bactérias comuns, este campo requer estratégias alternativas que sejam rápidas e efetivas para superar a resistência antimicrobial. Neste sentido, a terapia fotodinâmica (TFD) tem surgido como um método representativo e de valor para a erradicação de bactérias. A TFD é baseada no uso de um fármaco fotossensível que, uma vez ativado por luz em um meio oxigenado, induz a produção de espécies reativas de oxigênio tais como o radical peroxila, o ânion radical superóxido e o radical hidroxila (Tipo I) ou oxigênio singlete (Tipo II), que são danosas e definitivamente induzem a morte da célula. A vantagem da terapia fotodinâmica como protocolo para a erradicação de bactéria reside no fato de ser improvável que bactérias possam desenvolver resistência à ação fotodinâmica.

Neste trabalho, procurou-se determinar a potencialidade do uso da 5,10,15,20-meso-tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirina (TMPyPH₂), a ftalocianina de zinco (ZnPc) e o triarilmetano Victoria Blue BO (VBBO) como fármaco fotossensível para erradicação de bactéria. Os estudos foram realizados

empregando-se os microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, as bactérias mais comumente encontradas em pacientes hospitalizados com infecções sérias. Os fármacos têm sua ação fotodinâmica mediada por diferentes mecanismos de fotossensibilização. A TMPyPH₂, um fármaco bem conhecido da primeira geração, tem seu processo fotoquímico mediado pela produção de oxigênio singlete. A ZnPc é um fármaco da segunda geração, cuja ação procede através de ambos os mecanismos Tipo I e Tipo II. A foto-toxicidade do VBBO envolve a produção de radicais livres de oxigênio, mas não envolve oxigênio singlete. Alguns trabalhos anteriores mostraram que bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, são mais eficientemente erradicadas por fármacos fotossensíveis catiônicos, como a TMPyPH₂ e o VBBO. Desde que a ZnPc é um fármaco neutro, foram utilizados lipossomas catiônicos como sistema de liberação nos procedimentos envolvendo este corante, de modo a intensificar a sua eficiência fotodinâmica.

Foram determinadas a concentração dos fármacos retida por uma suspensão de células dos microorganismos ($10^7 - 10^8$ UFC.mL⁻¹) e a toxicidade destes compostos na ausência de luz (toxicidade intrínseca do fármaco), bem como a redução no número de unidades formadoras de colônias (UFC) após exposição à luz visível isolada de uma fonte de luz portátil. Os fármacos foram eficientemente retidos por *E. coli* e *S. aureus* sem qualquer toxicidade para estes microorganismos. Paralelamente, não foi observado qualquer efeito danoso da luz de excitação para as bactérias (toxicidade da luz). A TMPyPH₂ foi altamente eficiente na erradicação fotodinâmica de ambas *S. aureus* e *E. coli*. Por outro lado, o VBBO teve sua eficácia limitada por suas propriedades fotofísicas bem como pela tendência desta classe de corantes em formar agregados. A ZnPc também exibiu uma menor eficiência do que a porfirina, devido ao seu fotobranqueamento no processo fotodinâmico.

Também foi observado que o tempo de incubação não influenciou a eficiência fotodinâmica da TMPyPH₂ e do VBBO. Isto indica que a membrana da bactéria é um importante alvo para a foto-toxicidade destes fármacos e é possível assumir que sua ação é mediada por peroxidação de lipídios induzida pelas espécies reativas de oxigênio (EROs).

ABSTRACT

Microorganisms can rapidly develop resistance to the attachment of antimicrobial drugs in their evolutionary response. This makes most of them tolerant to high doses of drugs that were expected to inhibit their growing phases. Consequently, an increasing number of resistant microorganisms have developed in the last decade, making potent and inexpensive antibiotics become completely obsolete very fast, leading to increasing number of deaths in hospitals and public health care assistance. Considering such increase in the resistance to antibiotic by some common bacteria, this field request rapid and effective new strategies to overcome antimicrobial resistance. In this sense photodynamic therapy (PDT) has emerged as a representative and valuable alternative method to eradicate bacteria. PDT protocol is based on the use of a photosensitizing agent which, once activated by light in an oxygenated medium, induces the production of reactive oxygen species such as peroxy, superoxide anion radical and hydroxyl radicals (Type I reaction), or singlet oxygen (Type II reaction), which are deleterious and definitively induce cell death. The advantage of photodynamic therapy as a protocol for killing bacteria lies in the fact that it is highly unlikely that bacteria could develop resistance to photodynamic action.

In this work, an effort has been made to establish the potential significance of 5,10,15,20-meso-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin (TMPyPH₂), the zinc phthalocyanine (ZnPc) and the triarylmethane dye Victoria Blue BO (VBBO) as photosensitizer for bacterial killing. The studies have been performed by employing the microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, the most

common bacteria isolate in patients hospitalized with serious infections. The dyes have their photodynamic action mediated by different photosensitizing mechanisms. TMPyPH₂, a well-known photosensitizer of the first generation, has its photochemical processes mediated by the production of singlet oxygen. ZnPc is a second generation photosensitizer whose action proceeds via both Type I and Type II mechanisms. The photo-toxicity of VBBO involves the production of oxygen radicals, but do no singlet oxygen is involved. Previous works have shown that Gram-negative bacteria, like *E. coli*, are more efficiently photo-killed by cationic photosensitizers such as TMPyPH₂ and VBBO. Since ZnPc is a neutral dye, we have employed cationic liposome as a drug delivery system in the procedures involving this dye in order to increase its photodynamic efficiency.

We have evaluated the uptake of both dyes by a microorganism cell suspension ($10^7 - 10^8$ CFU.mL⁻¹), and we have determined their toxicity in the dark (intrinsic dye toxicity) and the reduction in the colony forming unity (CFU) of these microorganisms after exposure to visible light isolated from a Hand Held light source. The drugs were efficiently retained by *E. coli* and *S. aureus* cell without any toxicity to these microorganisms. Besides that, no deleterious effect of the excitation light to the bacteria (toxicity by light) was observed. TMPyPH₂ was highly efficient in the photo-eradication of both *S. aureus* and *E. coli*. On the other hand, VBBO had his efficacy limited by its photophysical properties as well as by the high tendency of this class of dye to aggregate. ZnPc also exhibited lower efficiency than the porphyrin due to its photobleaching in the photodynamic procedure.

We have also observed that the incubation time has no influence on the photodynamic efficiency of TMPyPH₂ and VBBO. This is an indication that the bacterial membrane is an important target for the photo-toxicity of these dyes and it is possible to assume that their action is mediated by a lipid peroxidation process induced by reactive oxygen species (ROS).

I. INTRODUÇÃO

I.1. Resistência a Antibióticos

No final dos anos 20 (RANG;DALE;RITTER, 1995; TORTORA;FUNKE;CASE, 2000), Alexander Fleming, um médico e bacteriologista escocês, estava descartando algumas culturas de staphylococcus em placa que haviam sido contaminadas por fungo quando observou um curioso padrão de crescimento nestas placas contaminadas: havia uma área clara ao redor do fungo, onde a cultura de bactéria havia parado de crescer. Este fungo, mais tarde identificado como *Penicillium notatum*, possuía um inibidor ativo para o crescimento de bactéria denominado penicilina. Foi a descoberta do primeiro antibiótico. Desde então, muitos outros antibióticos foram isolados ou desenvolvidos.

O uso de antibióticos para tratamento clínico de infecções teve início na década de 30 e, acoplado à imunização proporcionada pelas vacinas, disseminou a crença de que doenças infecciosas poderiam ser controladas e dominadas (TAYLOR;STAPLETON;LUZIO, 2002). Embora os antibióticos tenham salvado incontáveis vidas e transformado a prática da medicina, o otimismo inicial demonstrou-se prematuro. O surgimento crescente de bactérias resistentes tem feito muitos antibióticos potentes totalmente obsoletos (STOJILJKOVIC;KUMAR;SRINIVASAN, 1999) e, assim, as doenças infecciosas permanecem como causa importante de mortalidade em todo o mundo (BYARUGABA, 2004; TAYLOR;STAPLETON;LUZIO, 2002).

A resistência a antibióticos resulta de uma resposta adaptativa dos micróbios que os tornam tolerantes a uma certa quantidade do fármaco que normalmente inibiria o seu crescimento (BYARUGABA, 2004; TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Uma observação preocupante é o desenvolvimento de resistência por parte de bactérias altamente patogênicas a múltiplos fármacos (BYARUGABA, 2004), como apresentado na Tabela I.1.

Tabela I.1: Resistência a antibióticos por diferentes bactérias patogênicas *

Doença	Bactéria	Resistência
Pneumonia	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
Diarréia	<i>Shigella dysenteriae</i>	Multi-resistente
Febre Tifóide	<i>Salmonella typhi</i>	Multi-resistente
Gonorréia	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Penicilina e Tetraciclina
Tuberculose	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rifampicina
Outras	<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina e Vancomicina
	<i>Enterococcus spp.</i>	Vancomicina
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Multi-resistente
	<i>Pseudomonas</i>	Multi-resistente

*Fonte: (BYARUGABA, 2004)

Uma variedade de práticas humanas tem contribuído para o desenvolvimento de resistência aos antibióticos, como (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000): (1) a prescrição extensiva e errônea de antibióticos por médicos; (2) o uso de antibióticos em pacientes com resfriados e gripes; (3) o uso de antibióticos em pacientes imunodeprimidos por longos períodos de tempo para prevenir infecções; (4) a dificuldade dos pacientes em seguir o tratamento prescrito; (5) os longos tratamentos utilizando doses baixas do fármaco; (6) o uso de antibiótico na nutrição animal e (7) o transporte de bactérias resistentes a novas áreas em função de viagens.

Há diferentes mecanismos pelos quais as bactérias podem desenvolver resistência a antibióticos (MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY,

2002). Um destes mecanismos é a alteração no sítio alvo da droga ou na enzima ativadora do fármaco, induzidas pela mutação ao acaso associada à rápida replicação da célula bacteriana. Embora este seja um dos principais mecanismos de desenvolvimento de resistência pelas bactérias (MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY, 2002), estes microorganismos têm também desenvolvido outros métodos bastante eficazes de resistência. Um exemplo é a transferência de genes entre bactérias de culturas resistentes para outras bactérias normais (MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY, 2002; TORTORA;FUNKE;CASE, 2000).

O mecanismo de resistência mais atuante em organismos patogênicos parece envolver o bombeamento do antibiótico para fora da célula bacteriana, reduzindo, assim, o acúmulo intracelular do fármaco (MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY, 2002). Existem diversos sistemas transportadores responsáveis pela eliminação dos antibióticos da célula. Alguns transportadores são ativados pelo influxo de íons H^+ na bactéria; outros transportadores acoplam a liberação do fármaco à hidrólise de ATP. Em ambos os casos, é de crucial importância a manutenção de uma barreira efetiva ao redor do microorganismo para reduzir o influxo de antibiótico no interior da célula.

A inativação do fármaco através da alteração da estrutura química do antibiótico por enzimas é um outro mecanismo de resistência adquirida (MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY, 2002; TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Um exemplo importante deste mecanismo é a hidrólise do anel β -lactama de penicilinas pela ação da β -lactamase, que resulta em uma forma aberta do antibiótico que não pode se ligar ao seu sítio alvo. A enzima β -lactamase encontrada em *Staphylococcus aureus*, por exemplo, em condições ótimas pode inativar 10^5 moléculas de benzilpenicilina por minuto (MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY, 2002). Outras enzimas modificam os antibióticos pela adição de grupos químicos, resultando em um decréscimo da afinidade do fármaco pelo sítio alvo. É o caso, por exemplo, da cloranfenicol-acetiltransferase, que transforma o cloranfenicol em sua forma mono ou di-acetato (MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY, 2002).

A própria estrutura da célula bacteriana pode fornecer uma poderosa barreira de proteção à entrada do fármaco na célula, reduzindo, assim, a permeabilidade da célula bacteriana aos antibióticos. A membrana externa de bactérias Gram-negativas, por exemplo, restringe efetivamente a permeação de antibióticos por uma série de caminhos, entre eles o diâmetro e a carga dos poros existentes na membrana. Por sua vez, a parede celular de bactérias Gram-positivas, embora mais grossa do que àquela das bactérias Gram-negativas, não forma uma barreira significativa aos antibióticos.

Outro importante mecanismo de resistência é a superprodução das enzimas para as quais o antibiótico é dirigido (MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY, 2002; TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Por exemplo, um micróbio pode tornar-se resistente ao trimetoprima pelo estímulo à síntese da enzima a qual a droga é dirigida.

Bactérias que adquiriram resistência a um antibiótico provavelmente se tornarão resistentes a outros fármacos da mesma classe através do fenômeno de resistência cruzada (NEELY;HOLDER, 1999). Desde que existe um mecanismo comum para a resistência dentro de uma classe de antibióticos, bactérias resistentes a um dado fármaco podem desenvolver resistência a um outro fármaco desta mesma classe ao qual nunca foram expostas (NEELY;HOLDER, 1999).

O desenvolvimento de resistência por um microorganismo é um processo progressivo (NEELY;HOLDER, 1999) e envolve desde os baixos níveis, através dos níveis intermediários até altos níveis de resistência. Uma exceção é a resistência mediada pela transferência genética direta entre bactérias, que induz imediatamente uma intensa resistência à ação do fármaco. Frequentemente, a resistência aparece como o aumento gradual na concentração mínima inibitória do fármaco, bem como no aumento da porcentagem de micróbios resistentes à este antibiótico como uma função do tempo de tratamento.

A resistência de bactéria, além de um sério problema médico, consiste também em um problema de ordem econômica. Doenças infecciosas causadas por microorganismos resistentes são de difícil tratamento e requerem fármacos que são de acesso restritos e mais caros (BYARUGABA, 2004). Doenças causadas por

microorganismos patogênicos resistentes a múltiplos antibióticos requerem intensivo tratamento clínico e permanência prolongada dos pacientes em hospitais, cujo custo é estimado entre 4 e 30 bilhões de dólares por ano somente nos Estados Unidos (STOJILJKOVIC;KUMAR;SRINIVASAN, 1999).

Enquanto as nações desenvolvidas possuem um desenvolvido sistema de assistência à saúde de seus habitantes e recursos financeiros que podem ser empregados em tentativas de solucionar este problema, os países em desenvolvimento possuem recursos escassos e muito pouco tem sido feito (BYARUGABA, 2004). Estes países possuem ainda, como agravante, problemas com o saneamento básico, moradia inadequada e má-nutrição da população que, associados ao inadequado acesso aos cuidados médicos, contribuem para a acentuada mortalidade induzida por doenças infecciosas (BYARUGABA, 2004).

Uma alternativa para amenizar a incidência de resistência a antibióticos entre os principais grupos de bactérias patogênicas seria o tratamento de doenças infecciosas utilizando diferentes fármacos com modos de ação fundamentalmente diferentes (TAYLOR;STAPLETON;LUZIO, 2002). Entretanto, embora um extenso número de antibióticos esteja disponível no mercado para o tratamento de infecções bacterianas, a maioria destes fármacos são estruturalmente relacionados e são direcionados a poucos alvos bioquímicos no interior da célula (TAYLOR;STAPLETON;LUZIO, 2002), o que facilita o desenvolvimento de um mecanismo de resistência. Em adição, as grandes indústrias farmacêuticas têm diminuído os esforços para a descoberta de novos antibióticos por diversas razões (SHLAES, 2003). Primeiramente, o mercado farmacêutico, embora grande, está saturado por um extenso número de produtos e algumas indústrias estão perto de perder a exclusividade na fabricação e comercialização de seus fármacos. Esta competição pela comercialização de fármacos induz a redução dos seus preços no mercado. Então, a introdução de novos produtos deve ser incentivada pelos baixos custos do produto.

Novos antibióticos são de difícil descoberta (SHLAES, 2003). Além disso, a comercialização destas novas drogas é dependente de fatores como a aprovação por múltiplas indicações para atingir as expectativas de mercado e, normalmente,

requer, em cada indicação, um controle de comparação com outros antibióticos conhecidos, sendo necessária a administração em um grande número de pacientes. Portanto, o desenvolvimento de novos antibióticos é um processo caro (BYARUGABA, 2004; SHLAES, 2003) (estimado entre 300 e 800 milhões de dólares), que dificulta sua comercialização. Por esta razão, as principais companhias farmacêuticas têm dado prioridade ao melhoramento de antibióticos já bem estabelecidos (TAYLOR;STAPLETON;LUZIO, 2002).

Dada a gravidade do problema de resistência de bactérias à ação de antibióticos, novos métodos para a erradicação de bactérias patogênicas e o controle de doenças infecciosas devem ser buscados. Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica apresenta-se como uma alternativa eficiente.

I.2. Terapia Fotodinâmica: Princípios e Histórico

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que faz uso da combinação de um fármaco fotossensível, luz visível e oxigênio molecular. O fármaco, a luz ou o oxigênio não são tóxicos isoladamente (RODRIGUEZ;AWRUCH;DICELIO, 2002), mas, quando combinados, produzem espécies reativas de oxigênio (EROS) que induzem dano oxidativo da célula e, conseqüentemente, a sua morte (ALLEN;SHARMAN;VAN LIER, 2001; NIEDRE;PATTERSON;WILSON, 2002; NYMAN;HYNNINEN, 2004; RAMIAH et al., 2002; RODRIGUEZ;AWRUCH;DICELIO, 2002; STERNBERG;DOLPHIN, 1998; VAN HENEGOUWEN, 1997). Embora o oxigênio singlete seja apontado como o principal agente citotóxico do procedimento fotodinâmico, reações envolvendo radicais livres como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila, altamente danosos para os sistemas biológicos, podem participar ativamente do dano fotodinâmico (NYMAN;HYNNINEN, 2004; SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000; STERNBERG;DOLPHIN, 1998).

O princípio básico das pesquisas voltadas para a terapia fotodinâmica consiste em encontrar um fármaco fotossensível que: (a) não seja rapidamente decomposto pela luz, impedindo, assim, que esta seja destruída antes de efetuar o

dano fotodinâmico; (b) seja eficientemente incorporado pelas células alvo e (c) seja eficiente na produção das espécies reativas que mediam a atividade fotodinâmica sob ação de baixos níveis de luz visível e, conseqüentemente, no dano foto-induzido às células alvo.

Historicamente, o uso de luz e corantes para tratar doenças data do Egito antigo onde, há aproximadamente 4000 anos, tratava-se vitiligo com uma combinação de plantas oralmente ingeridas e exposição à luz do sol. O sucesso do tratamento era resultado de uma reação fotodinâmica mediada pelos psoralenos presentes nas plantas (STERNBERG;DOLPHIN, 1998). Entretanto, o estudo sistemático das reações de fotossensibilização induzidas por fármacos foi iniciado apenas no final do século XIX quando Oscar Raab, um estudante de medicina alemão, investigou o efeito dos corantes eosina e acridina sobre o paramécio e percebeu que, em presença de luz, este microorganismo era rapidamente erradicado (DOLMANS;UKUMURA;JAIN, 2003; MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004; STERNBERG;DOLPHIN, 1998). Em 1903, Tappeiner e Jesionek empregaram uma solução de eosina e luz branca para tratar câncer de pele e observaram uma redução no tamanho do tumor. Estes corantes foram nomeados “fármaco fotossensíveis” e o fenômeno observado como “ação fotodinâmica” (DOLMANS;UKUMURA;JAIN, 2003).

Meyer-Betz, em 1912, estudou o efeito fotodinâmico de porfirinas em humanos, injetando em si mesmo 200 mg de hematoporfirina (Hp) (DOLMANS;UKUMURA;JAIN, 2003; NYMAN;HYNNINEN, 2004); STERNBERG;DOLPHIN, 1998). Subseqüente exposição de pequenas regiões da pele de seu braço a luz visível resultou em uma forte reação de queima solar, indicando que a Hp possui um efeito fototóxico. Anos mais tarde, em 1950, Schuwartz descobriu que o efeito colateral observado por Meyer-Betz não era devido à hematoporfirina, que é rapidamente liberada do organismo, e sim a uma mistura de derivados diméricos e oligoméricos da hematoporfirina facilmente formada durante a purificação deste composto (STERNBERG;DOLPHIN, 1998).

A tendência de porfirinas se acumularem em tumores foi descoberta em 1924, quando Policard observou que tecidos tumorais apresentavam-se mais

fluorescentes que os tecidos normais (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004). Em 1942, Auler e Banzer mostraram o acúmulo preferencial do derivado de hematoporfirina (HpD) em tecidos tumorais e a destruição destes sob a ação da luz (NYMAN;HYNNINEN, 2004). Entretanto, o desenvolvimento da terapia fotodinâmica como uma ferramenta poderosa de diagnóstico e tratamento teve início apenas em 1960, com os estudos de Lipson e colegas.

Lipson (DOLMANS;UKUMURA;JAIN, 2003) relatou a propriedade de um derivado de hematoporfirina IX modificado quimicamente através de uma reação de polimerização parcial na preparação, que foi nomeada de derivado de hematoporfirina (HpD). Este derivado possui a propriedade de se localizar seletivamente nos tumores, tornando-se, assim, o primeiro corante a ser utilizado na Terapia Fotodinâmica. No período de 1960-1967, Lipson e seus colegas foram os primeiros a utilizarem a combinação do derivado de hematoporfirina e luz para tratar um câncer de mama.

Desde o trabalho desenvolvido por Lipsen, muitos outros compostos vêm sendo investigados como fármaco fotossensível para a terapia fotodinâmica (DOLMANS;UKUMURA;JAIN, 2003; NYMAN;HYNNINEN, 2004; PANDEY, 2000; STEWART;BAAS;STAR, 1998). A terapia fotodinâmica vem sendo utilizada no tratamento de diversos tipos de tumores, tais como (DOLMANS;UKUMURA;JAIN, 2003): mama, pulmão, esôfago, estômago, pâncreas, cérebro, cabeça e pescoço, coloretal, intraperitônio ginecológicos, pele, mesotelioma, intra-oculares e colangiocarcinoma.

Embora um grande número de pesquisas tem sido destinado à avaliação e implementação da terapia fotodinâmica para o tratamento de tumores, a eficácia desta modalidade terapêutica no tratamento de outras doenças como (STERNBERG;DOLPHIN, 1998) a psoríase, a artrite, o glaucoma, o sarcoma de Karposi, bem como na erradicação de bactérias (MERCHAT et al., 1996a; MERCHAT et al., 1996b; MINNOCK et al., 1996; ROVALDI et al., 2000; SOL et al., 2004; WAINWRIGHT, 1998), fungos (CALZAVARA-PINTON et al., 2004; CARRÉ et al., 1999; WAINWRIGHT, 1998), vírus (incluindo HIV) (SMETANA et al., 1998;

WAINWRIGHT, 1998; WAINWRIGHT, 2002; WAINWRIGHT, 2003) e na exterminação de pragas agrícolas (AMOR;BERTOLOTTO;JORI, 2000; AMOR;JORI, 2000) tem sido relatada. A utilização da TFD como metodologia para erradicação foto-induzida de bactérias foi tema deste trabalho e é mais apropriadamente introduzida no tópico seguinte.

No Brasil, pesquisas envolvendo a TFD vêm sendo conduzidas e supervisionadas pelo Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco desde 1995. Entre as linhas de pesquisa, destacam-se a investigação de sistemas de liberação para fármacos (NUNES, 2003; Nunes; Sguilla; Tedesco, 2004), síntese de novos fármacos (ROTTA;LUNARDI;TEDESCO, 2003; TEDESCO;ROTTA;LUNARDI, 2003) e determinação da eficiência destes em estudos conduzidos *in vitro* (LUNARDI;ROTTA;TEDESCO, 2003). Também, estudos clínicos para o tratamento de câncer nas cordas vocais, estômago, garganta e pulmão tiveram início em 1999 com a implementação da TFD no hospital Amaral de Carvalho, Jaú – SP, pelo Dr. Guilherme Cestari Filho. Em 2000, foi iniciado o tratamento de doenças de pele utilizando a TFD no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, com a participação de um grupo de pesquisadores composto por químicos, físicos, farmacêuticos e médicos (TURCHIELLO et al., 2003).

No que diz respeito à erradicação de microorganismos, o Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco tem coordenado, desde o início de 2003, um trabalho inovador para o tratamento dentário. Cerca de 20 dentistas do estado de São Paulo e do Paraná vêm utilizando os princípios da terapia fotodinâmica para a remoção da placa bacteriana e tratamento de cárie. O princípio do método é o mesmo utilizado para o clareamento dental, tratamento de aftas e cauterização pós-implantes. Entre as vantagens, este tratamento é indolor (portanto não necessita de anestésias), não requer motores e não possui efeitos colaterais. Este procedimento encontra-se também em estágio avançado de pesquisa para o tratamento em outras áreas da odontologia, como a endodontia e periodontia.

I.2.1. Terapia Fotodinâmica na Erradicação de Bactérias

A importância da terapia fotodinâmica na eficiente erradicação de bactérias vem de encontro às necessidades de novas alternativas para o tratamento de doenças causadas por microorganismos resistentes a múltiplos fármacos (WAINWRIGHT, 1998). A vantagem do desenvolvimento da terapia fotodinâmica para a eliminação de bactérias é que, uma vez que a morte das células é mediada pela produção de oxigênio singlete e radicais livres (EROs), é improvável que tais bactérias resistentes possam ser selecionadas pela ação fotodinâmica (LACEY;PHILLIPS, 2001). Além disso, infecções localizadas não precisam ser tratadas com medicação sistêmica se uma alternativa eficiente estiver disponível (WAINWRIGHT, 1998). Desta forma, os agentes sistêmicos podem ser reservados para tratamento de infecções mais agudas e ameaçadoras. Tal situação é vantajosa desde que (i) a terapia proposta evita a seleção de microorganismos resistentes aos agentes sistêmicos e (ii) os sistemas de saúde com baixos recursos financeiros, como os dos países em desenvolvimento, podem se beneficiar de uma redução de gastos com fármacos de elevado custo.

A terapia fotodinâmica vem sendo utilizada como importante ferramenta para a esterilização de camas cirúrgicas (SZPAKOVSKY et al., 1997) e no tratamento de infecções ginecológicas (WAINWRIGHT et al., 1997), da cavidade oral, cáries e doenças da gengiva (ROVALDI et al., 2000; WILSON, 1993; WILSON et al., 1995). Um fator importante na morte foto-induzida de bactérias, como no tratamento de tumores, é a capacidade de excitar o fármaco fotossensível no sítio alvo específico da infecção, com mínima fototoxicidade aos tecidos vizinhos (WAINWRIGHT, 1998).

No primeiro estudo sistemático sobre os efeitos da TFD em microrganismos, Shawar e Cooper (SHAWAR;COOPER, 1990) relataram a importância da concentração do corante, sua absorção e sua relação com a fotossensibilização de *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecalis*, empregando um derivado de hematoporfirina como fármaco fotossensível e irradiando as células com luz monocromática no comprimento de onda de 630 nm. Os estudos cinéticos

conduzidos por esses autores mostraram que a quantidade de fármaco ligada às células aumenta com o aumento da concentração do fármaco na mistura de incubação, até a saturação dos sítios de ligação (não identificados).

Diversos trabalhos na área têm estabelecido que bactérias Gram-positivas são sensíveis à ação fotodinâmica de uma ampla variedade de porfirinas e ftalocianinas. Por outro lado, bactérias Gram-negativas possuem uma considerável resistência ao processo de fotossensibilização. A principal diferença entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é que a parede celular de bactérias Gram-negativas tem uma membrana externa à camada de peptídeooglicano (Figura I.1).

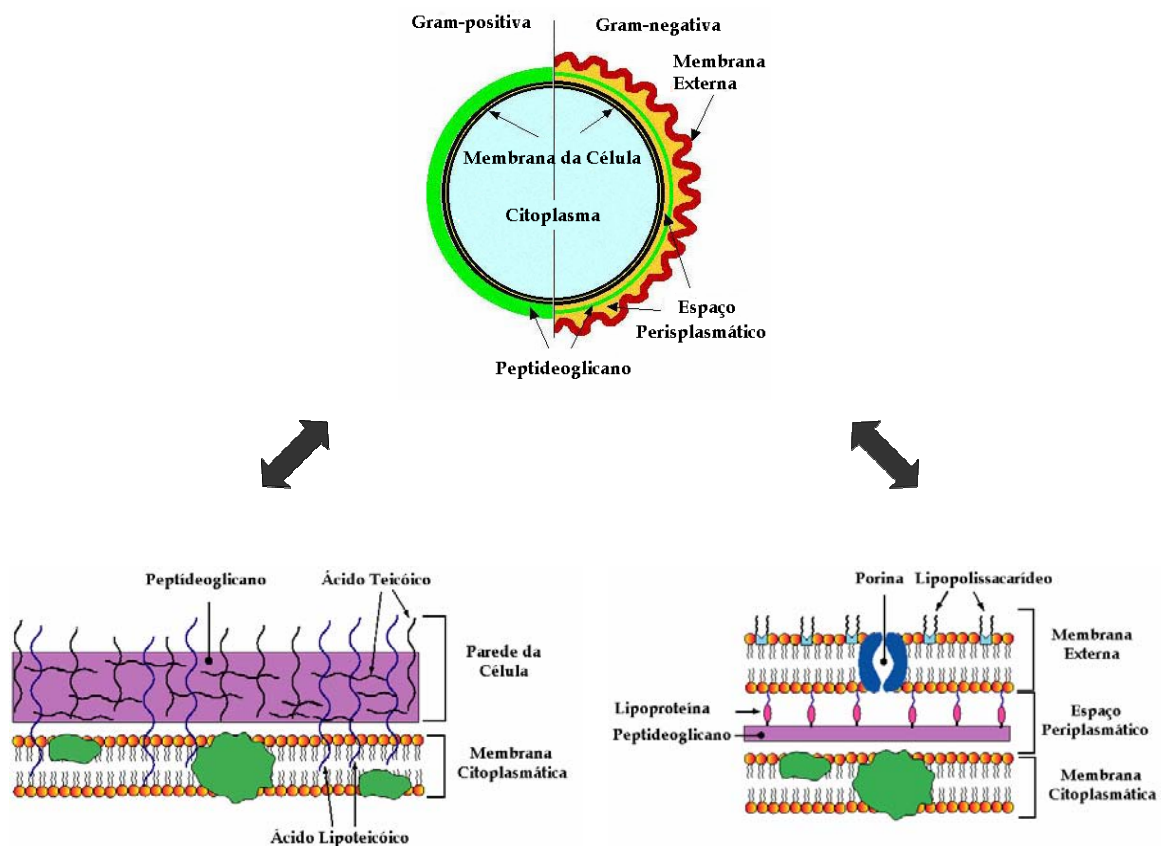


Figura I.1: Estrutura esquemática da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A membrana externa provê uma forte barreira de permeabilidade dificultando a incorporação do fármaco (POLO et al., 2000; REDDI et al., 2002). Por exemplo, antibióticos que são efetivos contra bactérias Gram-positivas são ineficientes contra bactérias Gram-negativas (LACEY;PHILLIPS, 2001). Em adição,

bactérias Gram-negativas contêm uma superfície externa carregada negativamente (devido às cargas negativas dos lipopolissacarídeos) que ajudam a prevenir a adsorção e/ou captação de corantes aniônicos (KOMERIK;WILSON;POOLE, 2000; LACEY;PHILLIPS, 2001).

Para um fármaco fotossensível erradicar uma bactéria, a membrana citoplasmática da célula deve ser danificada (LACEY;PHILLIPS, 2001). Então, fármacos que se localizam no interior das células são geralmente mais eficientes. Para os microorganismos Gram-negativos, os fármacos neutros ou negativamente carregados não são eficientemente incorporados pela bactéria. O processo inicial para a erradicação fotodinâmica destes microorganismos consiste, então, no dano à membrana externa da célula, que permite que o fármaco se incorpore em sítios celulares internos onde a ação fotodinâmica é mais eficiente (por exemplo, a membrana citoplasmática) (LACEY;PHILLIPS, 2001).

A baixa permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativas aos fármacos fotossensíveis pode ser aumentada pelo tratamento prévio com agentes químicos ou biológicos tais como CaCl_2 ou Tris-EDTA, que induzem a liberação de mais de 50% dos lipopolissacarídeos da membrana externa (LACEY;PHILLIPS, 2001; (EDDI et al., 2002). Neste caso, uma importante limitação precisa ser considerada. A administração de agentes químicos, juntamente com o fármaco, pode ser impraticável para os propósitos clínicos devido à dificuldade de obtenção de uma distribuição simultânea destes compostos num tecido ou célula (POLO et al., 2000). Então, novas estratégias são necessárias para a erradicação de microorganismos Gram-negativos.

A maioria dos fármacos usados na terapia fotodinâmica que são ineficientes contra estas bactérias são neutros ou negativamente carregados (MERCHAT et al., 1996a; MERCHAT et al., 1996b; MINNOCK et al., 1996). Entretanto, novas perspectivas advêm da observação de que bactérias Gram-negativas podem ser eficientemente erradicadas por fármacos catiônicos mesmo na ausência de aditivos (ASHKENAZI;NITZAN;GÁL, 2003; PHOENIX et al., 2003; POLO et al., 2000; REDDI et al., 2002; SOL et al., 2004; WAINWRIGHT, 1998). A carga positiva do fármaco fotossensível favorece a forte interação eletrostática com os sítios

negativamente carregados da superfície da célula bacteriana, aumentando a eficiência do processo fotodinâmico (POLO et al., 2000; REDDI et al., 2002).

Neste trabalho, foi proposto um estudo comparativo da eficiência dos fármacos fotossensíveis 5,10,15,20-tetakis(4-N-metilpiridil)porfirina (TMPyPH₂), ftalocianina de zinco (ZnPc) e Victória Blue BO (VBBO) na erradicação de ambos microorganismos Gram-negativo (*E. coli*) e Gram-positivo (*S. aureus*). A TMPyPH₂ e o VBBO são fármacos catiônicos. A ZnPc, por ser neutra, foi incorporada previamente aos ensaios fotodinâmicos em lipossomas catiônicos. A estrutura molecular dos fármacos utilizados bem como suas características fotoquímicas são apresentadas no Tópico I.5.

A seguir, são descritos os mecanismos de produção das espécies reativas que mediam a ação fotodinâmica destes fármacos.

I.3. Os Mecanismos de Fotossensibilização

No diagrama de Jablonski (Figura I.2) estão representados os processos fotofísicos que um fármaco fotossensível pode sofrer após a absorção de radiação.

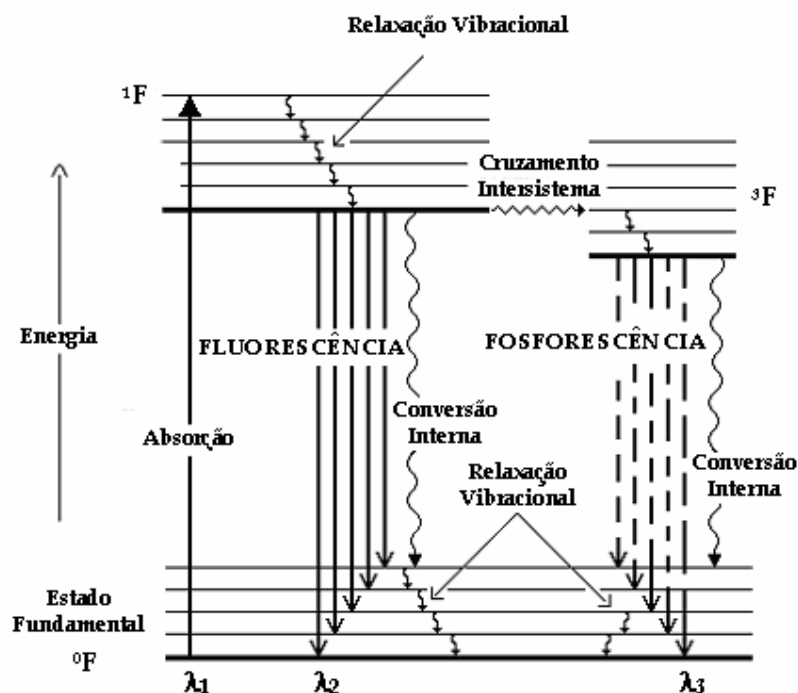
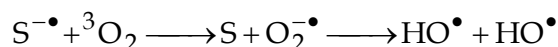
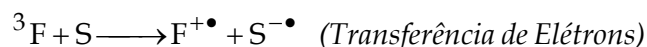
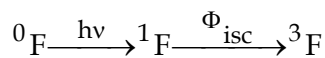


Figura I.2: Diagrama de Jablonski para um sistema fotoluminescente.

Após iluminação (ALLEN;SHARMAN;VAN LIER, 2001), o fármaco (0F) é excitado para o seu primeiro estado singlete superior (1F). Este estado excitado tem um tempo de vida curto (da ordem de nano-segundos) para interagir efetivamente com as moléculas vizinhas e normalmente perde energia rapidamente através de processos radiativos (emissão de fluorescência) e/ou não radiativos (conversão interna, cruzamento intersistemas). Em termos de TFD, o mais importante destes processos é o cruzamento intersistemas, caracterizado por uma inversão de spin eletrônico, que leva o fármaco fotossensível a popular o seu estado triplete excitado (3F). A partir do estado triplete, o fármaco pode retornar para o estado fundamental pelo processo de conversão interna ou pelo processo de emissão de fosforescência. De maior importância que os processos fotofísicos, entretanto, são os processos fotoquímicos que a droga pode sofrer neste estado excitado.

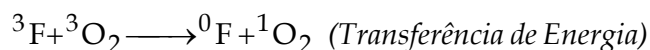
O estado triplete excitado tem um tempo de vida da ordem de μs (micro-segundos), que é longo o suficiente para permitir a interação do fármaco no estado excitado com moléculas vizinhas. Neste estado excitado, o fármaco pode então, por reações de abstração de hidrogênio ou transferência de elétrons com substratos orgânicos (S), produzir um substrato oxidado ($S\cdot$) e o fármaco fotossensível reduzido ($^3F^{+\bullet}$) que reage com o oxigênio molecular (3O_2) gerando espécies reativas de oxigênio como ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila ($OH\cdot$), capazes de induzir irreparáveis danos oxidativos às células (ALLEN;SHARMAN;VAN LIER, 2001; MACDONALD;DOUGHERTY, 2001). Este mecanismo de fotossensibilização é conhecido como Tipo I.

TIPO I: Reação redox com biomoléculas, produção de ânion radical superóxido, radical hidroxila, etc.



Alternativamente, o fármaco em seu estado excitado triplete pode transferir o seu excesso de energia para o oxigênio molecular com formação de oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$) (ALLEN;SHARMAN;VAN LIER, 2001; MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004). Esta reação de transferência de energia define o mecanismo de fotossensibilização Tipo II.

TIPO II: Reações de transferência de energia com produção de oxigênio singlete.



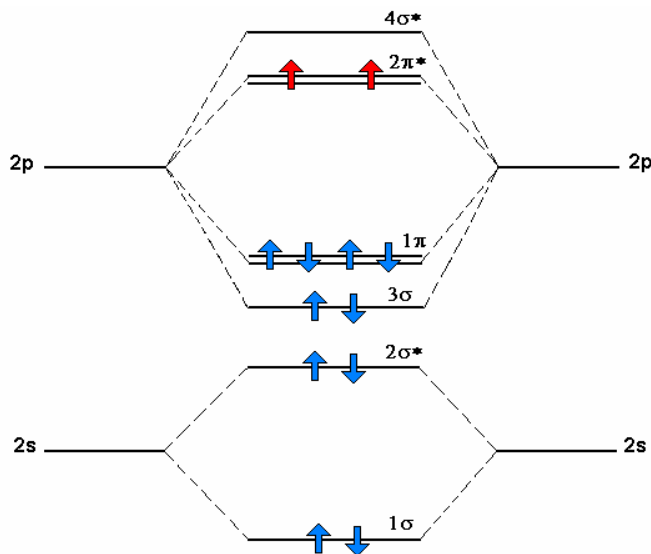
O oxigênio singlete reage rápida e indiscriminadamente com os mais variados materiais biológicos como lipídios insaturados, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, sendo apontado como o principal responsável pela **inativação** da célula (SPILLER et al., 1998).

I.3.1. Oxigênio Singlete na Terapia Fotodinâmica

A Figura I.3 apresenta o diagrama de orbital molecular para o oxigênio molecular. A configuração eletrônica para o estado fundamental desta molécula é caracterizada pela presença de dois elétrons desemparelhados no orbital $2\pi^*$,

sendo um deles localizado no orbital $2\pi_x^*$ e outro no $2\pi_y^*$, em acordo com a regra de Hund (RYTER;TYRRELL, 1998). Os orbitais $2\pi_x^*$ e $2\pi_y^*$ são degenerados, ou seja, são orbitais diferentes, mas com a mesma energia.

A existência de dois elétrons desemparelhados na molécula confere paramagnetismo ao oxigênio molecular. Na ausência de um campo magnético a configuração eletrônica será indistinguível. No entanto (FRIDOVIVCH, 1998; MACDONALD;DOUGHERTY, 2001), em presença de campo magnético, três diferentes momentos angulares de spin são revelados (ambos spins orientados para cima, ambos spins orientados para baixo ou um spin orientado para cima e o outro para baixo) e, portanto, o oxigênio pode ser descrito como triplete.



Fonte: (ATKINS, 1994)

Figura I.3: Diagrama de orbital molecular para o oxigênio molecular.

Esta estrutura eletrônica do oxigênio em seu estado fundamental confere uma barreira para a sua reação com a maioria das moléculas orgânicas (FRIDOVIVCH, 1998; RYTER;TYRRELL, 1998). Isto ocorre porque os elétrons com spins opostos de tais moléculas orgânicas devem juntar-se aos elétrons desemparelhados do O_2 . Assim, em um mesmo orbital deverão coexistir dois elétrons com o mesmo número quântico de spin, o que é energeticamente desfavorável, como descrito pelo princípio de exclusão de Pauli.



Esta restrição induzida por spin é removida com a formação do oxigênio singlete. O oxigênio singlete é uma forma altamente reativa do oxigênio que é produzida pela inversão de spin de um de seus elétrons mais externos (RYTER;TYRRELL, 1998). Como descrito no tópico anterior, o oxigênio singlete pode ser produzido por fotossensibilização, através da transferência de energia de um fármaco fotossensível no estado excitado triplete para o oxigênio molecular (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004).

O $^1\text{O}_2$ pode existir em duas formas distintas: $^1\Delta_g$, que é $22,6 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ mais energético que o $^3\text{O}_2$, e uma forma mais energética, Σ_g^+ , que é 37 Kcal.mol^{-1} mais energético que o oxigênio molecular (Figura I.4) (RYTER;TYRRELL, 1998; TURRO, 1978).

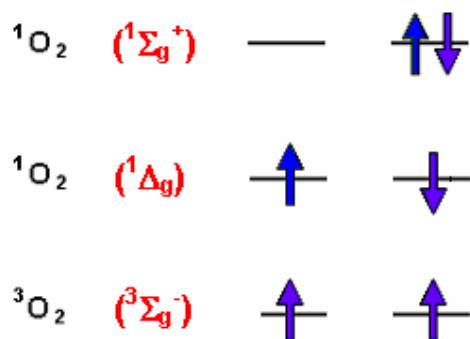
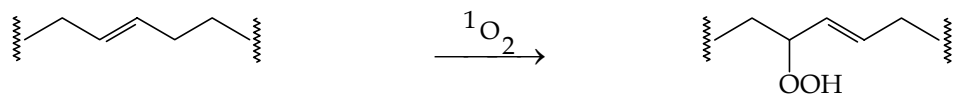


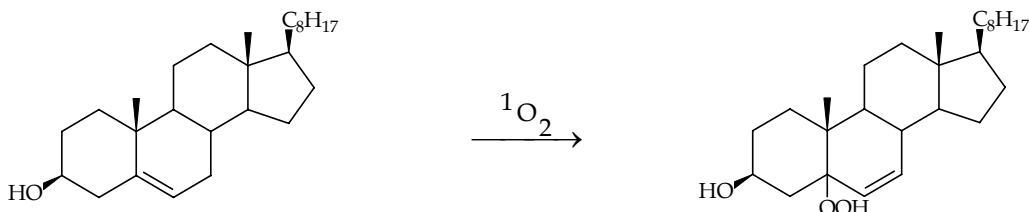
Figura I.4: Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares π^* do oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$) e no estado excitado singlete ($^1\Delta_g$, $^1\Sigma_g^+$).

A forma Σ_g^+ , todavia, decai para a forma menos energética ($^1\Delta_g$) imediatamente após a sua formação (tempo de vida de aproximadamente 20 picosegundos em metanol (SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000)) sendo, assim, irrelevante para sistemas biológicos. O $^1\Delta_g$, por sua vez, reage rapidamente com biomoléculas essenciais tais como lipídios insaturados, colesterol, aminoácidos bem como bases dos ácidos nucleicos (BONNET, 1995; NYMAN;HYNNINEN,

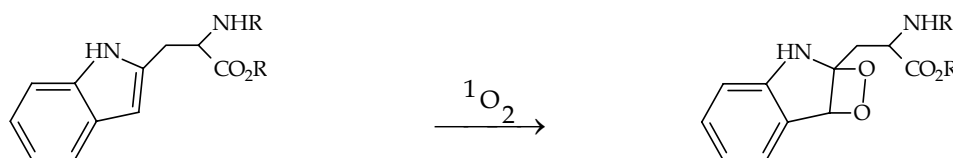
2004), sendo apontado como intermediário principal no dano celular foto-induzido (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; SPILLER et al., 1998). O Esquema I.1 apresenta os produtos da reação do oxigênio singlete com algumas destas biomoléculas essenciais.



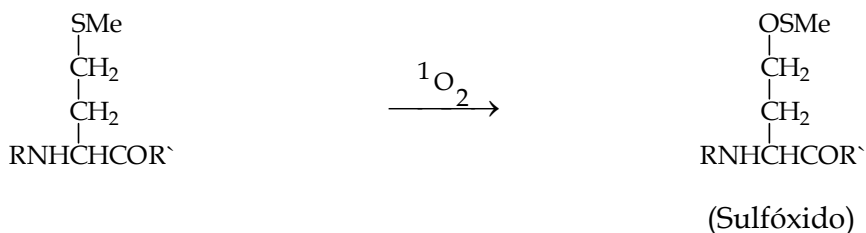
Lipídios Insaturados



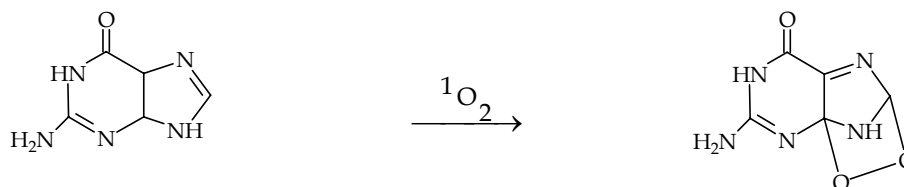
Colesterol



Triptofano



Metionina



Guanina

Esquema I.1: Reação do oxigênio singlete com algumas biomoléculas.

O oxigênio singlete é tão reativo que tem um tempo de vida na faixa de 10 – 100 μ s em solventes orgânicos (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001), o que indica que, uma vez produzido, esta espécie reage rapidamente na proximidade de seu sítio de formação (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004; SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000)

I.3.1.1. Determinação do Rendimento Quântico de Produção do Oxigênio Singlete

Uma vez que o oxigênio singlete (RYTER;TYRRELL, 1998) é considerado como o principal responsável pela morte celular no processo fotodinâmico (SPILLER et al., 1998), a eficiência na produção desta espécie reativa de oxigênio é uma propriedade almejada entre os fármacos fotossensíveis. Por sua vez, a eficiência da produção de oxigênio singlete por um composto é estimada pelo rendimento quântico de produção do oxigênio singlete (Φ_{Δ}).

Especialmente para a terapia fotodinâmica, é importante conhecer o rendimento quântico de produção do oxigênio singlete pelas drogas em sistemas similares aos sistemas biológicos. Assim, um grande número de investigações tem sido realizado em meio aquoso e microheterogêneos como micelas e lipossomas (SPILLER et al., 1998).

Diferentes métodos podem ser aplicados para a determinação do Φ_{Δ} . Estes podem ser separados em fotoquímico, fotofísico e, menos comumente, método fototérmico.

O método fotoquímico é baseado na reação entre o oxigênio singlete com um composto sensível a esta espécie ativada de oxigênio. Experimentalmente, prepara-se uma solução contendo o fármaco e o composto supressor numa concentração conhecida e oxigênio. Após irradiação, o fármaco no seu estado triplete transfere energia para o oxigênio molecular dissolvido no meio produzindo, assim, o oxigênio singlete que reage rapidamente com o composto supressor. Como resultado desta reação, ocorre a decomposição do composto supressor que pode ser acompanhada por espectroscopia de UV – visível,

monitorando-se a diminuição da intensidade de absorção deste composto. Analisando-se (SPILLER et al., 1998) a porcentagem de diminuição na absorbância do composto supressor após a reação com o oxigênio singlete pode-se, então, calcular o rendimento quântico de degradação deste composto. Em geral, o experimento é concluído após 15% de decomposição.

O rendimento quântico de produção de oxigênio singlete pode, então, ser determinado pela seguinte equação:

$$\frac{1}{\Phi_S} = \frac{1}{\Phi_\Delta} \left(1 + \frac{\beta}{[\text{Sup}]} \right) \quad (\text{Equação 1})$$

em que Φ_S é o rendimento quântico de decomposição do composto supressor, Φ_Δ é o rendimento quântico de produção do oxigênio singlete e β é dado pela equação

$$\beta = \frac{k_d}{k_r} \quad (\text{Equação 2});$$

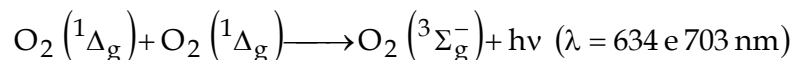
Aqui, k_d é a constante de velocidade para o decaimento espontâneo do $^1\text{O}_2$ para seu estado fundamental e k_r a constante para a reação química entre o oxigênio singlete e o composto supressor. Assim, construindo-se um gráfico de $\frac{1}{\Phi_S}$ por

$\frac{1}{[\text{Sup}]}$ obtém-se como coeficiente linear da reta obtida o inverso do rendimento quântico de produção do oxigênio singlete $\left(\frac{1}{\Phi_\Delta} \right)$.

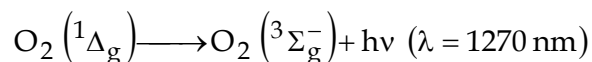
Um composto supressor eficiente deve reagir fácil e exclusivamente com o oxigênio singlete com uma estequiometria 1:1. Além disso, os produtos gerados não devem apresentar bandas de absorção na mesma região do composto supressor (o que interferiria na quantificação da decomposição deste composto) nem reagir rapidamente com oxigênio singlete (SPILLER et al., 1998). O supressor químico mais comum em solventes orgânicos é o 1,3-difenilisobenzofurano

(DPBF). Entretanto, outros furanos bem como derivados do antraceno, o nucleotídeo guanina e a bilirrubina têm sido aplicados com sucesso como supressores químicos do oxigênio singlete. Em meio aquoso, o composto mais usado é o p-nitroso-dimetilanilina (RNO).

Sendo o oxigênio singlete uma molécula no estado eletrônico excitado, ela pode decair emitindo luz. Existem dois tipos de emissões possíveis:



EMISSÃO BIMOLECULAR



EMISSÃO MONOMOLECULAR

A emissão bimolecular pode ser monitorada por meio de uma fotomultiplicadora sensível à região do vermelho, termoeletricamente resfriada, conectada a um sistema discriminador e amplificador. A emissão monomolecular pode ser detectada por um espectrofotômetro que tenha um fotodetector como um fotodiodo de Germânio. A intensidade de emissão é diretamente proporcional a concentração do ${}^1\text{O}_2$ e fornece uma medida da quantidade produzida.

O método fotofísico é baseado na detecção da emissão de fosforescência do oxigênio singlete em 1270 nm. A intensidade de fosforescência (I) do oxigênio singlete pode ser descrita pela equação:

$$I = \gamma \cdot K_R \cdot \tau_\Delta \cdot \Phi_\Delta \cdot (1 - 10^{-A}) I_{EX} \quad (\text{Equação 3})$$

onde K_R é a constante de velocidade das transições radiativas, I_{EX} é a energia de excitação, γ é um fator constante dado pelo equipamento, τ_Δ é o tempo de vida do oxigênio singlete, A é a densidade óptica no comprimento de onda de excitação e Φ_Δ é o rendimento quântico a ser calculado. A intensidade de fosforescência em um dado solvente depende apenas de γ , τ_Δ , Φ_Δ , A e I_{EX} . Assim, mantendo-se constante a densidade óptica e a energia de excitação, a relação entre a intensidade

de fosforescência do oxigênio singlete produzido por um composto de referência e por uma amostra pode ser descrita pela equação:

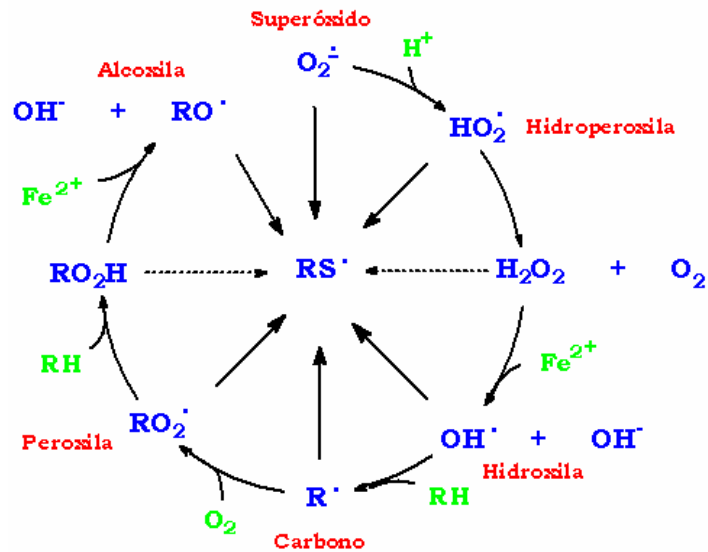
$$\Phi_{\Delta} = \frac{I_{\text{amostra}}}{I_{\text{referência}}} \cdot \Phi_{\Delta_referência} \cdot \frac{\tau_{\Delta_referência}}{\tau_{\Delta_amostra}} \quad (\text{Equação 4})$$

I.3.2. Radicais Livres de Oxigênio na Terapia Fotodinâmica

Além do oxigênio singlete, outras espécies reativas de oxigênio podem também ser produzida no processo de fotossensibilização (Mecanismo do Tipo I) (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNINEN, 2004; SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000). Estas espécies reativas incluem o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}), que podem facilmente oxidar uma grande variedade de biomoléculas (SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000). Os substratos mais eficientemente degradados por estas espécies reativas incluem aqueles facilmente oxidados (tais como aminas e fenóis) ou reduzidos (como as quinonas).

As reações do Tipo I são mais eficientes em baixas concentrações de oxigênio e altas concentrações de substratos (SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000; Spikes, 1989). A formação de complexos entre o fármaco fotossensível e o substrato previamente a ativação daquele com luz de comprimento de onda adequado deve aumentar a probabilidade de reações do Tipo I por causa da proximidade entre o fármaco e as moléculas do substrato .

Reações de radicais livres com moléculas estáveis têm uma especial característica que é a amplificação das conseqüências pela ativação de reações em cadeia. Isto ocorre porque a reação de um radical livre com tais moléculas sempre produz um outro radical livre (FRIDOVICH, 1998). A Figura I.5 esquematiza a formação de vários radicais livres que podem ser produzidos em sistemas biológicos a partir do anion radical superóxido.



Fonte: (HALLIWELL;GUTTERIDGE, 1989)

Figura I.5: Radicais livres produzidos por reações em cadeia nos sistemas biológicos.

Embora os sistemas vivos possuam sistemas voltados para a defesa contra a ação destas espécies reativas (como as enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidases, por exemplo, entre outros) (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL;GUTTERIDGE, 1989), a variedade de radicais livres que podem ser formados por reações em cadeia aponta para extensão dos danos que estas espécies reativas podem induzir aos sistemas biológicos.

I.3.3. Espécies Reativas de Oxigênio na Erradicação de Bactéria

A Tabela I.2 apresenta os principais caminhos foto-tóxicos que conduzem à erradicação das células bacterianas (WAINWRIGHT, 1998). Enquanto o tipo predominante de ação fotodinâmica é, freqüentemente, determinado pela classe do composto utilizado como fármaco fotodinâmico, o modo exato de ação é, também, governado pelo sítio de ação que, por sua vez, é dependente da localização do fármaco na célula alvo (WAINWRIGHT, 1998).

Uma possível reação pelo mecanismo Tipo I de fotossensibilização envolve a interação do fármaco fotossensível no estado excitado tripleto com a água do ambiente produzindo radical hidroxila, que pode reagir com biomoléculas ou

combinar-se entre si para formar peróxido de hidrogênio *in situ* com conseqüentes resultados citotóxicos (WAINWRIGHT, 1998).

Reações típicas do mecanismo de fotossensibilização do Tipo I incluem a abstração de hidrogênio alílico de moléculas insaturadas tais como fosfolipídios (WAINWRIGHT, 1998). A espécie radical formada pode, então, reagir com o oxigênio molecular para formar hidroperóxidos do lipídio. A peroxidação de lipídio danifica a integridade de membrana, causando perda de fluidez e aumentando a permeabilidade iônica. Outras moléculas da membrana celular que podem ser danificadas incluem aminolipídios e peptídeos. Então, inativação de enzimas e receptores de membrana é também possível (WAINWRIGHT, 1998).

Reações mediadas pelo oxigênio singlete são consideradas como o principal processo foto-oxidativo no dano à célula bacteriana (WAINWRIGHT, 1998). Como anteriormante descrito, o oxigênio singlete reage com moléculas envolvidas na manutenção da estrutura da membrana celular como fosfolipídios, peptídios e esteróis, bem como aminoácidos e ácidos nucléicos (WAINWRIGHT, 1998).

Tabela I.2

I.4. Os Microorganismos Utilizados: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Neste trabalho, os microorganismos escolhidos para os ensaios fotodinâmicos foram *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) e *Escherichia coli* (Gram-negativo).

S. aureus é um microorganismo altamente patogênico que, devido a intensa produção de toxinas, pode causar infecções em diferentes partes do corpo (LIVERMORE, 2000). Infecções na pele e tecidos moles, por exemplo, são comuns e abrangem desde erupções menores até impetigo. A bactéria é também um invasor comum de cortes cirúrgicos e outras feridas, sendo um importante causador de infecção hospitalar. Além disso, *S. aureus* é um microorganismo oportunista capaz de induzir meningite após neurocirurgias e pneumonia em pacientes com as vias aéreas debilitadas. A bactéria possui, ainda, a capacidade de crescer em certos alimentos que apresentam alta pressão osmótica (tais como presunto e outras carnes curtidas) ou em alimentos com pouca umidade que tendem a inibir o crescimento de outros microorganismos (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). A ingestão de enterotoxinas produzidas por estes microorganismos em alimentos contaminados, a causa mais comum da intoxicação alimentar, causa vômito, náusea e forte diarreia.

S. aureus possui capacidade de desenvolver rapidamente resistência a antibióticos, seja através de mutação celular, seja através do mecanismo de transferência de DNA (LIVERMORE, 2000). Um estudo para estimar a resistência a antibióticos por *S. aureus* isolado de infecções de pele de 229 pacientes foi realizado no Japão (NISHIJIMA;KUROKAWA, 2002). Os resultados indicaram uma acentuada resistência do microorganismo aos 22 diferentes antibióticos utilizados no tratamento, indicando a elevada incidência de resistência a múltiplos fármacos. Então, a alta patogenicidade do microorganismo associada à dificuldade no tratamento das doenças através de sua eficiente erradicação, resulta em um alto índice de mortalidade induzido por este microorganismo (LIVERMORE, 2000).

Escherichia coli é bactéria comum no trato intestinal humano (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Esta bactéria pode ser uma causa comum de infecções do trato urinário e certas linhagens produzem enterotoxinas que causam várias doenças de origem alimentar. Existem vários tipos patogênicos distintos de *E. coli*. A cepa enterotoxigênica não é invasiva, mas produz uma enterotoxina que induz diarreia. As cepas enteroinvasivas invadem a parede intestinal resultando em inflamação, febre e, algumas vezes, diarreia. Existem ainda as cepas enterohemorrágicas, que produzem toxinas responsáveis pela colite hemorrágica (uma inflamação do cólon com sangramento). Muitos pacientes infectados por este micróbio têm fezes combinadas com grandes quantidades de sangue, mas sem febre. Uma complicação perigosa é a síndrome hemoliticourêmica (sangue na urina, insuficiência renal), que ocorre quando os rins são afetados pela toxina. Cerca de 5 - 10 % das crianças pequenas infectadas progridem para este estágio e a taxa de mortalidade é alta. Algumas crianças podem requerer diálise renal ou mesmo transplantes.

Microorganismos Gram-negativos, como a *E. coli*, são tipicamente mais resistentes a antibióticos do que microorganismos Gram-positivos. Esta observação tem sido explicada pela presença de uma membrana externa na célula Gram-negativa que limita o acesso de antibióticos aos seus alvos na bactéria (POOLE, 2001). Em muitos casos, a resistência é intrínseca e ocorre independentemente de mutações ou da aquisição de determinantes exógenos de resistência. Embora a membrana externa dos microorganismos Gram-negativos seja por si só um fator determinante de resistência, a eficiência de um outro mecanismo, o bombeamento do antibiótico para fora da célula bacteriana, é dependente da presença desta membrana externa. Então, a combinação do efeito limitador à entrada do fármaco associado à função ativa de excreção da droga reduz o acúmulo do fármaco e, assim, protege a célula do efeito danoso destes agentes.

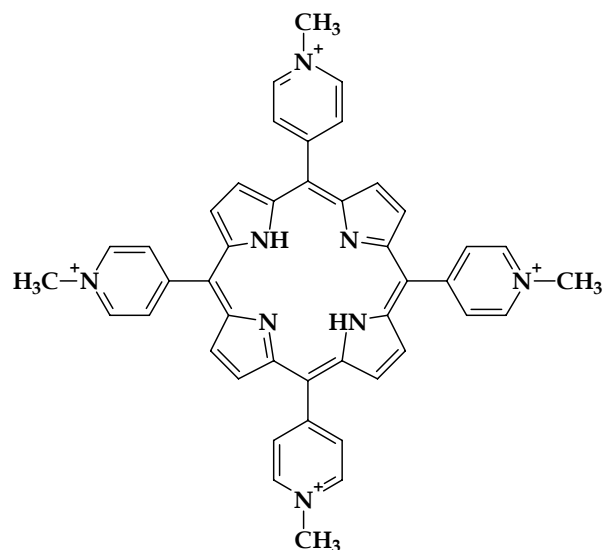
S. aureus e *E. coli* são as bactérias mais comumente encontradas em pacientes hospitalizados para o tratamento de infecções fortes (LIVERMORE, 2000; STOJILJKOVIC;KUMAR;SRINIVASAN, 1999), o que justifica a escolha

destas para a avaliação da eficiência da terapia fotodinâmica como método de erradicação de microorganismos.

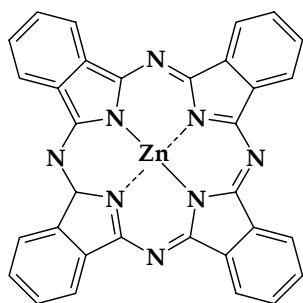
I.5. Os Fármacos Fotossensíveis Utilizados no Projeto

Muitos são fármacos fotossensíveis utilizados em ensaios fotodinâmicos para a erradicação de bactérias, incluindo porfirinas (ASHKENAZI;NITZAN;GÁL, 2003; MERCHAT et al., 1996a; MERCHAT et al., 1996b; REDDI et al., 2002; SOL et al., 1998; SOL et al., 2004; SZOCS et al., 1999), ftalocianinas (LACEY;PHILLIPS, 2001; MINNOCK et al., 1996), clorinas (ROVALDI et al., 2000), derivados de porfírenos (LAURO et al., 2002; POLO et al., 2000) e derivados de fenotiazina como o azul de metileno e o azul de toluidina (KOMERIK;WILSON, 2002; KOMERIK;WILSON;POOLE, 2000; PHOENIX et al., 2003; ROMANOVA et al., 2003; SOUKOS et al., 1996; ZEINA et al., 2001).

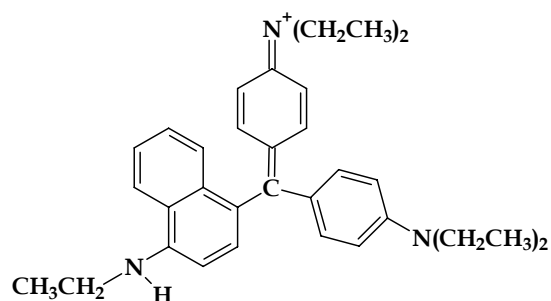
Neste trabalho, os fármacos fotossensíveis empregados nos estudos para a erradicação fotodinâmica de *E. coli* e *S. aureus* foram a 5,10,15,20-meso-tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirina (TMPyPH₂), a ftalocianina de zinco (ZnPc) e o triarilmetano Victoria Blue BO (VBBO). A estrutura molecular destes compostos é apresentada no Esquema I.2.



(A)



(B)



(C)

Esquema I.2: Estrutura molecular dos fármacos fotossensíveis utilizados neste trabalho: (A) TMPyPH₂, (B) VBBO e (C) ZnPc.

A TMPyPH₂ (Esquema I.2 (A)) é uma porfirina tetracatiônica pertencente à primeira geração de fármaco fotossensíveis. A importância desta porfirina é atestada pelo grande número de ensaios fotodinâmicos que vem sendo utilizada, os quais visam determinar suas propriedades fotofísicas (KADISH;MAIYA;ARAULLO-MCADAMS, 1991), sua complexação com proteínas (BORISSEVITCH et al., 1996; BORISSEVITCH et al., 1997; BORISSEVITCH;TOMINAGA;SCHMITT, 1998) e DNA (DE PAOLI et al., 2002; GANDINI et al., 1998; GANDINI et al., 1999) e, mais recentemente, em estudos de erradicação fotodinâmica de bactérias (MERCHAT et al., 1996a; MERCHAT et al., 1996b; REDDI et al., 2002). Devido às suas cargas positivas, esta porfirina tem se

mostrado eficiente na erradicação de ambas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MERCHAT et al., 1996a; MERCHAT et al., 1996b; REDDI et al., 2002). De acordo com Reddi e colaboradores (REDDI et al., 2002), a eficiência fotodinâmica na erradicação de bactérias Gram-negativas é principalmente mediada pela deterioração induzida pela TMPyPH₂ das funções enzimáticas e de transporte de ambas as membranas externas e citoplasmática.

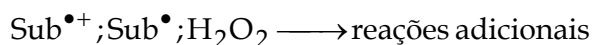
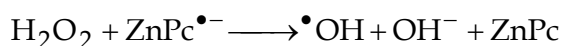
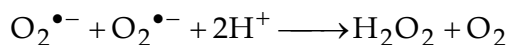
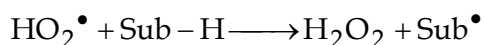
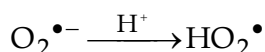
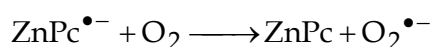
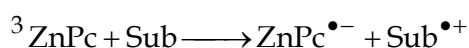
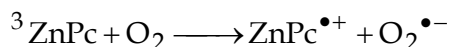
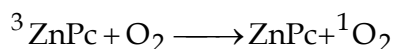
A eficiência demonstrada pela TMPyPH₂ nos estudos de foto-oxidação realizados *in vivo* e *in vitro* (JUARRANZ et al., 1995), é mediada pelo mecanismo de fotossensibilização do Tipo II, ou seja, pela produção de oxigênio singlete com altos rendimentos (KRUK et al., 1998a; MERCHAT et al., 1996b).

A ftalocianina de zinco (Esquema I.2 (B)) é pertencente à segunda geração de fármacos fotossensíveis. A segunda geração de fármacos sensíveis foi desenvolvida numa tentativa de superar algumas desvantagens observadas para os fármacos da primeira geração (hematoporfirina e seus derivados) no tratamento de tumores (BONNET, 1995; NYMAN;HYNNINEN, 2004), tais como: (i) baixa seletividade com respeito à incorporação e retenção por células tumorais; (ii) fotossensibilidade cutânea (edema, eritema e lesões cutâneas) por algumas semanas; (iii) estas drogas exibem fraca absorção de radiação na região do vermelho, região adequada para excitação dos fármacos devido à máxima penetração de luz desta faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético nos tecidos e (iv) estas drogas são misturas diméricas e oligoméricas complexas da hematoporfirina de difícil isolamento na sua forma monomérica. Neste contexto, as ftalocianinas mostram-se mais seletivas pelos tecidos tumorais, com baixa fototoxicidade aos tecidos saudáveis e eficiência na produção de oxigênio singlete (OWENS et al., 1998).

A ZnPc atualmente encontra-se em fase de teste clínico para tratamento de tumores na Europa (GARBO, 1996; HADJUR et al., 1997; JORI, 1996). A ação fotodinâmica deste é mediada por ambos os mecanismos de fotossensibilização (HADJUR et al., 1997; MAREE;KUZNETSOVA;NYOKONG, 2001; MAREE;NYOKONG, 2001), ou seja, através da produção de oxigênio singlete,

bem como outras espécies reativas de oxigênio como o ânion radical superóxido, o radical hidroperoxila, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila.

Produção de Espécies Reativas de Oxigênio pela ZnPc



O grande poder oxidativo das espécies reativas produzidas, bem como a capacidade de reações em cadeia iniciadas pelas espécies radicalares, pressupõem a eficiência fotodinâmica deste fármaco.

Embora a ZnPc se apresente como um potente fármaco para o tratamento de neoplasias, a sua atuação na erradicação fotodinâmica de bactérias não tem tido sucesso (LACEY;PHILLIPS, 2001). A razão para isso pode ser relacionada com a sua neutralidade, uma vez que os mais eficientes para a erradicação das bactérias são positivamente carregados (LACEY;PHILLIPS, 2001; MINNOCK et al., 1996). Por essa razão, nos ensaios para a erradicação de *Escherichia. coli* e *S. aureus*, a ZnPc

foi previamente incorporada em um sistema lipossomal catiônico, que foram utilizados como sistema de liberação para o fármaco.

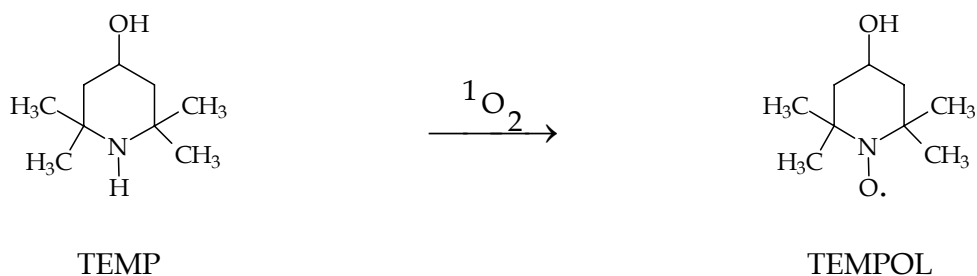
O Victoria Blue BO (Esquema I.2 (C)), outro fármaco fotossensível da segunda geração, pertence à família dos triarilmetanos. Os triarilmetanos são uma classe de corantes com uma ampla variedade de aplicações tecnológicas, tais como (LEWIS;INDIG, 2000) corantes têxteis, corantes para comida, drogas e cosméticos, marcador biológico, agentes anti-microbiais e anti-helmíntico e muitos deles estão sendo investigados para a terapia fotodinâmica de câncer (BAPTISTA;INDIG, 1998; LEWIS;INDIG, 2000; VIOLA et al., 1996; VIOLA et al., 2000).

Estudos voltados para o tratamento de neoplasias utilizando o VBBO requereram baixa concentração do fármaco, curto tempo de incubação e moderada dose de radiação para a erradicação das células malignas, indicando que este composto é fármaco promissor para a terapia fotodinâmica (VIOLA et al., 1996).

Outro estudo tem descrito a potencialidade da utilização do verde de malaquita, um outro fármaco pertencente à família dos triarilmetanos, como fármaco fotossensível para a erradicação de *Staphylococcus aureus* (GOLDING et al., 1998).

O mecanismo de fotossensibilização que media a ação fotodinâmica do VBBO foi investigado utilizando-se ressonância paramétrica eletrônica (EPR) (BREZOVÁ et al., 2004; VIOLA et al., 1996). Nos experimentos realizados pelo grupo de Julliard (VIOLA et al., 1996), foi detectada a produção de espécies reativas de oxigênio como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila após irradiação com luz visível de soluções aquosas e/ ou lipossomas de DPPC saturado com oxigênio. Por outro lado, nas mesmas condições, não foi possível detectar a produção de oxigênio singlete, indicando que ação fotodinâmica do VBBO é mediada pelo mecanismo de fotossensibilização do Tipo I. Então, os resultados obtidos por este grupo indicaram que a foto-toxicidade do VBBO se processa através de um modo diferente daquele observado para a maioria dos fármacos da segunda geração, ou seja, não envolve a produção de oxigênio singlete.

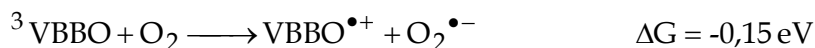
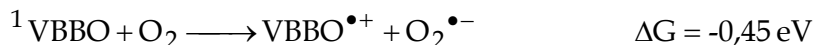
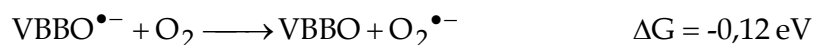
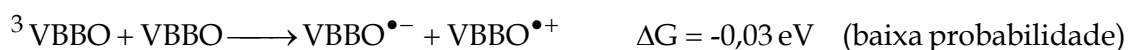
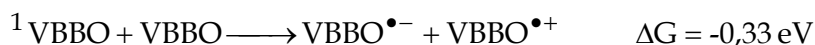
Em um estudo mais recente, também utilizando a técnica de EPR, entretanto, Brezová e colaboradores (BREZOVÁ et al., 2004) detectaram a formação de oxigênio singlete, além das espécies radicalares produzidas no mecanismo de fotossensibilização do Tipo I. Neste estudo, a formação do oxigênio singlete após irradiação das soluções dos triarilmetanos foi confirmada utilizando-se a reação seletiva do 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (TEMP) com o oxigênio singlete, que resulta na formação de um radical nitroxila estável (TEMPOL).



A evidência para a produção de oxigênio singlete, no entanto, foi observada somente para irradiação de soluções de triarilmetanos em dimetilsulfóxido (BREZOVÁ et al., 2004). Em outros solventes, como água deuterada ou etanol, a produção de oxigênio singlete não foi detectada, o que foi atribuído ao curto tempo de vida desta forma ativada do oxigênio nestes solventes (BREZOVÁ et al., 2004). Neste artigo, os próprios autores afirmam que suas observações não são consistentes com outros trabalhos encontrados na literatura.

Várias são as reações de transferência de elétrons que podem estar envolvidas na produção do ânion radical superóxido, como demonstrado pelas equações apresentadas a seguir (VIOLA et al., 1996). Também, pode-se observar que a produção desta espécie reativa de oxigênio pode ocorrer a partir de ambos os estados excitados singlete ou triplete do fármaco (VIOLA et al., 1996).

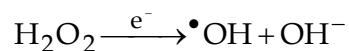
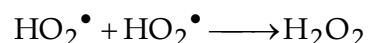
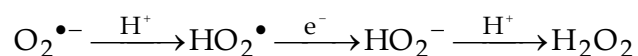
Produção do Ânion Radical Superóxido pelo VBBO



A colisão entre uma molécula de VBBO no estado fundamental com outra molécula do fármaco no estado excitado singlete (${}^1\text{VBBO}$) ou triplete (${}^3\text{VBBO}$) leva a uma reação de transferência de elétrons e a formação do ânion radical do fármaco ($\text{VBBO}^{\bullet-}$). Um outro caminho possível para a formação desta espécie reativa é a colisão de uma molécula do fármaco (no estado excitado singlete ou triplete) com uma molécula de um composto doador (D). A transferência do $\text{VBBO}^{\bullet-}$ para o oxigênio molecular induz a formação do ânion radical superóxido. Alternativamente, pode ocorrer uma transferência de elétron direta do ${}^1\text{VBBO}$ ou ${}^3\text{VBBO}$ para o oxigênio molecular, com a conseqüente produção do ânion radical superóxido. Desde que, numa dada temperatura e pressão constantes, a espontaneidade de uma reação aumenta com o decréscimo da energia livre de Gibbs (ΔG) (ATKINS, 1994), a formação do ânion radical superóxido parece ser favorecida para os processos fotoquímicos iniciados no estado excitado singlete do fármaco.

A produção do radical hidroxila, por sua vez, mostrou-se dependente da formação do ânion radical superóxido, como descrito pelas reações a seguir (VIOLA et al., 1996).

Produção do Radical Hidroxila após Excitação do VBBO



A formação destas espécies reativas de oxigênio, altamente nocivas aos sistemas biológicos (SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000), pressupõe a eficiência do VBBO na erradicação fotodinâmica de ambos os microorganismos utilizados neste trabalho.

I.6. Lipossomas como Sistemas de Liberação de Fármacos

Os lipossomas (BAKKER-WOUDENBERG, 2002; KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002; NEW, 1990; SAHOO;LABHASETWAR, 2003) são vesículas que possuem um compartimento aquoso inteiramente cercado por uma membrana lipídica (normalmente fosfolipídios), como esquematizado na Figura I.6.

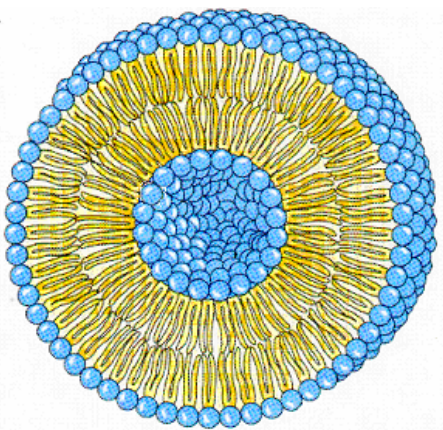


Figura I.6: Estrutura esquemática de um lipossoma mostrando a bicamada unilamelar fosfolipídica e o centro aquoso.

Os lipossomas podem ser classificados de acordo com o seu tamanho, bem como o número de bicamadas presentes na estrutura lipossomal (BAKKER-WOUDENBERG, 2002; KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002; VERMURI;RHODES, 1995) (Tabela I.3).

Tabela I.3: Nomenclatura e tamanho aproximado de vários lipossomas

Classificação	Nomenclatura	Tamanho aproximado (μm)
Tamanho	SUV	0,025 - 0,05
	LUV	0,1 - 1
Lamelaridade	MLV	0,05 - 10
	ULV	0,025 - 0,1

Quando os lipossomas são descritos baseado no número de bicamadas presentes eles são divididos em Vesículas Unilamelares (Unilamellar Vesicles; ULV) ou Vesículas Multilamelar (Multilamellar Vesicles; MLVs); Em acordo com o tamanho de suas partículas, os lipossomas podem classificados como vesículas unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles; LUV) ou vesículas unilamelares pequenas (Small Unilamellar Vesicles; SUV).

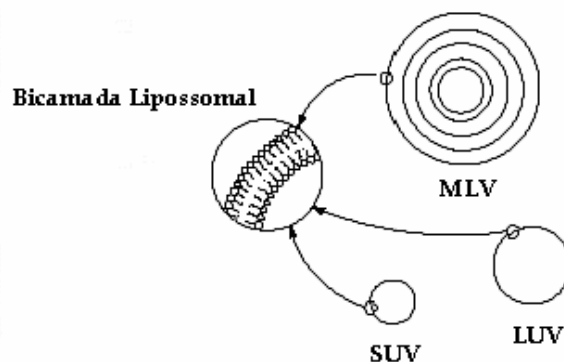


Figura I.7: Diferenças estruturais dos diferentes lipossomas.

Lipossomas estáveis podem ser preparados de uma grande variedade de lipídios naturais ou sintéticos, saturados ou insaturados, carregados ou neutros (HOEBEKE, 1995) e possuem a capacidade de incorporar substâncias tanto no seu compartimento aquoso quanto na membrana lipídica (CATUOGNO; JONES, 2003; HOEBEKE, 1995).

As propriedades dos lipossomas variam substancialmente com a composição do lipídio, tamanho, carga superficial e método de preparação (SAHOO; LABHASETWAR, 2003). A escolha dos componentes do lipossoma determina a rigidez (ou a fluidez) bem como a carga da bicamada. Por exemplo, fosfolipídios saturados com cadeias acilas longas como DPPC formam uma estrutura rígida e impermeável, enquanto as fosfatidilcolinas naturais insaturadas formam estruturas mais permeáveis e menos estáveis. O colesterol melhora a fluidez da bicamada lipídica, reduz a permeabilidade de moléculas aqua-solúveis através da membrana e melhora a estabilidade dos lipossomas na presença de fluídos biológicos como sangue (VERMURI; RHODES, 1995). A introdução de lipídios positivamente ou negativamente carregados fornece lipossomas com carga superficial.

Além das formulações lipossomais clássicas, existem ainda os lipossomas de longo tempo de circulação ou lipossomas "Stealth", que nada mais são do que os lipossomas clássicos recobertos de por polietilenoglicol (PEG) (WOODLE; LASIC, 1992). O recobrimento dos lipossomas com o polímero provê uma estabilização estérica do lipossoma (BAKKER-WOUDENBERG, 2002), ou

seja, fornece uma barreira estérica contra uma variedade de interações da vesícula lipossomal com componentes moleculares e celulares no ambiente biológico. Esta barreira inclui a inibição da penetração de proteínas do plasma que desestabilizam os lipossomas ou atuam como opsoninas (elementos do soro sanguíneo que se ligam a partículas estranhas e promovem a fagocitose) e resulta em um prolongamento no tempo de permanência dos lipossomas no sangue (BAKKER-WOUDENBERG, 2002).

Os lipossomas podem ser preparados por diferentes metodologias (NEW, 1990; VERMURI;RHODES, 1995; WATVE;BELLARE, 1995). O método escolhido determina a estrutura do lipossoma obtido (lipossomas multilamelares, lipossomas unilamelares pequenos ou lipossomas unilamelares grandes).

Nos últimos anos, os lipossomas têm sido amplamente usados como cápsulas para a liberação de agentes terapêuticos *in vivo* em campos relacionados à medicina {Konan, 2002 276 /id; Kaneda, 2000 277 /id; Feng, 2004 278 /id; Sahoo, 2005 279 /id; Robinson, 2001 280 /id; Oliveira, 2005 281 /id}. A escolha de um sistema de liberação adequado contribui para a eficiência farmacocinética e fotodinâmica do fármaco quando administrada *in vivo*. Como sistema de liberação, os lipossomas contribuem para melhorar a incorporação dos fármacos nas células alvo (KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002; SAHOO;LABHASETWAR, 2003).

Em estudos fotodinâmicos, formulações lipossomais são normalmente utilizadas como sistemas de liberação em ambos estudos experimentais e em testes clínicos (KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002). Neste trabalho, formulações lipossomais catiônicas foram utilizadas como sistema de liberação para a ftalocianina de zinco nos ensaios fotodinâmicos *in vitro* para a erradicação de *E. coli* e *S. aureus*.

Neste ponto, apresenta-se uma vantagem para a utilização de sistemas de liberação. Embora muitos fármacos fotossensíveis utilizados na TFD sejam hidrossolúveis, vários outros compostos que apresentam propriedades fotofísicas adequadas para os ensaios fotodinâmicos são completamente hidrofóbicos (como a ZnPc, por exemplo). A natureza hidrofóbica dos fármacos pode ser um fator determinante para o acúmulo preferencial destes compostos pelas células alvo,

uma vez que a passagem de compostos lipofílicos através da membrana lipídica da célula é facilitada e, portanto, o processo de incorporação é intensificado (KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002). No entanto, devido à baixa solubilidade destes compostos em meio aquoso, sua administração em sistemas biológicos deve ser acoplada à utilização de sistemas de liberação (KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002; TEDESCO, 2001) tais como partículas poliméricas biodegradáveis (nano-partículas e micro-partículas), conjugados hidrofílicos polímero-fármaco e lipossomas, entre outras.

Um sistema de liberação ideal (KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002) deve possuir algumas propriedades como: (i) incorporar o fármaco fotossensível sem perda ou alteração de sua atividade biológica; (ii) permitir a liberação e o acúmulo seletivo do fármaco no tecido alvo e com pouca ou nenhuma toxicidade pelas células saudáveis; (iii) em razão da alta probabilidade de administração de repetitivas dosagens do fármaco, o sistema de liberação deve ser biodegradável e ter pouca ou nenhuma toxicidade e (iv) prover um ambiente no qual fármaco possa ser transportado em sua forma monomérica. De fato, devido a sua estrutura química, muitos fármacos tendem a se agregar em meio aquoso como resultado da propensão do esqueleto hidrofóbico de evitar contato com as moléculas de água. Este estado é um fator determinante na eficácia fotodinâmica da droga *in vivo* pelo decréscimo de sua bio-disponibilidade e limitação de sua capacidade de absorver luz. Os lipossomas são vesículas biocompatíveis e biodegradáveis (CATUOGNO;JONES, 2003) e, como sistema de liberação, contribuem para a eficiência da liberação dos fármacos no sítio alvos, aumentando e mantendo os seus efeitos clínicos, reduzindo a toxicidade dos fármacos e protegendo-os das respostas metabólicas e imunológicas (HOEBEKE, 1995; SAHOO;LABHASETWAR, 2003).

Todos os ensaios envolvendo bactérias possuem como consenso geral que a erradicação de bactéria é dependente da adsorção dos lipossomas à célula do microorganismo (KIM;GIAS;JONES, 1999; ROBINSON et al., 2001), onde eles constituem um reservatório de fármacos que podem, subsequente, difundir para o interior da célula bacteriana (KIM;GIAS;JONES, 1999). A liberação de

fármacos é, então, dependente da eficiência de adsorção, que pode ser controlada pela escolha do lipídio e sua concentração na vesícula lipossomal. Lipossomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) contendo lipídios catiônicos como o estearilamina (SA), o brometo de dimetildioctadecilamônio (DDAB) ou o dimetilaminoetano carbamoil colesterol (DC-col) incorporados têm se mostrado efetivos na liberação de fármacos bactericidas contra *Staphylococcus epidermis* (KIM;GIAS;JONES, 1999; SANDERSON et al., 1996). Interações entre lipossomas catiônicos e a superfície da bactéria são possivelmente dominados por forças iônicas entre os lipossomas positivos e os poli-ol-fosfatos do ácido teicóico na superfície de bactérias Gram-positivas (potencial Zeta negativo indica carga negativa superficial para *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus salivarius*) (ROBINSON et al., 2001) ou os lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas (KOMERIK;WILSON;POOLE, 2000; LACEY;PHILLIPS, 2001).

Acredita-se que vesículas lipossomais contendo lipídios catiônicos favoreçam a liberação de fármacos neutros como a ftalocianina de zinco no interior da célula bacteriana, contribuindo para a eficácia do fármaco na erradicação fotodinâmica de ambos microorganismos Gram-negativo (*E. coli*) e Gram-positivo (*S. aureus*) utilizados neste estudo. As formulações utilizadas neste trabalho possuem em sua composição dipalmitoilfosfatidilcolina ou fosfatidilcolina de ovo como principal componente, além de colesterol, o lipídio catiônico brometo de dimetildioctadecilamônio (DDAB) e lisofosfatidilcolina.

I.7. Princípio Básico das Técnicas de Espectroscopia no Estado Estacionário e Resolvido no Tempo

I.7.1. Espectroscopia de Absorção no Estado Fundamental

A espectroscopia de absorção no estado fundamental é baseada no princípio de que transições eletrônicas em moléculas ocorrem nas regiões do ultravioleta-visível do espectro eletromagnético (190 - 800 nm). A absorção depende da estrutura eletrônica da molécula e resulta na promoção de átomos e

moléculas de um estado de menor energia (o estado fundamental) para um estado de maior energia (estado singlete excitado). A absorção de energia eletromagnética é quantizada, ou seja, uma dada transição eletrônica ocorre em um comprimento de onda específico correspondente à diferença de energia entre o estado fundamental e o estado singlete excitado (Diagrama de Jablonki, Figura I.2).

A determinação do espectro de absorção é feita utilizando-se um espectrofotômetro. Este equipamento possui duas fontes de luz, uma correspondente ao ultravioleta e outra com luz visível branca, que juntos cobrem toda esta faixa de comprimentos de onda. Para um dado fármaco, se toda a faixa de comprimento de onda é analisada, a fonte é mudada automaticamente no comprimento de onda apropriado. A radiação da fonte é dividida em dois feixes de luz de igual intensidade. Um feixe é passado através de uma solução do fármaco e o outro incide sobre a cubeta de referência contra o qual o primeiro é comparado após a medida de absorção do fármaco.

Os espectros de absorção UV-vis geralmente são registrados como gráficos de absorbância em função do comprimento de onda e são caracterizados pela posição e intensidade das bandas de absorção registradas, bem como pelos coeficientes de absorvidade molar (ϵ_{MAX}) correspondentes.

I.7.2. Espectroscopia de Fluorescência

A fluorescência é um processo radioativo no qual uma molécula excitada no primeiro estado excitado singlete perde a energia absorvida sob a forma de emissão de luz para retornar ao seu estado fundamental (Diagrama de Jablonski, Figura I.2). A espectroscopia de fluorescência é uma técnica de análise não destrutiva que pode ser usada para obter informações sobre estruturas e interação entre moléculas, sondagem de ambientes experimentados pelo fluoróforo e análise de traços de materiais e como marcadores biológicos.

As principais vantagens da técnica são as seguintes:

- (a) seletividade dos comprimentos de onda de excitação e emissão;
- (b) sensibilidade para baixas concentrações do material;

(c) variedade de métodos de amostragem (soluções, superfícies sólidas, suspensões, etc).

I.7.3. Fotólise por Pulso de Laser

Diversas técnicas resolvidas no tempo baseadas na monitoração da absorção ou emissão de intermediários de vida curta fotogerados, são empregadas no estudo de sistemas organizados. Entre estas técnicas encontram-se a fotólise convencional e a fotólise por pulso de laser (Bohne; Redmond; Scaiano, 1991; RIGOLI, 2000).

A técnica de fotólise por pulso de laser é excelente para a preparação e realização de estudos cinéticos de moléculas eletronicamente excitadas ; (JOHNSTON;SCHEPP, 1995). Nesta técnica, a geração de intermediários de um composto no estado excitado tripleto é proporcionada por um pulso de radiação laser. A primeira aplicação desta técnica pode ser encontrada em um artigo de Lindqvist, de 1966 (SCAIANO, 1995). Embora tenham ocorrido melhoras na técnica, as bases do método permanecem as mesmas (BROUARD, 1990).

O sistema de fotólise por pulso de laser (Figura I.8) pode ser dividido em quatro classes de componentes (SCAIANO, 1995): (1) uma fonte de excitação, usada para gerar os intermediários; (2) uma luz de monitoração ou análise; (3) o sistema de detecção e (4) o sistema de aquisição e processamento de dados.

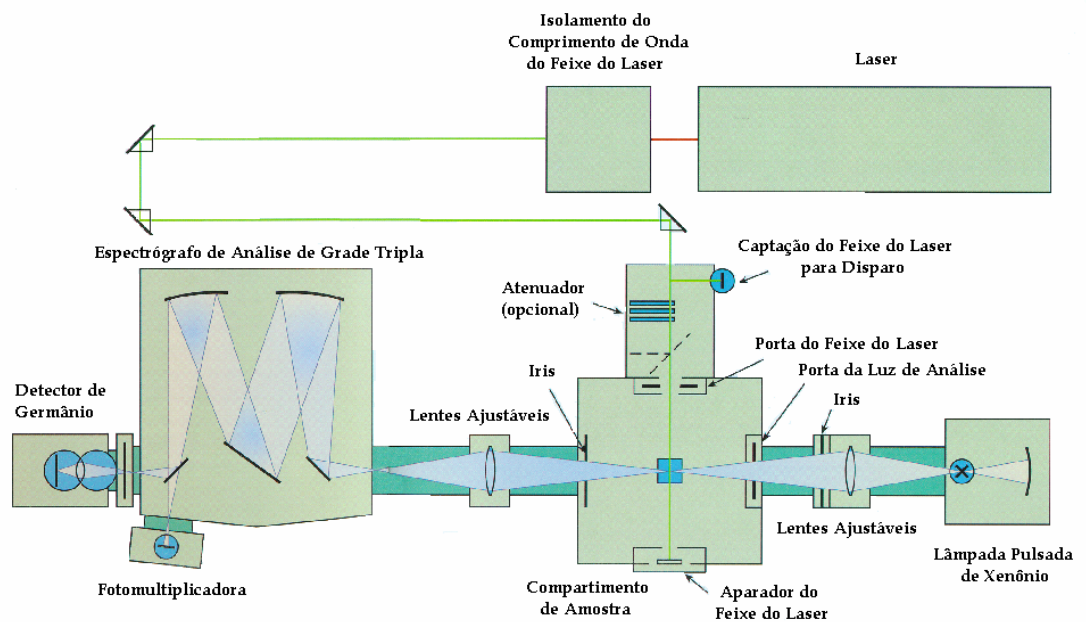


Figura I.8: Representação esquemática do sistema utilizado em experimentos de fotólise por pulso de laser.

A fonte de excitação é sempre um laser pulsado. Os parâmetros que devem ser observados na seleção de um laser incluem a energia por pulso, a velocidade de repetição, a duração do pulso e os comprimentos de onda disponíveis para a excitação do composto.

A Tabela I.4 apresenta características típicas de diversos lasers que podem ser empregados em experimentos de fotólise por pulso de laser.

Tabela I.4: Características representativas de diversos lasers pulsados

Laser	Tipo	Meio	λ, nm	Energia, mJ	Duração, ns
Nitrogênio	Gás	N ₂	337	1-10	1-10
Excímero	Gás	ArF	193	200	5-20
		KrCl	222	30	
		KrF	248	400	
		XeCl	308	100	
		XeF	351	100	
Rubi	Sólido	Rubi	694	1-50	10-20
			347		
Nd/YAG	Sólido	Nd/YAG	266	5-100	2-25
			355	10-200	
			532	100-1000	
Nd/vidro	Estado	Nd/vidro	263/6	200	15
	Sólido		350	400	15
			532	—	—
Corante (laser pumped)	Solução	Corante	variável	0,1-100	< 20
Corante (Flash pumped)	Solução	Corante	variável	<2000	>100

Normalmente, um laser necessita entre 4 e 40 mJ por pulso para realizar os experimentos convenientemente. Energias menores podem ser usadas, mas fazem o sistema de alinhamento muito crítico e podem limitar o tipo de sistema químico a ser analisado. Energias muito altas (alguns lasers atingem facilmente mais de 100 mJ/pulso) tornam o sistema muito propenso a processos multifóton.

A duração do pulso deve ser cuidadosamente selecionada de acordo com o potencial de aplicação do sistema. Duração de pulso entre 2 e 20 ns é comum e geralmente adequada. Em geral, o tempo de vida do transiente deve ser maior do que o comprimento do pulso para uma detecção sensível.

A resolução temporal da técnica de fotólise é determinada, principalmente, pela duração do pulso. Na fotólise convencional, onde as espécies transientes são geradas por lâmpadas de descarga, a resolução é de alguns microssegundos. Com a utilização de lasers pulsados, é possível obter resolução de nanossegundos até picossegundos. A frequência de repetição não é essencial em muitos casos, e geralmente 1 Hz é suficiente.

O limite de sensibilidade da técnica de fotólise por pulso de laser é determinado pela intensidade do pulso e pelas características do sistema óptico e de foto-deteção, bem como pelas propriedades inerentes de absorção do sistema químico selecionado e das espécies transientes geradas.

No sistema de fotólise por pulso de laser, a luz de monitoração está, freqüentemente, a 90° com respeito ao feixe do laser. A fonte mais comum é uma lâmpada de arco de xenônio, que fornece uma distribuição espectral adequada e pode ser facilmente operada em modo pulsado. Lâmpadas com potência entre 150 e 1000 W são adequadas. A importância da utilização de lâmpadas pulsadas reside no fato de que a intensidade da lâmpada aumenta por um fator de 20-100 durante poucos milissegundos. Isto é importante quando o sistema será usado em estudos de transientes com vida muito curta (<100 ns).

O sistema de deteção é constituído de um monocromador e de uma fotomultiplicadora.

Num experimento de fotólise por pulso de laser, o feixe de monitoração irradia o compartimento de amostra constantemente. Antes do laser irradiar o compartimento de amostra e gerar os transientes do composto em estudo, a luz de monitoração incide sobre a amostra e, após atravessá-la, atinge o monocromador sem sofrer perdas. Assim, o monocromador detecta a intensidade da radiação que incidiu sobre a amostra. Após o disparo do laser atingir o compartimento da amostra, uma grande população de moléculas do composto em estudo no estado fundamental é promovida para um estado excitado. Pelo processo de cruzamento intersistemas, uma certa proporção das moléculas excitadas passa a popular o estado tripleto. Quando a luz de monitoração atravessa o compartimento de amostra, os intermediários gerados absorvem uma parte da radiação incidente.

Desta maneira, a luz que chega ao monocromador tem uma intensidade diferente da luz que incidiu sobre o compartimento da amostra. O monocromador detecta a diferença na intensidade da luz de monitoração na ausência e na presença dos transientes. Quando a detecção termina, a fotomultiplicadora gera um sinal elétrico. Este sinal gerado é capturado por um osciloscópio e, então, transferido para o computador. Estes dados são, então, convertidos em mudanças na densidade óptica. O espectro registrado antes da fotólise por pulso de laser (sem espécie triplete) mostra apenas a absorção singlete-singlete.

Experimentalmente, existem duas maneiras distintas de operar o sistema de fotólise por pulso de laser. Na espectroscopia de pulso, registra-se o espectro de absorção do transiente numa determinada faixa de comprimentos de onda em um tempo fixo. No modo cinético, o decaimento da absorbância do estado excitado ou intermediário químico é monitorado em um único comprimento de onda em função do tempo após o pulso. A grande maioria dos espectros de absorção dos transientes tem sido obtida usando uma aproximação do tipo ponto por ponto. O decaimento como função do tempo é gravado em diversos comprimentos de onda diferentes. A absorção é medida em cada comprimento de onda. Constrói-se, então, um gráfico da absorbância como uma função do comprimento de onda (SCAIANO, 1995).

O decaimento da espécie formada pela excitação da amostra por pulso de laser, em geral, é um processo cinético de primeira ordem (salvo reações radicalares, nas quais o processo de recombinação determinam uma cinética de segunda ordem). Nas experiências cinéticas, geralmente é selecionado um comprimento de onda adequado para a observação das espécies de interesse. Como resposta do sistema laser computadorizado, obtém-se um gráfico da variação da densidade óptica em função do tempo, bem como a regressão que melhor simula o decaimento observado. A representação semilogarítmica fornece a ordem do decaimento, sua constante de velocidade, o tempo de vida do transiente e a densidade óptica no máximo de absorção (SCAIANO, 1995).

A espectroscopia de absorção UV-Vis é o método mais usado para detectar espécies transientes (KAVARNOS;TURRO, 1986). Neste caso, o espectro do transiente pode ser obtido como descrito anteriormente.

Muitos íons radicais gerados por transferência de elétron irão emitir fluorescência quando excitados pela luz de monitoração. Neste caso, o sinal elétrico gerado pela fotomultiplicadora é, em última instância, transformado em intensidade de fluorescência.

A ressonância Raman é uma técnica recente para observação de transientes. Embora esta espectroscopia não seja tão sensível quanto a espectroscopia de absorção, ela fornece mais detalhes sobre a estrutura do transiente. Além disso, a espectroscopia de ressonância Raman permite a observação de duas espécies com diferentes bandas Raman que têm espectro de absorção UV-vis sobrepostos.

A condutividade de transientes pode ser usada para detectar a formação de íons após a fotólise por pulso de laser. Muitos processos de transferência de elétron que produzem cátions ou ânions radicais aumentarão a condutividade da solução. Esta técnica é sensível especialmente quando comparada às espectroscopias Raman e UV-vis. No entanto, pouca informação sobre a estrutura dos íons radicais pode ser obtida.

A maioria dos transientes são espécies altamente reativas. Esta propriedade pode ser utilizada para detectar as espécies transientes. A adição de substâncias que são conhecidas ter reatividade específica junto aos transientes, conhecidos como supressores, previnem reações secundárias. O íon azida e NO_2 são bons supressores de oxigênio singlete. O composto p-nitroso-N,N-dimetilanilina é um supressor seletivo para o radical hidroxila em meio alcalino.

Uma outra forma útil de aprisionar um radical livre é a adição de substâncias que podem sofrer reações de polimerização iniciada por radicais livres. Neste caso, o polímero pode ser analisado para determinar a identidade do iniciador.

As espécies transientes também podem ser identificadas por espectroscopia de absorção ou fluorescência. Isso pode ser feito comparando-se o espectro do transiente obtido experimentalmente com o espectro conhecido de cátions ou

ânions radicais, ou espectro de absorção do estado excitado. Outras técnicas como EPR ou espectroscopia de massa também são eficientes para estudar transientes de vida curta, sob condições do estado estacionário.

A técnica de fotólise por pulso de laser possui várias vantagens (NUNES, 2003):

- (a) pode ser aplicada a gases, líquidos (soluções) e sólidos, na presença ou ausência de oxigênio;
- (b) a sua alta sensibilidade permite o estudo de intermediários com concentrações muito pequenas utilizando-se amostras diluídas e/ou volume reduzido nas cubetas;
- (c) a identificação de intermediários pode ser feita através do espectro se as bandas de absorção forem separadas e caracterizadas e
- (d) a investigação pode ser feita na escala de tempo da ordem de nanosegundo e/ou picosegundo.

Por sua vez, a fotólise por pulso de laser possui também limitações, como (NUNES, 2003):

- (a) a amostra deve ser opticamente clara e transparente para o monitoramento da luz. A presença de espalhamento de luz por partículas deve ser evitada e a absorbância da solução deve ser ajustada de modo a aumentar a eficiência da luz de monitoramento;
- (b) o intermediário reativo não deve possuir absorvidade molar baixa;
- (c) a falta de detalhes no espectro de absorção pode tornar a identificação das espécies transientes quase impossível e
- (d) a determinação de parâmetros cinéticos pode ser difícil, especialmente para intermediários de vida curta, se sua concentração absoluta deve ser determinada.

II. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos:

Preparar e caracterizar lipossomas catiônicos convencionais para o uso como sistema de liberação do fármaco ZnPc nos ensaios fotodinâmicos para a erradicação de *E. coli* e *S. aureus*.

Avaliar as propriedades fotofísicas dos fármacos fotossensíveis utilizados neste projeto (espectroscopia no UV-visível, emissão de fluorescência, espectroscopia nos estados excitados singlete e tripleto). Para a TMPyPH₂ e VBBO, a caracterização espectroscópica foi realizada com os fármacos em meio aquoso, tampão fosfato salino ou solução fisiológica. Para a ZnPc, estes estudos foram realizados em meio orgânico (etanol e DMSO/DMF 50% (v/v) e formulações lipossomais catiônicas (DPPC/colesterol/DDAB/LPC e PC/colesterol/DDAB/LPC, na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04).

Determinar a eficiência destes fármacos na erradicação fotodinâmica de *E. coli* e *S. aureus*.

Nestes estudos envolvendo microorganismos, os objetivos específicos compreenderam:

Determinar a eficiência de incorporação dos fármacos por uma suspensão de bactérias ($10^7 - 10^8$ UFC.mL⁻¹) após a incubação por um tempo definido. O estudo foi realizado para várias concentrações dos fármacos TMPyPH₂ e VBBO (0,5 - 100,0 μmol.L⁻¹) e na concentração de 3,0 μmol.L⁻¹ da ZnPc.

Determinar a toxicidade da luz utilizada para a excitação dos fármacos fotossensíveis e da toxicidade intrínseca destes compostos para uma suspensão de bactérias ($10^7 - 10^8$ UFC.mL⁻¹) após incubação por um tempo definido. O estudo foi realizado para nas concentrações de 0,5 e 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dos fármacos TMPyPH₂ e VBBO e na concentração de 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da ZnPc.

Avaliação fotobiológica da TMPyPH₂, VBBO e ZnPc na erradicação de *E. coli* e *S. aureus*. O estudo foi realizado para nas concentrações de 0,5 e 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ dos fármacos TMPyPH₂ e VBBO e na concentração de 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ da ZnPc.

Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a ação fotobiológica dos fármacos TMPyPH₂ e VBBO nas concentrações de 0,5 e 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

III. SEÇÃO EXPERIMENTAL

III.1. Materiais e Soluções

A água ultrapura, utilizada no preparo de soluções e meio de cultura, foi obtida através da filtragem seqüencial com colunas de troca iônica em um sistema Barnstead D-3750, cujo filtro final apresenta porosidade de 0,2 μm , pressão máxima de operação de 50 psi (3,4 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) e resistividade final de 18 $\text{m}\Omega$.

O tampão fosfato salino (PBS), utilizado na preparação de lipossomas, foi preparado através da dissolução de uma pastilha de Tampão Fosfato Salino (Sigma) para cada 200 mL de solução. Outro estoque de tampão fosfato, usado regularmente no prepara de soluções, foi preparado pela mistura de soluções de fosfato monobásico de sódio (Sigma) e fosfato dibásico de sódio (Sigma), ambas de concentração 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. O pH final medido para as soluções foi aproximadamente 7,4. Após o preparo, as soluções tampão foram armazenadas em geladeira a uma temperatura inferior 10 $^{\circ}\text{C}$ até o uso. O tempo máximo de armazenagem foi de 15 dias.

O detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) foi purificado, inicialmente, pela extração durante 12 horas com hexanos utilizando o sistema Soxhlet. Em seguida, o detergente foi recristalizado por três vezes, utilizando-se etanol como solvente. O grau de pureza do detergente foi constatado através do valor de concentração micelar crítica (cmc), obtido por medidas de tensão superficial. O valor encontrado foi de 7,9 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e está de acordo com valores para a cmc encontrados na literatura (KALYANASUNDARAM, 1987; LACERDA, 2001).

A *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi adquirida da coleção de cultura tropical (CCT) da Fundação André Toselo, sediada na cidade de Campinas, SP. A *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) foi cedida pela Prof^a. Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini, docente do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Ambos os microorganismos foram cultivados aerobicamente a 37 °C, utilizando-se o caldo Brain Heart Infusion (BHI; Merck) ou o Agar-BHI como meio de cultura. O Agar-BHI foi preparado pela dissolução de 17 g de Agar Bacteriológico (Fisher) para cada litro de meio de cultura preparado.

Abaixo relacionados, encontram-se os solventes e demais materiais utilizados como recebidos:

Fármacos Fotossensíveis: 5,10,15,20-meso-tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirina (TMPyPH₂, Porphyrin Products Inc.); Ftalocianina de zinco (ZnPC, Aldrich); Victoria Bue BO (VBBO, Aldrich); Feoforbide-a (Porphyrin Products Inc.);

Lipídios: L- α -Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC, Avanti Polar Lipids); Colesterol (Avanti Polar Lipids); Brometo de Dimetildioctadecilamônio (DDAB, Aldrich). Lisofosfatidilcolina (LPC, Avanti Polar Lipids); Fosfatidilcolina de Ovo (PC, Sigma);

Solventes (Grau Analítico): Metanol (Mallinckrodt); Etanol (Merck); Acetona (Mallinckrodt); Dimetilsulfóxido (DMSO; Mallinckrodt); Dimetilformamida (DMF; Merck); Glicerol (Mallinckrodt);

Outros Materiais: Cloreto de Sódio (Mallinckrodt); Cristal violeta (Aldrich); Fenol (Aldrich); Iodo (Synth); Iodeto de Potássio (Synth); Safranina (Aldrich).

Em todos os experimentos foram utilizadas soluções recém-preparadas dos fármacos a partir de um estoque de concentração 1,0 mmol.L⁻¹, conservado em freezer a -20 °C e na ausência de luz. Para a TMPyPH₂ e para o VBBO, as soluções

estoques foram preparadas em água. Para a ZnPc, o estoque foi preparado em uma solução DMSO/DMF 50% (v/v). O Feoforbide-a teve suas soluções preparadas em metanol. Todos os estoques foram conservados a 4 °C e protegidos da luz por um período não superior a duas semanas.

III.2. Aparelhagem

Nos estudos espectrofotométricos, os espectros de absorção foram registrados nos espectrofotômetros U-3000 da Hitachi ou Lambda 20 da Perkin Elmer. Para a determinação dos espectros de emissão de fluorescência foram empregados os espectrofluorímetros F-4500 da Hitachi ou Fluorolog 3 da Spex. Todos os aparelhos são equipados com controle de temperatura e agitação magnética.

A fonte de irradiação utilizada nos experimentos de determinação do espectro de absorção do transiente e tempo de vida triplete dos fármacos fotossensíveis foi um sistema laser Nd-YAG da Continuum, modelo SURELIT I-10. Como fonte de excitação, utilizou-se o terceiro harmônico do laser (355 nm). A energia média utilizada foi da ordem de 30 mJ por pulso, através de uma fenda de 8,0 mm de diâmetro. A uma distância de 10 cm da fenda do laser, foi posicionado um suporte para celas termostaticável com agitação magnética (Hellman CUV-O-Stir). A intensidade da luz foi determinada antes e após o conjunto de pulsos por um "Power Meter" (Field Master da Coherent), usando uma cabeça de detecção LM-30 V, posicionado a partir do suporte para celas. Os sinais dos transientes gerados foram detectados pela fotomultiplicadora e transferidos para um osciloscópio digital (Tektronix modelo TDS 340A), sendo armazenados em um computador. A análise final dos dados obtidos foi realizada utilizando-se o software fornecido pela Edinburg Instruments.

A mesma fonte de irradiação foi utilizada para a determinação do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete. Neste caso, a energia média utilizada foi da ordem de 50 mJ por pulso. O sinal de emissão de fosforescência do oxigênio singlete foi identificado em 1270 nm utilizando-se um

detector de germânio da North Coast Scientific Corporation, modelo 823A, e transferidos para o osciloscópio digital. Um filtro de silicone foi usado para evitar qualquer sinal de fluorescência interferindo com as medidas de oxigênio singlete. Os dados obtidos foram processados e analisados utilizando-se o software operacional do próprio equipamento.

Na preparação dos lipossomas, a composição lipídica do sistema de liberação foi, inicialmente, dissolvida num volume de 380 μ L de etanol espectroscópico. Então, a solução etanólica de lipídios foi injetada, com o auxílio de uma microseringa (Hamilton), em 5,0 mL de tampão fosfato salino contido em uma jaqueta de vidro acoplada a um banho termostático (PolyScience). O processo de injeção foi feito automaticamente, utilizando-se uma bomba peristáltica (sp100i syring pump, da WPI). O tamanho das partículas lipossomais foi determinado através de medidas de espalhamento de luz, utilizando-se o equipamento Zetasizer 300 HSA, da Malvern Instruments, no laboratório de Físico-Química de Superfícies pertencente à Prof^a. Dr^a. Maria Elizabete Zaniquelli Darbello, do Departamento de Química da FFCLRP, USP. O equipamento permite a determinação do tamanho de partículas com dimensões entre 0,01 a 300 μ m.

A esterilização de meios de cultura e demais materiais e soluções necessários para o cultivo e/ ou manutenção da cultura dos microorganismos foi realizada na autoclave horizontal modelo Clear 2001, da Termotron. As soluções e materiais foram autoclavados a 120 °C por 30 minutos, com exceção dos materiais plásticos (ponteiras para pipeta automática, tubos Falcon, eppendorf) que foram autoclavados por 15 minutos, seguindo recomendação dos fabricantes. O descarte dos meios de cultura e outros materiais contendo microorganismo foi sempre precedido pela esterilização destes utilizando-se a autoclave modelo AV30, da Phoenix.

As cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram congeladas e estocadas a uma temperatura de -70 °C em um freezer da Forma Scientific. Após descongelamento, os microorganismos foram cultivados na temperatura fixa de 37°C com o auxílio da estufa bacteriológica modelo Q316B14, da Químis. Para a separação dos

microorganismos em suspensão da fase aquosa, utilizou-se a centrífuga modelo 5810R, da Eppendorf.

Nos estudos de foto-erradicação de *E. coli* e *S. aureus*, empregou-se, como fonte de luz, um sistema do tipo foto-polimerizador (Dabi-Atlante) de uso rotineiro em procedimentos odontológicos. O sistema foto-polimerizador foi acoplado a um filtro óptico (Eikonol Instrumentos) que permite a transmissão de uma faixa selecionada de comprimentos de onda. Para os estudos envolvendo a TMPyPH₂, o filtro utilizado permite a passagem de radiação com comprimentos de onda entre 400 e 500 nm, que é a faixa de comprimento de onda em que ocorre a máxima absorção de radiação pelo fármaco. Para a ZnPc e o VBBO, ambos com absorção máxima na região do vermelho do espectro eletromagnético, o filtro óptico selecionado permite a transmissão da radiação na faixa de 600 a 700 nm (Figura III.1). A intensidade da luz utilizada foi de 14 mW.cm⁻² nos estudos envolvendo a TMPyPH₂ e de 44 mW.cm⁻² nos ensaios envolvendo o VBBO e a ZnPc.

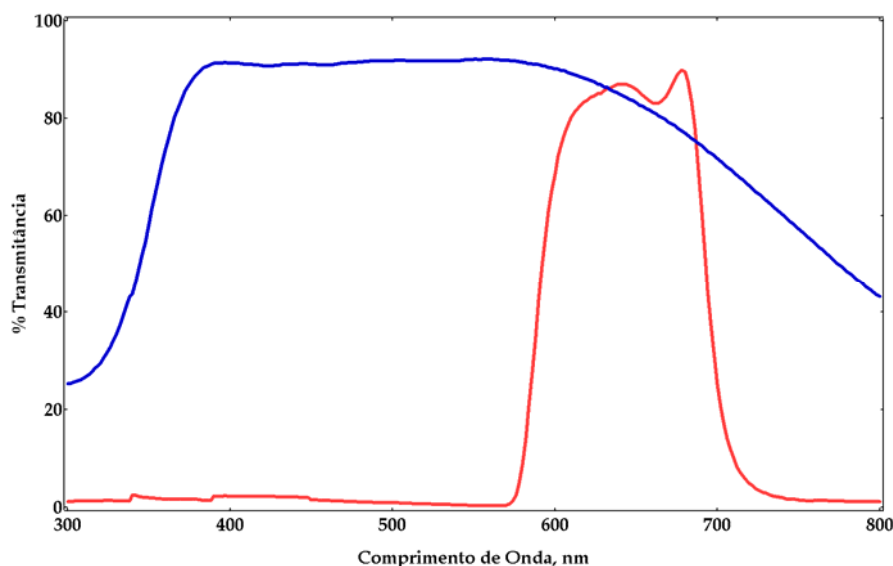


Figura III.1: Espectro de transmittância dos filtros ópticos utilizados para selecionar radiação na faixa de comprimento de onda de (—) 400 – 500 nm e (—) 600 – 700 nm.

Após o teste de coloração de Gram, os microorganismos foram observados com um microscópio biológico binocular da Coleman. Este microscópio, como a

maioria utilizada em microbiologia, possuía lentes objetivas de 10X (baixa potência), 40X (alta potência) e 100X (imersão em óleo) que permitiam a ampliação da amostra. A amostra foi, ainda, ampliada pelo conjunto de lente ocular, com um aumento final por um fator de 10.

Os equipamentos abaixo relacionados foram utilizados em procedimentos de rotina no laboratório: balança eletrônica da Libror, modelo AEL 200; sonificador da Branson, modelo 2200; sistema vortex da VWR Scientific, modelo Genie 2 e pHmetro da Fisher Scientific, modelo Accumet pH meter 50, equipado com eletrodo combinado semi-micro Modelo V621 da Analion.

III.3. Metodologias

Por razões didáticas, a descrição das metodologias adotadas foi dividida em três partes:

- (a) Preparação e caracterização dos sistemas de liberação de fármacos;
- (b) Caracterização fotofísica dos fármacos fotossensíveis;
- (c) Estudos envolvendo os microorganismos.

III.3.1. Preparação e Caracterização dos Sistemas de Liberação de Fármaco

III.3.1.1. Preparação e Caracterização da Estabilidade dos Lipossomas

O lipossoma catiônico contendo DPPC, colesterol e DDAB na razão molar de 1,0/0,49/0,34 foi preparado utilizando-se o método de injeção etanólica. A concentração total de lipídio na formulação foi de 0,7 mM. No procedimento experimental, os lipídios DPPC, colesterol e DDAB foram dissolvidos em um volume máximo de 380 µL de etanol. Então, com o auxílio de uma bomba peristáltica de adição controlada, a solução lipídica foi injetada sob agitação magnética suave em 5,0 mL de tampão fosfato salino contido em uma jaqueta de

vidro termostata a 60 °C. A velocidade de injeção foi 360 µL/hora. Este procedimento foi utilizado rotineiramente para preparado das suspensões lipossomais na ausência do fármaco fotossensível (sem o fármaco incorporado). Para a preparação do sistema de liberação contendo a ZnPc incorporada, o procedimento adotado foi idêntico ao descrito acima. Nestas preparações, entretanto, foi adicionada uma alíquota da solução estoque do fármaco (1,0 mM em DMSO/DMF 50% (v/v)) às solução dos lipídios inicialmente dissolvidos em meio etanólico, de modo que o volume final da solução a ser injetada em tampão fosfato salino não ultrapassasse o volume máximo de 380 µL.

A incorporação do fármaco na vesícula lipossomal foi monitorada com base nas propriedades espectroscópicas do corante como previamente descrito . A concentração do corante foi estimada após registrar o espectro de absorção da ZnPc lipossomal, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar para o fármaco no seu comprimento de onda de máxima absorção ($\epsilon_{(667\text{ nm})} = 2,51 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Para a caracterização da estabilidade da formulação lipossomal foram registrados os espectros de absorção da ZnPc incorporada no seu sistema de liberação em intervalos regulares de tempo e, através da variação na concentração calculada para o fármaco incorporado, pode-se averiguar a degradação do sistema lipossomal. Com base nestes resultados, duas novas formulações foram propostas:

- (a) DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de 1,0/0,45/0,34/0,04 e concentração total de lipídio de 0,7 mM.
- (b) PC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de 1,0/0,45/0,34/0,04 e concentração total de lipídio de 0,7 mM.

Ambas formulações foram preparadas pelo método de injeção etanólica de maneira análoga ao procedimento anteriormente descrito.

III.3.1.2. Medida de Tamanho das Partículas dos Lipossomas

Além da determinação do perfil de decomposição baseado em técnicas espectroscópicas, as soluções lipossomais em estudo tiveram o tamanho de suas partículas determinado através de medidas de espalhamento de luz.

No procedimento experimental, uma amostra de lipossoma recém-preparada foi acondicionada em cubeta de quartzo para fluorescência e, então, medida a intensidade de espalhamento de luz. A análise do tamanho das partículas foi feita pelo software fornecido pelo fabricante do equipamento (Malvern Instruments), que trabalha com uma média de 10 medidas consecutivas. Determinações de medidas de tamanho foram realizadas também para os lipossomas após 10 dias de sua preparação.

III.3.2. Caracterização Fotofísica dos Fármacos Fotossensíveis

III.3.2.1. Determinação das Propriedades Fotofísicas no Estado Estacionário

As propriedades fotofísicas no estado estacionário (espectros de absorção e emissão de fluorescência) dos fármacos TMPyPH₂ e VBBO foram determinadas em água, tampão fosfato salino ou em solução fisiológica. A ZnPc teve sua caracterização espectroscópica determinada em etanol, DMSO/DMF 50% (v/v) e em meio lipossomal. Os parâmetros obtidos por esta caracterização contribuem para a comparação da eficiência destes compostos nos estudos de fotossensibilização.

Os espectros de absorção registrados permitiram o cálculo do coeficiente de absorvidade molar para os fármacos nos respectivos ambientes de estudo. TMPyPH₂: $\epsilon_{(422 \text{ nm})}$: $2,0 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (água e tampão fosfato salino e solução fisiológica), $\epsilon_{(426 \text{ nm})} = 2,1 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (solução SDS 2%); VBBO: $\epsilon_{(614 \text{ nm})}$: $4,6 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (água), $\epsilon_{(614 \text{ nm})}$: $4,2 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (solução fisiológica), $\epsilon_{(614 \text{ nm})} = 4,2 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; ZnPc: $\epsilon_{(667 \text{ nm})}$: $2,5 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (etanol e lipossomas); $\epsilon_{(672 \text{ nm})}$: $2,3 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (DMSO:DMF 50% (v/v)).

Para a determinação dos espectros de emissão de fluorescência, a excitação da amostra foi realizada no comprimento de onda 422 nm para a TMPyPH₂, 608 nm para a ZnPc e 614 nm para o VBBO. Os estudos foram sempre realizados à temperatura ambiente.

III.3.2.2. Determinação da Constante de Dimerização

É conhecido que a dimerização induz alterações nas propriedades fotofísicas dos fármacos fotossensíveis, reduzindo a sua eficiência nos processos fotodinâmicos. A constante de dimerização (K_D) mede a tendência dos fármacos em formar agregados.

A metodologia empregada para a determinação de K_D para o VBBO consistiu em registrar as variações de absorbância no comprimento de onda de máxima absorção do fármaco com o aumento de sua concentração. Em uma cubeta para absorção, foram adicionados 2,0 mL de água ou solução fisiológica. Com o auxílio de uma microseringa (Hamilton), adicionou-se uma alíquota de uma solução estoque do triarilmetano (1,0 mM em água) e, após homogeneização da solução, registrou-se o espectro de absorção do fármaco na faixa de 300 a 800 nm. O mesmo procedimento foi adotado para as demais alíquotas adicionadas. A concentração de VBBO final na solução variou no intervalo de 0,5 - 58,0 μ M.

Os fármacos TMPyPH₂ e ZnPC tiveram as constantes de dimerização determinadas em trabalhos anteriormente desenvolvidos pelo grupo utilizando-se o mesmo procedimento. Para a porfirina, K_D foi determinado em água e tampão fosfato salino. Para a ftalocianina, K_D foi determinado em piridina e lipossomas de L- α -Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).

III.3.2.3. Determinação do Rendimento Quântico de Fluorescência

A determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) dos fármacos foi feita pelo método relativo. Esta metodologia emprega a equação fornecida por Demas e Crosby (DEMAS;CROSBY, 1971), que relaciona a eficiência de emissão de fluorescência de um fármaco com aquela determinada para um composto padrão nas mesmas condições experimentais.

Para a ZnPc em meio lipossomal, o Φ_F foi determinado relativamente a este mesmo fármaco em meio orgânico (etanol). Experimentalmente, formam

preparados lipossomas em que a ZnPc incorporada apresentava uma absorbância em 604 nm (o comprimento de onda usado para a excitação do fármaco) da ordem de 0,05, a mesma absorbância registrada para a solução padrão de ZnPc em etanol no mesmo comprimento de onda. Aqui, as baixas absorbâncias no comprimento de onda de excitação são necessárias para minimizar o efeito de filtro interno. Após a excitação da ftalocianina, traçou-se o espectro de emissão de fluorescência corrigido do fármaco em ambos os ambientes na faixa de 630 a 800 nm e determinou-se a área das curvas.

Para a TMPyPH₂, o Φ_F foi determinado em trabalho anterior relativamente ao violeta de cresila em metanol, utilizando-se a equação de Demas e Crosby. O procedimento experimental adotado foi idêntico ao descrito para a ZnPc. O VBBO não teve o seu rendimento quântico de fluorescência determinado.

III.3.2.4. Determinação dos Espectros de Absorção e Tempo de Vida do Transiente

Os espectros de absorção do transiente da TMPyPH₂ e ZnPc, bem como os decaimentos das espécies triplete, foram gerados por fotólise por pulso de laser (medidas registradas 13 ns e 9 ns após o pulso de excitação do laser, respectivamente para TMPyPH₂ e ZnPc). A concentração dos corantes foi ajustada para que a absorbância da solução em 355 nm fosse da ordem de 0,3. Os decaimentos das espécies transientes formadas foram monitoradas nos comprimentos de onda de absorção máxima destas espécies (470 nm para a TMPyPH₂ em água e tampão fosfato salino; 480 nm para a ZnPc em meio orgânico e lipossomas e 410 nm para o VBBO em água). Como resposta do sistema de laser computadorizado, obteve-se um gráfico da variação da densidade óptica em função do tempo, bem como a curva teórica que melhor simulava o decaimento observado.

O espectro de absorção do transiente gerado foi registrado, ponto a ponto, em intervalos de 10 nm na faixa de comprimento de onda de 300 a 750 nm, onde uma média de 3 disparos do laser foram registrados para cada excitação da

amostra. Isso permitiu a obtenção dos espectros de absorção dos transientes dos fármacos fotossensíveis nos diversos ambientes estudados.

III.3.2.5. Determinação do Rendimento Quântico de Formação do Estado Triplete

A técnica de fotólise por pulso de laser foi também empregada nos experimentos para a determinação do rendimento quântico de formação do estado triplete (Φ_T) da TMPyPH₂ em água e da ZnPc em DMSO/DMF 50% (v/v). Para ambos os fármacos, o Φ_T foi determinado relativamente ao Feoforbide-a em benzeno ($\Phi_T = 0,65$) (YANG et al., 2000).

No procedimento experimental, as concentrações das amostras e do padrão foram ajustadas de modo que a absorbância fosse de 0,3 no comprimento de onda de excitação (355 nm) e as soluções dos fármacos foram deaeradas pelo borbulhamento de nitrogênio durante 15 minutos. O borbulhamento do nitrogênio é necessário porque o oxigênio molecular pode atuar como um supressor do estado excitado triplete. Então, os espectros de absorção do transiente foram determinados ponto a ponto no intervalo entre 300 e 800 nm, como descrito no item anterior. O espectro de absorção do transiente obtido para cada fármaco foi, então, corrigido para a obtenção do espectro real do transiente, através da equação:

$$\Delta A(t) = A_T + \alpha A_F \quad (\text{Equação 5})$$

em que A_T é a absorção triplete, A_F é a absorção no estado fundamental e α refere-se à fração de espécies excitadas no estado triplete. O valor de α é tal que, quando introduzido na Equação 5, observa-se a supressão das absorbâncias negativas observadas nas faixas de comprimento de onda equivalentes às bandas de absorção no estado fundamental do fármaco. O novo espectro de absorção obtido é conhecido como espectro de absorção real do transiente. O conhecimento do α é

fundamental para o cálculo da absorptividade molar do estado triplete (ϵ_T) do fármaco (utilizado no cálculo de Φ_T), que faz uso da equação:

$$\frac{\epsilon_T(\lambda)}{\epsilon_F(\lambda)} = \frac{A_T(\lambda)}{\alpha A_F(\lambda)} \quad (\text{Equação 6}),$$

em que ϵ_F é o coeficiente de absorptividade molar no estado fundamental num comprimento de onda (λ).

O rendimento quântico de formação do estado triplete para os fármacos foi estimado registrando-se os decaimentos das espécies triplete geradas como uma função da energia de excitação (5, 7, 10, 15 e 50 mJ) e determinando-se a intensidade máxima de absorção do transiente. Os decaimentos do transiente foram monitorados, para cada fármaco, no comprimento de onda de máxima absorção do seu transiente (460 nm para o Feoforbide-a, 470 nm para a porfirina e 480 nm para a ftalocianina de zinco). O gráfico de absorbância triplete como função da energia é linear e a inclinação da reta obtida (ΔA) é uma função do produto entre o ϵ_T e o Φ_T :

$$\Delta A = \epsilon_T \times \Phi_T \quad (\text{Equação 7}).$$

Então, o rendimento quântico de formação do estado triplete para as amostras pode ser estimado relacionando-se o seu valor obtido de ΔA com aquele obtido para o padrão (AMAND;BENSASSON, 1975).

III.3.2.6. Determinação do Rendimento Quântico de Produção do Oxigênio Singlete

O rendimento quântico de produção do oxigênio singlete foi determinado através do método fotofísico, que consiste na determinação do tempo de vida e da intensidade de emissão de fosforescência do 1O_2 em 1270 nm. O composto padrão utilizado nas determinações do Φ_Δ para a ZnPc em meio orgânico e incorporado

em lipossomas foi o Feoforbide-a em metanol ($\Phi_{\Delta} = 0,59$) (RÖDER et al., 2000). Para a porfirina TMPyPH₂, o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete foi determinado relativamente ao fulereno, que também é um eficiente produtor de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta} = 0,76$ em benzeno) (ARBOGAST et al., 1991). Os estados excitados triplete dos fármacos e dos seus respectivos padrões foram gerados por fotólise por pulso de laser utilizando-se, como fonte de excitação, o terceiro harmônico do laser Nd-YAG. No procedimento experimental, as concentrações das soluções dos fármacos e dos padrões foram ajustadas de modo a assegurar que a absorvância em 355 nm fosse da ordem de 0,3. Estas soluções foram acondicionadas em cubetas para fluorescência e aeradas por 30 minutos. Em seguida, para todas as soluções, foi registrado o perfil de emissão de fosforescência resolvido no tempo. A análise dos dados com o software do próprio equipamento permitiu a obtenção dos valores de tempo de vida e intensidade de fosforescência para o oxigênio singlete gerado.

III.3.3. Estudos Envolvendo os Microorganismos

III.3.3.1. Controle da Assepsia do Local de Trabalho e Materiais Utilizados na Manipulação dos Microorganismos.

A assepsia do ambiente de trabalho e a esterilização dos materiais utilizados na manipulação dos microorganismos são essenciais para a prevenção da contaminação de culturas puras de microorganismos.

Para a esterilização de materiais e meios de cultura utilizados, adotou-se o método de autoclavagem. A autoclavagem (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000) é um método físico de esterilização que consiste na elevação da temperatura do calor úmido acima da temperatura de fervura da água devido ao aumento de pressão na câmara de vapor da autoclave. O calor úmido mata os microorganismos por desnaturação das proteínas, que é causada pela ruptura das pontes de hidrogênio que mantêm as proteínas em sua estrutura tridimensional. De um modo geral, a autoclavagem por 15 a 20 minutos a uma temperatura de 120 °C (equivalente a

uma pressão de 15 libras de pressão por polegada quadrada) induz a morte de todos os organismos e seus endósporos (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Neste trabalho, os materiais plásticos utilizados no cultivo das bactérias foram autoclavados por 15 minutos a 120 °C e os demais materiais foram autoclavados nesta temperatura por 30 minutos, como anteriormente descrito.

Para a assepsia do espaço de trabalho foi empregada solução aquosa de etanol 70%. O mecanismo de ação do álcool (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000) é, normalmente, a desnaturação de proteínas, mas o álcool também pode romper membranas e dissolver lipídios. Em adição, aproximadamente 20 minutos antes de iniciar a manipulação das culturas era ligada uma lâmpada de radiação ultravioleta. Esta radiação não-ionizante danifica o DNA das células expostas (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000), produzindo ligações entre as timinas adjacentes nas cadeias de DNA inibindo a replicação correta do DNA durante a reprodução da célula. A radiação ultravioleta também é usada para controlar os micróbios no ar.

III.3.3.2. Estocagem e Preservação das Culturas Bacterianas

O método adotado para a estocagem e preservação das culturas microbianas foi o congelamento a baixas temperaturas. Em uma série de eppendorff, foram adicionados 500,0 µL de uma solução estéril de glicerol 80% e 500,0 µL de uma suspensão do microorganismo (*E. coli* ou *S. aureus*), crescida aerobicamente até a fase logarítmica de crescimento. A mistura foi agitada vigorosamente e rapidamente congelada à temperatura de -70 °C.

A ausência de contaminação das culturas no processo de congelamento foi determinada através do estriamento de alíquotas da suspensão do microorganismo em Agar-BHI. Para as bactérias crescidas, era realizado um teste de coloração de Gram. Procedimento idêntico era realizado no descongelamento da suspensão bacteriana.

III.3.3.3. Teste de Coloração de Gram dos Microorganismos

A coloração de Gram (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000) foi desenvolvida em 1884 pelo bacteriologista dinamarquês Hans Christian Gram e permite a classificação das bactérias como Gram-positivas e Gram-negativas.

O passo inicial para a realização do teste é a fixação dos microorganismos à placa do microscópio. Para isso, utilizando-se uma alça de platina, uma alíquota da suspensão do microorganismo é espalhada na superfície da lâmina do microscópio para formar um filme delgado do material, também denominado esfregaço. Procede-se, então, com as etapas de coloração.

Inicialmente, adiciona-se uma solução de cristal violeta até sobrepor todo o material a ser corado. Após um curto período de incubação, é adicionada uma solução de Lugol até sobrepor todo esfregaço. Aqui, o cristal violeta e o iodo da solução Lugol se combinam e formam o complexo violeta-iodo (CV-I) (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000) que cora ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de púrpura. A diferenciação das bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas ocorre na etapa seguinte, em que é adicionada, sobre o esfregaço, uma solução de álcool-acetona 8:2 (v/v). Esta solução, também conhecida como agente descolorante, remove o complexo CV-I que cora as células Gram-negativas, mas não consegue remover o complexo das células Gram-positivas (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Conseqüentemente, as células Gram-positivas retêm a cor violeta escuro, enquanto as células Gram-negativas ficam incolor. O esfregaço é, então, incubado com uma solução de safranina por 30 segundos. A safranina cora os microorganismos Gram-negativos de rosa sem afetar a coloração púrpura das bactérias Gram-positivas (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Após lavagem da lâmina com água corrente sob baixa pressão, o esfregaço é seco ao ar e então observado ao microscópio.

A Figura a seguir apresenta uma micrografia de ambos microorganismos utilizados neste trabalho.

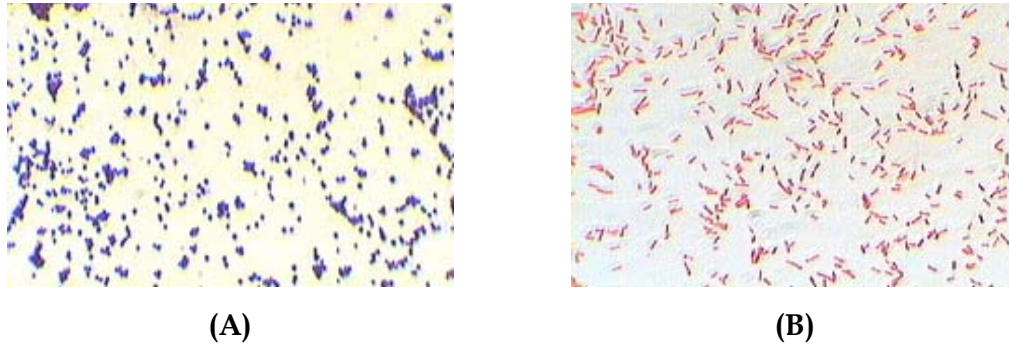


Figura III.2: Micrografia dos microorganismos (A) *S. aureus* e (B) *E coli* corados pelo teste de Gram.

III.3.3.4. Determinação da Curva de Crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

As curvas de crescimento de *E. coli* e de *S. aureus* foram registradas por meio de medidas de absorção no comprimento de onda de 650 nm. No procedimento experimental, alíquotas de 50,0 μL de uma suspensão dos microorganismos em caldo BHI de $\text{Abs}_{650\text{ nm}} = 2.0$ foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de caldo BHI estéril. Os tubos de ensaio foram, então, agitados vigorosamente e incubados a 37 °C. A cada hora, tubos de ensaio eram retirados da estufa, homogeneizados e a absorbância da suspensão bacteriana lida em 650 nm. Estas medidas de absorbância foram feitas por várias horas até que os valores medidos não variassem mais com o tempo. Para cada microorganismo, a curva de crescimento foi registrada, em média, cinco vezes.

III.3.3.5. Preparação dos Microorganismos para os Ensaio Fotodinâmicos

Os microorganismos no início da fase estacionária de crescimento foram separados do meio de cultura por centrifugação (5000 g por 15 minutos) e lavados três vezes com uma solução fisiológica estéril. Os microorganismos foram, então, ressuspensos nesta solução até uma absorção de 0,2 em 650 nm, que

corresponde a uma densidade de 10^7 UFC.mL⁻¹ para a *S. aureus* e 10^8 UFC.mL⁻¹ para a *E. coli*.

Nos ensaios envolvendo os fármacos TMPyPH₂ ou VBBO, diferentes volumes de uma solução estoque do corante foram adicionados à suspensão bacteriana de modo a obter uma concentração final entre 0,5 – 100,0 µmol.L⁻¹. Para os ensaios envolvendo a ZnPc, os microorganismos em suspensão foram separados por centrifugação e ressuspensos no meio lipossomal contendo o fármaco incorporado na concentração aproximada de 3,0 µmol.L⁻¹.

III.3.3.6. Determinação da Concentração dos Fármacos Fotossensíveis Acumulados por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

A quantidade de corante incorporado pelos microorganismos foi analisada por um procedimento espectrofotométrico modificado do originalmente descrito por Jori e colaboradores (MERCHAT et al., 1996a; MERCHAT et al., 1996b).

Após incubação no escuro (5 minutos para VBBO; 5 ou 20 minutos para a TMPyPH₂; 20, 40 ou 60 minutos para a ZnPc), os microorganismos foram separados do corante não ligado por centrifugação (5000 × g por 15 minutos) e lavados com solução fisiológica. A concentração de fármaco não incorporado foi estimada registrando-se os espectros de absorção das soluções sobrenadantes. Para o VBBO e a TMPyPH₂ foram empregados os seus respectivos coeficientes de absorvidade molar em solução fisiológica. Para a ZnPc, foi utilizado o coeficientes de absorvidade molar para o fármaco em meio lipossomal (ver item III.2.1).

Paralelamente, os microorganismos foram ressuspensos e mantidos por 12 horas em uma solução de SDS 2%. Este procedimento induz à quebra da membrana da célula do microorganismo e, conseqüentemente, à liberação do fármaco incorporado para o meio micelar. Após registrar o espectro de absorção, a concentração dos fármacos em meio micelar foi determinada utilizando-se os coeficientes de absorvidade molar em solução micelar de SDS (ver item III.2.1). A ZnPc não forneceu espectro de absorção em meio micelar.

III.3.3.7. Estudos Fotodinâmicos para a Erradicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Para ensaios de foto-erradicação de *E. coli* ou *S. aureus*, inicialmente procedeu-se à incubação do microorganismo com os fármacos fotossensíveis, como descrito anteriormente. O tempo de incubação adotado foi de 5 minutos para os ensaios envolvendo o VBBO e 20 minutos para os ensaios envolvendo a TMPyPH₂ ou a ZnPc. Em seguida, a suspensão do microorganismo foi irradiada sob agitação magnética constante. Como fonte de irradiação, utilizou-se um sistema foto-polimerizador da Dabi-Atlante acoplado a um filtro óptico específico que permite a transmissão de uma faixa selecionada de comprimentos de onda. Os filtros foram selecionados em acordo com a região do espectro magnético em que os fármacos possuem a máxima absorção (400 - 500 nm para a TMPyPH₂ e 600 a 700 nm para a ZnPc e o VBBO). O tempo máximo de irradiação proposto em nossos estudos foi 10 minutos. Em intervalos de tempo conhecidos, procedeu-se à determinação do número de UFC por mililitro de solução utilizando-se o método de diluição seriada: alíquotas de 100,0 µL foram retiradas da suspensão bacteriana original e adicionadas sobre 900,0 µL de solução fisiológica estéril. Após a homogeneização, esta suspensão bacteriana foi novamente diluída de forma a se obter uma nova suspensão 100 vezes mais diluída que a suspensão original. Este procedimento foi repetido sucessivamente por mais cinco vezes, de modo que a última suspensão bacteriana contivesse a suspensão bacteriana original diluída 10⁷ vezes. As diferentes suspensões dos microorganismos tiveram uma alíquota de 100,0 µL espalhada sobre a superfície do Agar-BHI com o auxílio de um bastão de Drigalski. Em seguida, as placas de Petri foram colocadas na estufa onde os microorganismos cresceram a uma temperatura de 37°C, por 24 horas. O número de UFC presentes em cada mililitro da suspensão original foi estimado utilizando-se as placas que continham entre 30 e 300 colônias visíveis, multiplicando-se o número de colônias crescidas sobre a superfície da placa pelo fator de diluição da suspensão bacteriana original.

O número de colônias viáveis, após irradiação da suspensão bacteriana, foi comparado ao número de UFC.mL⁻¹ determinado para a mesma suspensão dos microorganismos incubada com os fármacos fotossensíveis, porém não irradiada (toxicidade no escuro). Este experimento controle visa determinar a toxicidade *per se* dos fármacos para os microorganismos.

Além do controle da toxicidade intrínseca dos fármacos, foi realizado, paralelamente, um ensaio para se averiguar se a luz utilizada para irradiação das culturas possui um efeito bactericida sobre *E. coli* ou *S. aureus*. Este ensaio é conhecido como toxicidade da luz. Experimentalmente, uma suspensão bacteriana sem fármaco adicionado foi irradiada, sob agitação, por 10 minutos e, então, o número de células viáveis foi determinado por diluição seriada, como descrito anteriormente. Para ambos os experimentos controles (toxicidade da luz e toxicidade no escuro), o número de UFC.mL⁻¹ foi comparado àquele determinado para a mesma suspensão dos microorganismos sem incubação com fármacos fotossensíveis ou irradiada.

Este experimento foi também realizado com irradiação imediatamente após a adição dos fármacos às suspensões bacterianas, de modo que se pode explorar a relevância do tempo de incubação bem como o possível sítio de ação das espécies reativas geradas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Preparação e Caracterização dos Sistemas de liberação de Fármacos

IV.1.1. Preparação e Caracterização da Estabilidade dos Lipossomas

Muitos fármacos fotossensíveis utilizados em estudos fotodinâmico são insolúveis em água e, assim, necessitam de um sistema de liberação para auxiliar a sua incorporação nas células alvo (ANGELI et al., 2000; HOEBEKE, 1995). Além disso, a incorporação em sistemas de liberação contribui para a redução da agregação destes fármacos em meio aquoso, fator este determinante para as propriedades fotofísicas do fármaco e para a sua eficiência fotodinâmica (ANGELI et al., 2000; RODRIGUEZ;AWRUCH;DICELIO, 2002). Neste trabalho, foi proposto o uso de sistema de liberação para o fármaco ftalocianina de zinco, um composto altamente hidrofóbico.

Nas últimas décadas, os lipossomas têm sido estudados como sistemas modelos de biomembranas (HOEBEKE, 1995) e também como sistemas de liberação de fármacos {Konan, 2002 276 /id; Kaneda, 2000 277 /id; Feng, 2004 278 /id; Sahoo, 2005 279 /id; Robinson, 2001 280 /id; Oliveira, 2005 281 /id}. Os lipossomas possuem várias vantagens como sistemas de liberação (AOKI;FUJI;MIYAJIMA, 1997; CATUOGNO;JONES, 2003; FENG;RUAN;LI, 2004; KANEDA, 2000; KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002): são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e podem encapsular tanto drogas hidrofílicas quanto hidrofóbicas e contribuem para a eficiência e a seletividade destes

fármacos após a sua incorporação na bicamada lipídica (DAMAISEAU;SCHUITMAKER;LAGERBERG, 2001).

As formulações lipossomais são facilmente incorporadas por diferentes tipos de células de mamíferos, uma vez que, suspensos em meio fisiológico, podem ser facilmente injetados em animais. Assim, os lipossomas podem ser empregados como veículos a liberação de antibióticos, fungicidas, antivirais (BAKKER-WOUDENBERG, 2002) e drogas anticâncer (KONAN;GURNY;ALLÉMANN, 2002; OLIVEIRA;MACHADO;PESSINE, 2005), aumentando a eficiência da liberação no sítio alvos destes fármacos, aumentando e mantendo os efeitos clínicos, reduzindo a toxicidade dos fármacos aos tecidos saudáveis e protegendo-os das respostas metabólicas e imunológicas (HOEBEKE, 1995).

Estudos têm também demonstrado a potencialidade do uso de lipossomas como veículos para liberação de fármacos bactericidas {Catuogno, 2003 275 /id; Robinson, 2001 280 /id; Bakker-Woudenberg, 2002 282 /id; Jones, 2005 283 /id}. A liberação tópica de bactericidas na superfície da pele e na cavidade oral é importante no desenvolvimento de produtos como pomadas, enxágües bucais e xampus (JONES et al., 1994). Para ser mais efetivo, o bactericida não deve apenas afetar o microorganismo, mas deve, também, ser capaz de ser retido pelas bactérias após uma aplicação inicial. Alguns estudos têm mostrado que os lipossomas interagem com as bactérias e, portanto podem ser usados como veículos para a liberação de agentes antibacterianos (ROBINSON et al., 2001).

Como descrito no capítulo de introdução, a eficiência dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos pode ser relacionada com a sua adsorção à parede da célula da bactéria (KIM;GIAS;JONES, 1999; ROBINSON et al., 2001), que pode ser facilitada pela inserção de lipídios catiônicos na vesícula lipossomal (KIM;GIAS;JONES, 1999; SANDERSON et al., 1996). Por esta razão, acredita-se que vesículas lipossomais contendo lipídios catiônicos sejam efetivos na liberação de fármacos hidrofóbicos como a ftalocianina de zinco às culturas bacterianas, fornecendo, assim, subsídios necessários para uma maior compreensão da ação fotodinâmica destes fármacos sobre os microorganismos.

A formulação lipossomal inicialmente proposta como sistema de liberação para a ZnPc possuía, em sua constituição os lipídios DPPC, colesterol e o lipídio catiônico DDAB na razão molar 1,0/0,49/0,34. A concentração lipídica total foi de 0,7 mM. Lipossomas preparados a partir de diferentes lipídios são denominados, normalmente, por lipossomas convencionais. Existem ainda os lipossomas de longo tempo de circulação ou “stealth” lipossomas, nos quais os lipossomas são recobertos por unidades poliméricas como o polietilenoglicol (PEG) (BAKKER-WOUDENBERG, 2002).

Muitas mudanças podem ocorrer com os lipossomas com alto tempo de estocagem e, assim, afetar a sua atividade como sistema de liberação (NEW, 1990). Os fosfolipídios podem sofrer degradação química (oxidação ou hidrólise) alterando a constituição dos lipídios na bicamada. Também, os lipossomas podem se agregar, fundir ou liberar o seu conteúdo para a fase aquosa. Sendo assim, estudos avaliando a estabilidade das formulações são imprescindíveis. Formulações estáveis previnem a liberação antecipada dos fármacos para o ambiente e, assim, contribuem para um aumento na incorporação do fármaco pelas células alvo.

Neste trabalho, a estabilidade do lipossoma foi avaliada por técnicas espectrofotométricas, registrando-se o espectro de absorção da ZnPc lipossomal em intervalos de tempo conhecidos e calculando-se a sua concentração com base no seu coeficiente de absorvidade molar. Desde que o fármaco é insolúvel em meio aquoso, portanto não apresenta resolução espectral neste meio, a concentração determinada refere-se à concentração da ftalocianina que permanece incorporada.

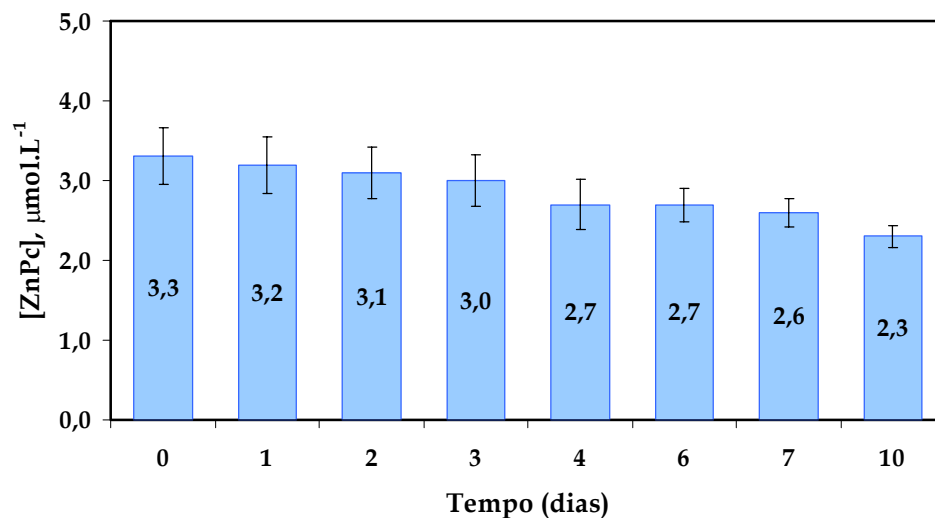
O perfil de degradação obtido para a formulação lipossomal catiônica demonstrou uma diminuição de $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ na concentração de ZnPc incorporada após 48 horas da preparação do lipossoma, indicando uma acentuada degradação do sistema de liberação no período citado.

Formulações lipossomais estáveis mantêm o fármaco incorporado com nenhuma ou mínima alteração em sua concentração por vários dias (na maioria das vezes, por cerca de até duas semanas). Caso haja a necessidade de altos tempos de estocagem, existe a possibilidade de liofilização das suspensões

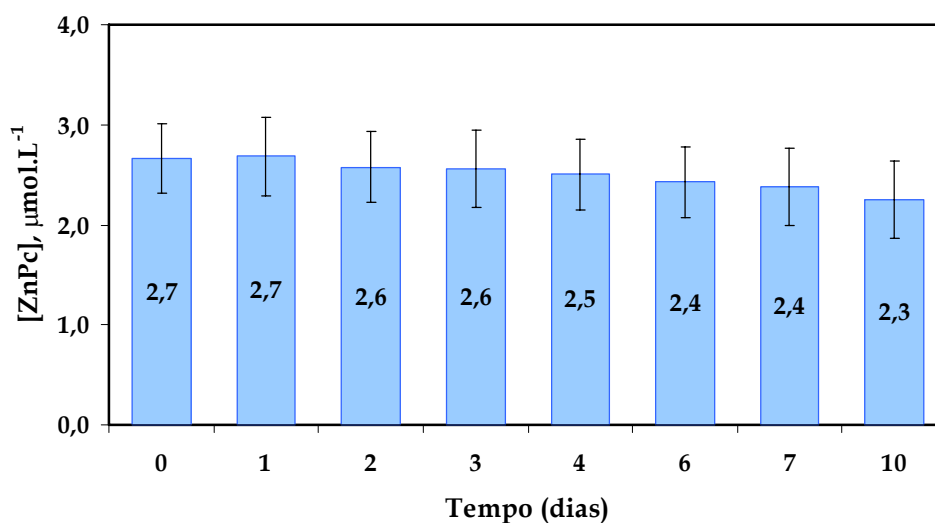
lipossomais para posterior reconstituição. Neste caso, novos estudos de estabilidade devem ser desenvolvidos antes da formulação final ser apresentada ou comercializada. Neste trabalho, os estudos foram feitos em suspensão uma vez que todo material desenvolvido aqui se destinou à pesquisa, não sendo, portanto, o alvo deste trabalho o *scaling-up* da produção dos sistemas lipossomais.

Visando uma maior estabilidade do sistema de liberação de fármacos, duas novas formulações lipossomais foram preparadas, sendo sua constituição lipídica: (I) DPPC/ colesterol/ DDAB/ lisofosfatidilcolina (LPC) e (II) Fosfatidilcolina de ovo (PC)/ colesterol/ DDAB/ LPC, ambas na razão molar de 1,0/0,45/0,34/0,04.

Em todas as formulações a concentração total de lipídio foi mantida constante (0,7 mmol.L⁻¹). A Figura IV.1 apresenta o perfil de degradação das novas formulações lipossomais catiônicas propostas.



(A)



(B)

Figura IV.1: Perfil de degradação do lipossoma catiônico de (A) DPPC/ colesterol/ DDAB/ LPC e (B) PC/ colesterol/ DDAB/ LPC, ambas formulações na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04.

Para o lipossoma catiônico de DPPC/ colesterol/ DDAB/ LPC, observou-se uma diminuição de 1,0 µM da ZnPc após 10 dias da preparação do sistema de liberação. Para a outra formulação (PC/ colesterol/ DDAB/ LPC), no mesmo período de tempo, foi observada uma variação de apenas 0,4 µM na concentração do fármaco. Percebe-se, portanto, que as ambas formulações lipossomais

propostas são estáveis sendo, portanto, adequadas ao estudo envolvendo a liberação da ZnPc nos ensaios de morte foto-induzida de ambos os microorganismos estudados.

IV.1.2. Medida de Tamanho das Partículas dos Lipossomas

Os lipossomas catiônicos foram também caracterizados de acordo com o tamanho dos lipossomas. O tamanho de partículas lipossomais podem ser caracterizados por vários métodos (COLLECTED AUTHORS, 1981), como microscopia eletrônica, permeação em gel, espalhamento de luz, sedimentação e eletroforese. Neste estudo, optou-se pelo método de espalhamento de luz.

Quando um feixe de luz incide sobre uma solução ou dispersão coloidal (NUNES, 2003; VOGEL, 1981), parte da luz é absorvida, parte sofre espalhamento e o restante é transmitido através da solução sem outras perturbações. O nítido aspecto turvo associado a muitas dispersões coloidais é uma consequência de um intenso espalhamento de luz.

Em princípio, todas as substâncias podem provocar o espalhamento da luz até um certo grau (efeito Tyndall). A turbidez de um material é definida pela expressão:

$$\frac{I_t}{I_0} = \exp(-\tau\lambda) \quad \text{(Equação 8)}$$

em que I_0 é a intensidade de luz incidente, I_t é a intensidade de luz transmitida, λ é o comprimento do caminho óptico e τ é a turbidez da solução.

A amplitude total da luz espalhada por uma partícula é proporcional ao número de fontes individuais de espalhamento existentes na partícula, isto é, proporcional às suas dimensões e também à massa. Desta forma, medidas de espalhamento de luz possibilitam a determinação do tamanho das partículas na dispersão coloidal.

Os diâmetros obtidos para as diferentes formulações são apresentados na Tabela IV.1. Não foram observadas variações significativas no diâmetro dos lipossomas após 10 dias de sua preparação, sendo esta observação mais um forte indicativo da estabilidade das formulações propostas dentro desta janela de tempo.

Tabela IV.1: Tamanho das vesículas lipossomais catiônicas

Composição	Diâmetro das Vesículas
<i>DPPC/colesterol/DDAB/LPC *</i>	219 nm
<i>PC/colesterol/DDAB/LPC *</i>	144 nm

* Razão Molar 1,0/0,45/0,34/0,04

Existem vários processos pelos quais os lipossomas podem interagir com sistemas biológicos, em especial as células (CEVEC;RICHARDSEN, 1999; LASIC, 1998; NEW, 1990). A adsorção representa a associação de vesículas intactas com a superfície da célula. Tal processo pode ser mediado por interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou outras induzidas por componentes específicos presentes na vesícula ou na superfície da célula. A endocitose é a incorporação de vesículas intactas pela célula e resulta, presumivelmente, no seu acúmulo nos lisossomos. A fusão consiste na absorção da partícula lipossomal pela membrana da célula, com a concomitante liberação do conteúdo incorporado no lipossoma para o espaço citoplasmático. Existe ainda a troca de lipídio, que consiste na transferência de moléculas individuais de lipídio entre vesículas e a superfície da célula, sem transferência do conteúdo incorporado no sistema de liberação.

Estudos envolvendo tecidos tumorais indicaram que a liberação de fármacos fotossensíveis através de formulações lipossomais é dependente do tamanho da partícula lipossomal, sendo a liberação mais eficiente para lipossomas com dimensão aproximada de 100 nm (NAGAYASU;UCHIYAMA;KIWADA, 1999).

Uma célula de bactéria possui dimensões entre 1 e 10 μm (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Portanto, o tamanho das partículas dos

lipossomas preparados é pequeno quando comparado com as dimensões da célula bacteriana. Conseqüentemente, a interação entre bactérias e os lipossomas deve ser favorecida quando comparada àquela com lipossomas de dimensões próximas a do microorganismo (vesículas unilamelares largas). Assim, esta caracterização de tamanho indica a habilidade do lipossoma em liberar eficazmente a ZnPC em células de *E. coli* ou *S. aureus*, contribuindo para a ação fotodinâmica do fármaco. Estas medidas também permitem avaliar a estabilidade da formulação proposta bem como o seu tempo de estocagem nesta forma de veiculação

IV.2. Caracterização Fotofísica dos Fármacos Fotossensíveis

Uma das linhas de estudo no campo da TFD consiste na caracterização espectroscópica de fármacos. Estes estudos são importantes por permitirem averiguar se tais compostos possuem propriedades que são indicativas de sua eficiência como agentes fotossensíveis para a Terapia Fotodinâmica. Tais estudos compreendem a caracterização do primeiro estado excitado singlete (tempo de vida de fluorescência, rendimento quântico de fluorescência) e, mais importante, a eficiência do processo não radioativo de cruzamento intersistemas com concomitante formação de seu estado excitado tripleto. Além de altos rendimentos quânticos de formação do estado excitado tripleto, fármacos fotossensíveis eficientes possuem tempo de vida do estado tripleto longo e alto rendimento quântico de produção de espécies reativas como oxigênio singlete, ânion radical superóxido e radical hidroxila, todas envolvidas no dano celular foto-induzido. Os resultados obtidos na caracterização espectroscópica dos fármacos utilizados neste projeto são apresentados e discutidos a seguir.

IV.2.1. Determinação das Propriedades Fotofísicas no Estado Estacionário

As técnicas de espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no estado estacionário são comumente usadas para se obter informações úteis a respeito dos sistemas biológicos, de uma maneira não destrutiva.

A técnica de absorção baseia-se na capacidade de um cromóforo absorver a radiação em uma faixa de comprimentos de onda pré-definida. Medidas espectrofotométricas de absorção permitem que seja estimado diretamente tanto o grau de incorporação de um fármaco em sistema biológico bem como o seu estado de agregação. Nos estudos fotodinâmicos, mais especificamente, medidas de absorção são importantes uma vez que permitem estimar parâmetros como comprimento de onda para a excitação dos fármacos fotossensíveis, tempo de exposição à radiação laser sem a degradação do fármaco, tempo de permanência da droga nos tecidos peritumorais e muitas outras características.

A espectroscopia de fluorescência contribui para a complementação das informações fornecidas pela técnica de absorção. A fluorescência é um processo radioativo no qual uma molécula excitada perde a energia absorvida sob a forma de emissão de luz. Uma análise criteriosa das características espectrais do fluoróforo, em solução e em meio biológico, permitem avaliar o grau de eficiência fotodinâmica do composto fotossensível em estudo. Além disso, uma das grandes linhas de estudo envolvendo espectroscopia em sistemas biológicos avalia o uso de sondas fluorescentes como marcadores biológicos e como rastreadores de atividade iônica celular.

A porfirina catiônica TMPyPH_2 tem sido investigada como fármaco fotossensível para a terapia fotodinâmica e tem se mostrado eficiente em estudos de foto-oxidação realizados *in vivo* e *in vitro* (JUARRANZ et al., 1995). O espectro de absorção do fármaco em água é apresentado na Figura IV.2.

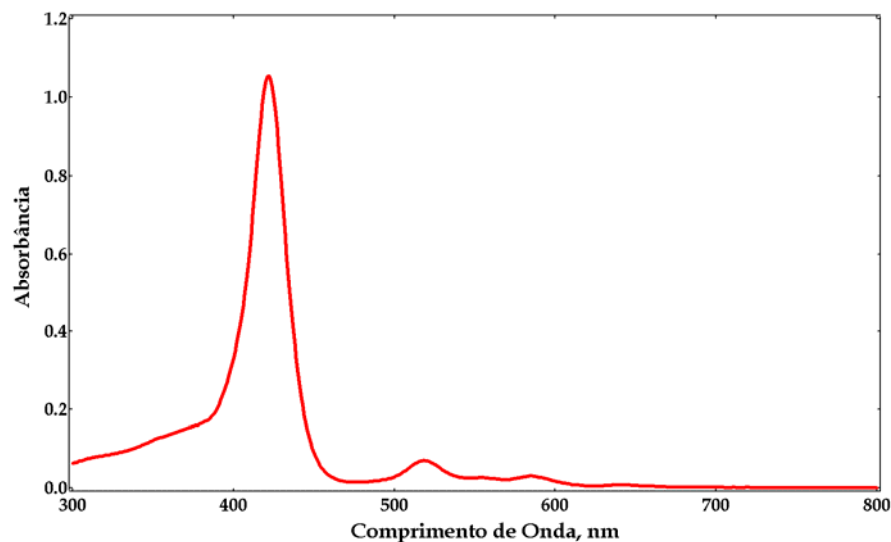


Figura IV.2. Espectro de absorção da TMPyPH₂ 5,0 μM em água.

O espectro obtido possui o perfil característico das porfirinas, com uma banda de absorção intensa (a banda Soret) centrada em 422 nm e um conjunto de bandas de menor intensidade (as bandas Q) entre 500 e 700 nm.

O espectro de emissão de fluorescência para a TMPyPH₂, Figura IV.3, localiza-se na região do vermelho do espectro eletromagnético e é caracterizado por duas bandas de emissão de separação pouco definida com máximos em aproximadamente 670 e 700 nm.

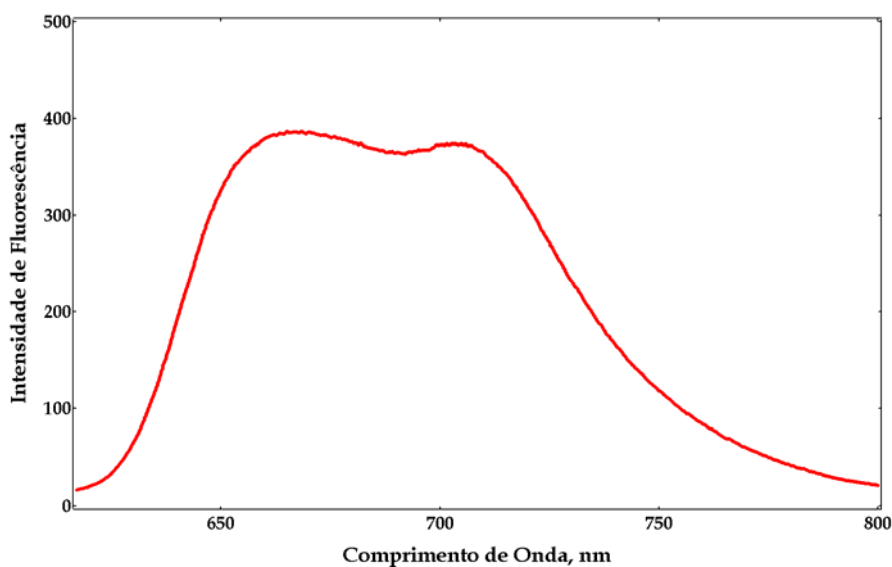
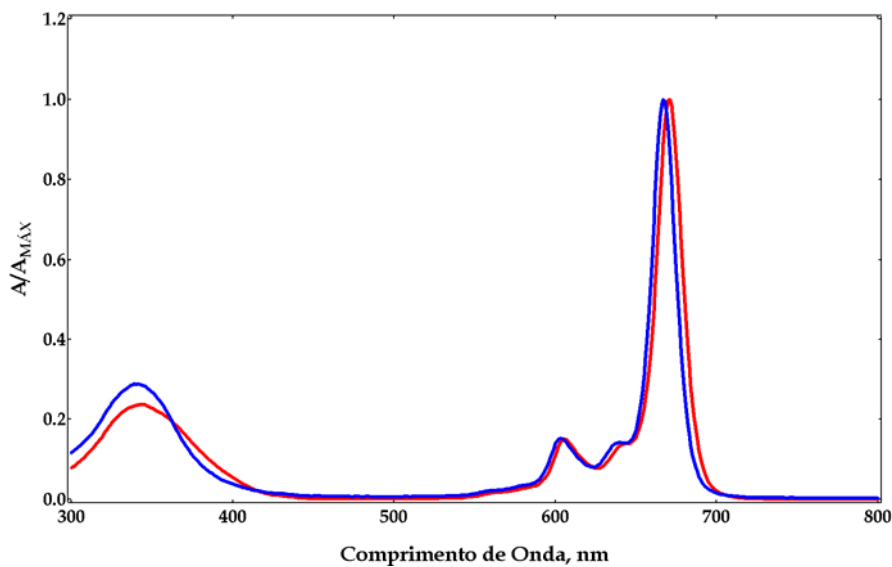


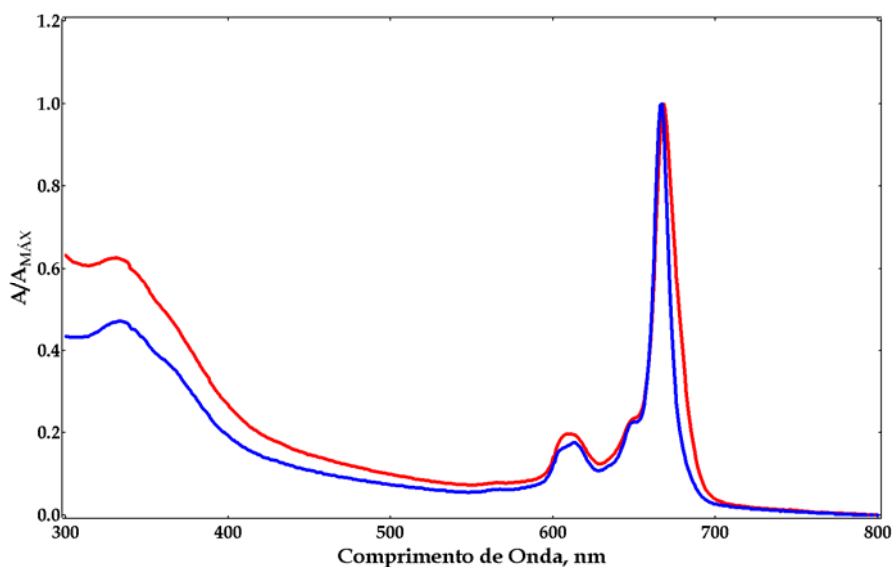
Figura IV.3. Espectro de emissão de fluorescência da TMPyPH₂ 5,0 μmol.L⁻¹ em água.

Não foram observadas diferenças no perfil de absorção ou emissão de fluorescência quando a porfirina foi dissolvida em tampão fosfato salino, indicando que o aumento da força iônica do meio não afeta estas propriedades fotofísicas do fármaco.

Entre os fármacos fotossensíveis da segunda-geração mais promissores estão as ftalocianinas (ALLEN;SHARMAN;VAN LIER, 2001). A Figura a seguir apresenta o espectro de absorção normalizado da ftalocianina de zinco utilizada neste projeto em meio orgânico (Figura IV.4 (A)) e incorporada nos sistemas de liberação lipossomais preparados (Figura IV.4 (B)). A fotoquímica de fármacos incorporados em lipossomas é esperado ser quantitativamente diferente daquela observada em soluções homogêneas simples, desde que as propriedades fotofísicas do fármaco são afetadas pela polaridade, viscosidade e o índice de refração do ambiente em que o fármaco se encontra (HOEBEKE, 1995).



(A)



(B)

Figura IV.4. Espectro de absorção normalizado da ZnPc em (A) meio orgânico de (–) etanol e (–) DMSO/DMF 50% (v/v) e (B) lipossomas catiônicos de (–) DPPC/colesterol/DDAB/LPC e (–) PC/colesterol/DDAB/LPC, ambas formulações na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04.

O perfil de absorção da ZnPc é constituído de uma banda Soret com máximo centrado em aproximadamente 339 nm (ver Tabela IV.2) e um conjunto de bandas Q com considerável absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético. Diferentemente das porfirinas, este fármaco possui seu máximo

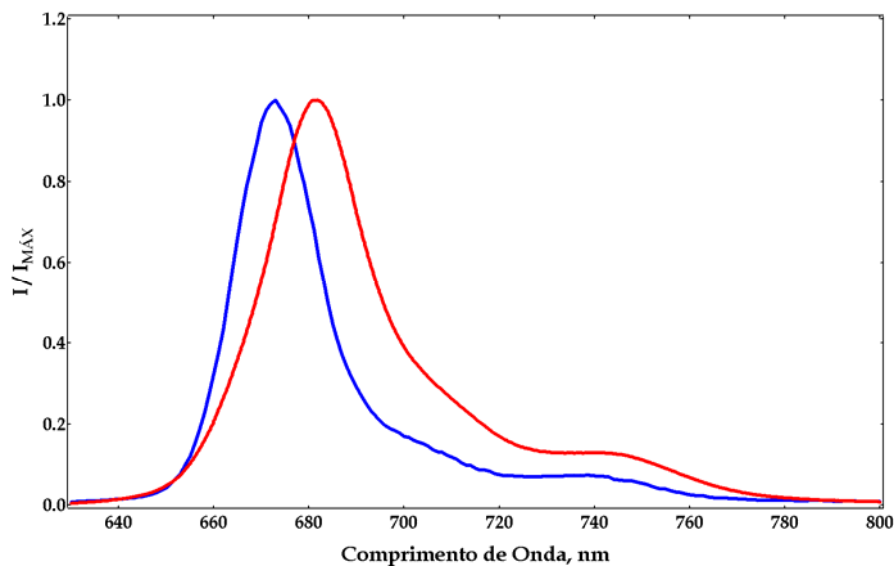
de absorção em torno de 670 nm (ver Tabela IV.2), ou seja, dentro da Janela Terapêutica, que é uma característica procurada entre os fármaco fotossensíveis da segunda geração (VIOLA et al., 1996).

Tabela IV.2. Posição dos máximos de absorção da ZnPc em meio orgânico e lipossomas

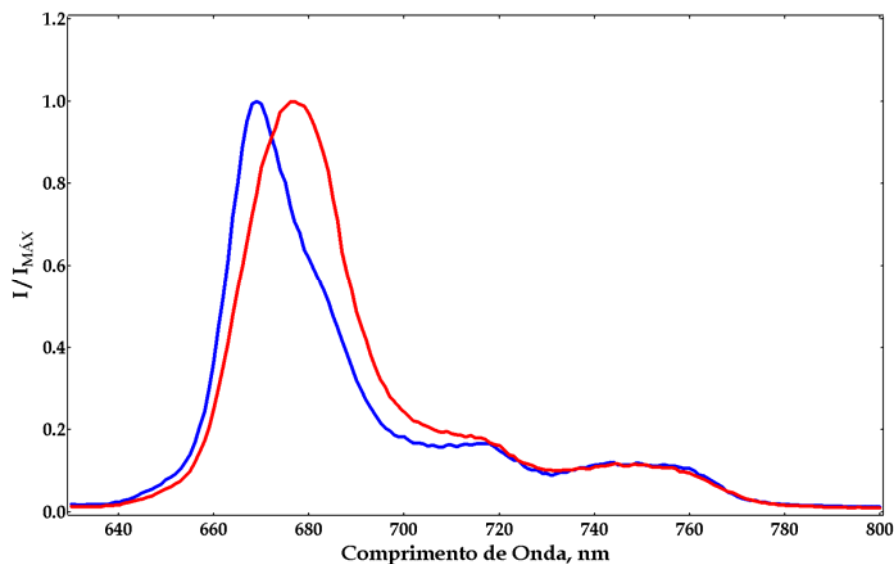
Ambiente	Máximos Espectrais (nm)			
	Soret	Q1	Q2	Q3
Etanol	339	604	640	667
DMSO/DMF 50% (v/v)	345	605	645	671
PC/colesterol/DDAB/LPC *	331	610	650	668
DPPE/colesterol/DDAB/LPC *	335	613	650	667

* razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04

O espectro de emissão de fluorescência para a ZnPc nos diferentes ambientes estudados pode ser visto na Figura IV.5. A posição dos máximos espectrais é dado na Tabela IV.3.



(A)



(B)

Figura IV.5. Espectro de emissão de fluorescência normalizado da ZnPc em (A) meio orgânico de (–) etanol e (–) DMSO/DMF 50% (v/v) e (B) lipossomas catiônicos de (–) DPPC/colesterol/DDAB/LPC e (–) PC/colesterol/DDAB/LPC, ambas formulações na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04).

Assim como a TMPyPH₂, a ZnPc possui seu espectro de emissão de fluorescência na região do vermelho do espectro eletromagnético. Além de alterações na posição dos máximos espectrais (ao redor de 670 nm), a incorporação

do fármaco em lipossomas proporciona uma melhor separação das bandas de emissão localizadas em comprimentos de onda maiores.

Tabela IV.3. Posição dos máximos espectrais da ZnPc em meio orgânico e lipossomas

Ambiente	Máximos Espectrais (nm)		
	F1	F2	F3
Etanol	673	—	739
DMSO/DMF 50% (v/v)	682	—	739
PC/colesterol/DDAB/LPC *	677	714	748
DPPC/colesterol/DDAB/LPC *	669	717	750

* Razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04

Outro fármaco estudado foi o Victoria Blue BO (VBBO). O VBBO pertence à classe dos triarilmetanos e tem se mostrado um fármaco fotossensível bastante promissor para a terapia fotodinâmica (VIOLA et al., 1996). O espectro de absorção para o fármaco é apresentado na Figura IV.6.

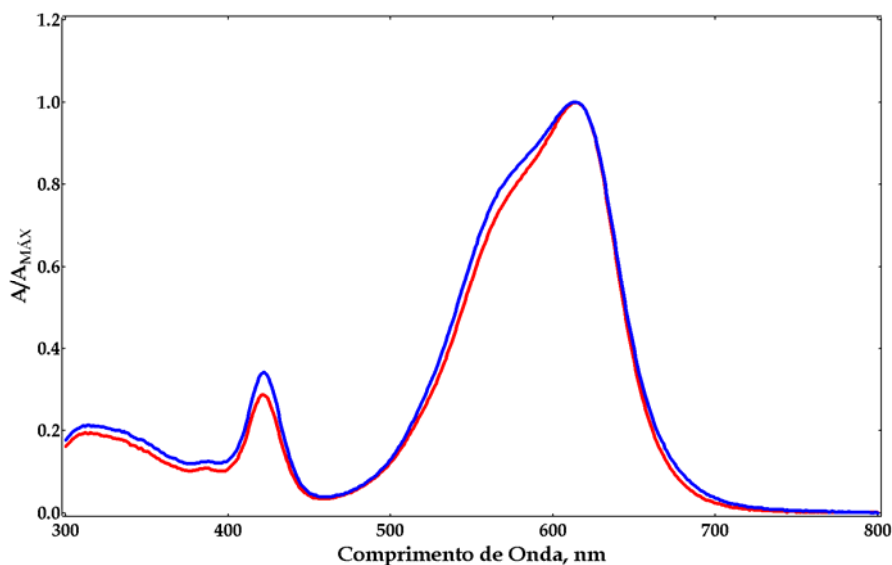


Figura IV.6: Espectro de absorção normalizado do VBBO em (—) água e (—) solução fisiológica.

O espectro de absorção do fármaco é caracterizado por uma intensa absorção na Janela Terapêutica, com máximo centrado em 614 nm. Em solução fisiológica, as bandas de absorção do VBBO se apresentam levemente alargadas com relação àquelas obtidas em água, indicando que a força iônica do meio pode induzir alterações nas suas propriedades fotofísicas.

A Figura IV.7 apresenta o espectro de emissão de fluorescência obtido para o fármaco em água. Não foram observadas variações significativas no espectro quando o VBBO foi dissolvido em solução fisiológica.

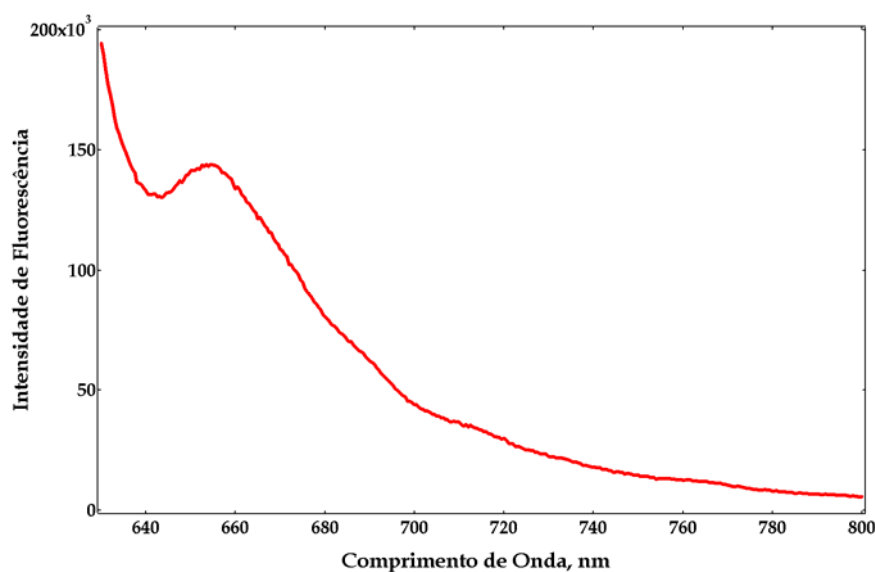


Figura IV.7: Espectro de emissão de fluorescência do VBBO $11,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água.

Os movimentos rotacionais dos anéis aromáticos dos triarilmetanos induzem o processo de relaxação não-radioativo (conversão interna) de seu estado singlete excitado. Conseqüentemente, estes compostos possuem um tempo de vida de estado singlete extremamente curto, na faixa de 1-5 ps (BARTLETT;INDIG, 1999; LEWIS;INDIG, 2002; NAGUIB;STEEL;YOUNG, 2001). Então, para a determinação do espectro de emissão de fluorescência do fármaco foi necessária a utilização de um espectrofluorímetro que possuísse uma fotomultiplicadora bastante sensível (Fluorolog-3 da Spex). A curva obtida é caracterizada por uma banda de emissão de fluorescência com máximo centrado em 654 nm.

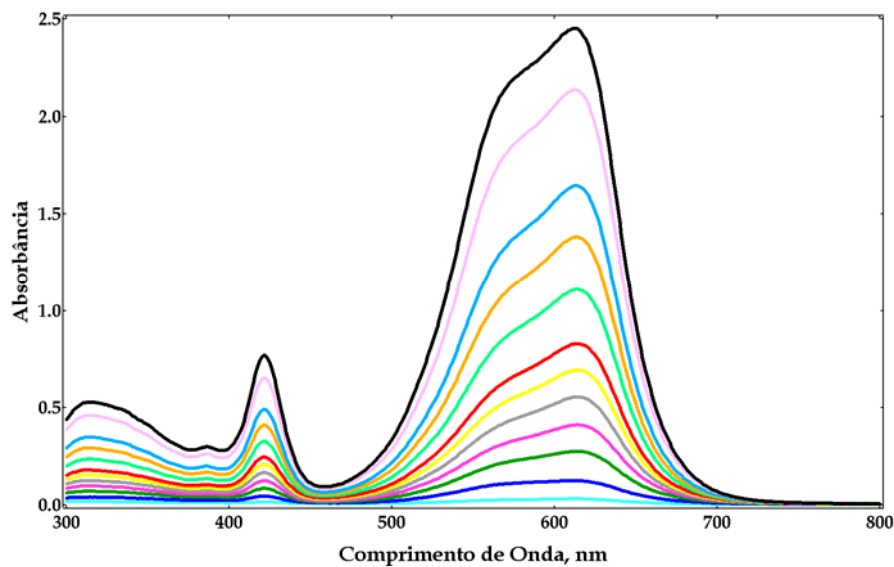
IV.2.2. Determinação da Constante de Dimerização

A formação de agregados é um importante parâmetro de investigação no processo de caracterização fotofísica de fármacos fotossensíveis. Embora alguns agregados diméricos e oligoméricos pareçam manifestar alguma atividade de localização preferencial nas células alvo (CUBEDDU et al., 1991; KESSEL;CHENG, 1991), a agregação altera (BORISSEVITCH et al., 1997; RODRIGUEZ;AWRUCH;DICELIO, 2002) a absorção óptica, diminui o tempo de vida do estado triplete e reduz o rendimento quântico de produção de oxigênio singlete pela dissipação da energia de excitação através do processo de conversão interna. Deste modo, o processo de agregação afeta o potencial dos fármacos como sondas biológicas bem como a eficiência destes nos ensaios fotodinâmicos.

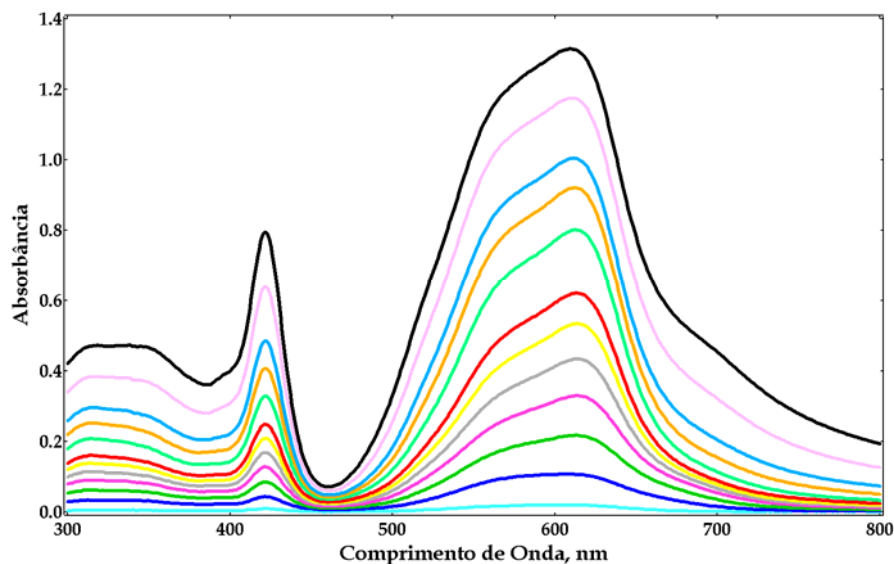
A constante de dimerização (K_D) é uma medida da tendência de formação de dímeros num dado ambiente. Inúmeros fatores têm sido propostos para explicar as forças que contribuem para a dimerização dos fármacos, tais como forças de van der Waals, interações carga-carga, interações hidrofóbicas ou o papel da água (NUNES, 1999).

Neste trabalho, a constante de dimerização foi determinada através da metodologia proposta por Brault e colaboradores (OULMI et al., 1998), que consiste em investigar o efeito da concentração do fármaco sobre seu espectro de absorção (OULMI et al., 1998) ou emissão de fluorescência (MARGALIT;SHAKLAI;COHEN, 1983; OULMI et al., 1998). Em nossos estudos, a dimerização de todos os fármacos utilizados foi acompanhada utilizando-se a espectroscopia de absorção. Para a TMPyPH₂ e para a ZnPc, entretanto, os valores de K_D apresentados foram obtidos em outros trabalhos anteriormente desenvolvidos pelo grupo (TMPyPH₂: (DE PAOLI, 2001); ZnPc (NUNES, 1999)).

A influência da concentração do VBBO sobre os seus espectros de absorção em água e solução fisiológica são apresentados na Figura IV.8.



(A)



(B)

Figura IV.8: Variação no espectro de absorção do VBBO com o aumento de sua concentração em (A) água e (B) solução fisiológica. A concentração do fármaco em solução ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) foi (—) 0,58; (—) 3,0; (—) 6,0; (—) 9,0; (—) 12,0; (—) 15,0; (—) 18,0; (—) 24,0; (—) 30,0; (—) 35,0; (—) 47,0; (—) 58,0.

Muitos fármacos tendem a formar agregados em solução aquosa. O aumento da força iônica do meio pela adição de um sal inerte, como NaCl por exemplo, contribui para a dimerização de monômeros carregados (KEMNITZ;SAKAGUCHI, 1992) pela redução da repulsão eletrostática entre estes

(KANO et al., 1987; KEMNITZ;SAKAGUCHI, 1992). A influência da força iônica sobre os espectros de absorção do VBBO é claramente apresentada na Figura IV.8. O aumento da concentração do fármaco em solução fisiológica induz variações menos significativas na absorbância da solução do que aquelas observadas em água, para a mesma faixa de concentração do triarilmetano. Além disso, diferentemente do comportamento observado em água, em solução fisiológica observa-se que o aumento da concentração do fármaco induz um aumento na absorbância registrada na faixa de 700 – 800 nm. Estas alterações são indicativas do favorecimento do processo de dimerização em solução fisiológica.

A formação de dímeros em solução pode ser expressa pelo equilíbrio (DIXON;STEULLET, 1998; MARGALIT;SHAKLAI;COHEN, 1983; OULMI et al., 1998):



em que K_D é a constante de dimerização dada por:

$$K_D = \frac{[D]}{[M]^2} \quad (\text{Equação 10}).$$

Aqui, $[D]$ e $[M]$ são as concentrações do dímero e do monômero, respectivamente, e a concentração total do fármaco pode ser expressa como (OULMI et al., 1998):

$$C = [M] + 2[D] \quad (\text{Equação 11})$$

A absorbância de uma solução em que o equilíbrio monômero-dímero foi estabelecido pode ser expressa por (OULMI et al., 1998):

$$A = (\varepsilon_M[M] + \varepsilon_D[D])\lambda \quad (\text{Equação 12})$$

na qual ε_M e ε_D são os coeficientes de absorvidade molar para o monômero e o dímero, respectivamente, e λ é o comprimento do caminho óptico. A partir das equações 4 e 5, as seguintes equações foram obtidas para o cálculo das concentrações do monômero e do dímero:

$$[M] = \frac{(-1 + \sqrt{1 + 8K_D C})}{4K_D} \quad (\text{Equação 13})$$

$$[D] = \frac{(-1 + 4K_D C - \sqrt{1 + 8K_D C})}{8K_D} \quad (\text{Equação 14}).$$

Estas equações, quando substituídas na Equação 12, fornecem:

$$A = \frac{\left\{ [1 - \sqrt{1 + 8K_D C}] \left[\frac{\varepsilon_D}{2} - \varepsilon_M \right] + 2\varepsilon_D K_D C \right\}}{4\lambda K_D} \quad (\text{Equação 15}),$$

que relaciona a absorvância da solução à concentração total de fármaco bem como à constante de dimerização. Conhecendo-se o ε_M , aqui assumido ser o coeficiente de absorvidade molar para o fármaco no ambiente de estudo, pôde-se empregar a Equação 15 para estimar o valor de ε_D e K_D para o fármaco. A análise da curva de absorção em função da concentração do fármaco (Figura IV.9) foi feita utilizando-se um programa desenvolvido no software Igor Pro, da Wavemetrics, Inc, no qual a regressão é baseada no algoritmo de Levenberg-Marquardt (MARQUARDT, 1963; OULMI et al., 1998).

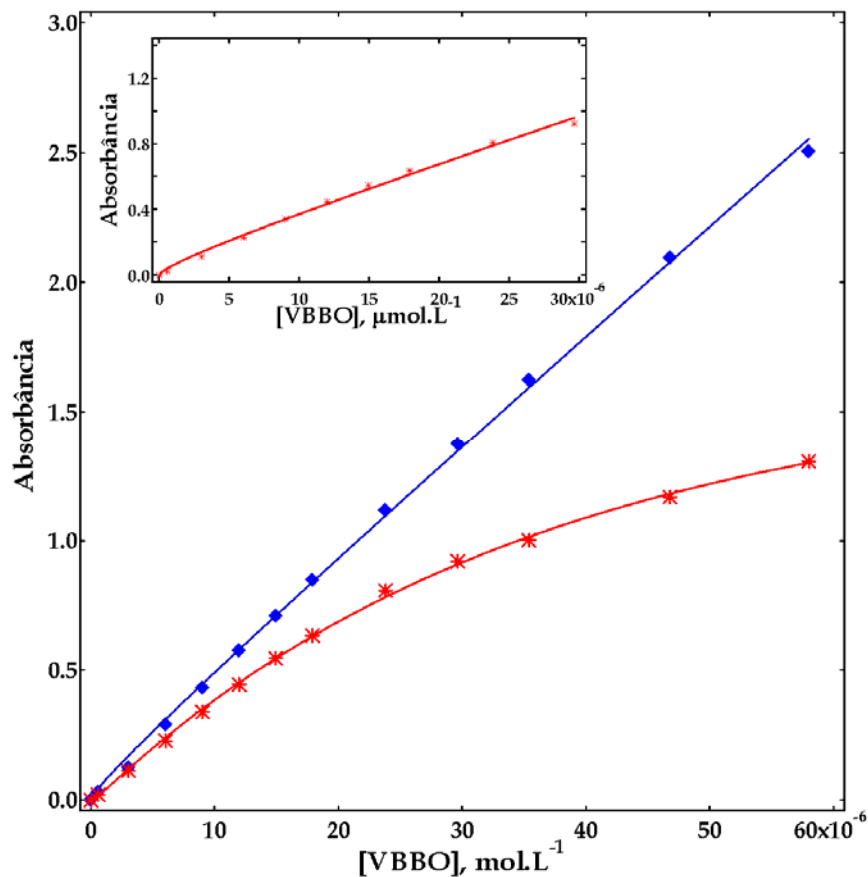


Figura IV.9: Determinação da constante de dimerização para o VBBO em (♦) água e (*) solução fisiológica. Inseto: Regressão utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt para o VBBO em solução fisiológica.

O aumento da concentração do VBBO em solução fisiológica acima de $30,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ induz um acentuado desvio da linearidade para as absorbâncias registradas, como pode ser visto na Figura IV.9. A regressão traçada utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt não forneceu um bom ajuste quando todos os pontos foram utilizados (o ajuste apresentado é descrito por uma função exponencial), provavelmente devido à existência de um equilíbrio envolvendo agregados maiores que o dímero. Desde que o formalismo apresentado não considera agregados maiores que o dímero, o ajuste utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt foi considerando-se as absorbâncias registradas até $30,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do fármaco (ver inserto na Figura IV.9).

Os resultados obtidos por esta metodologia para o VBBO são sumarizados na Tabela IV.4.

Tabela IV.4: Valores da constante de dimerização e dos coeficientes de absorvidade molar do monômero e do dímero para o VBBO

Ambiente	Absortividade Molar (L.mol ⁻¹)		K _D (L.mol ⁻¹)
	ε _M	ε _D	
<i>Água</i>	4,6x10 ⁴	4,0x10 ⁴	2,0x10 ⁴
<i>Solução Fisiológica</i>	4,2x10 ⁴	2,6x10 ⁴	9,7x10 ⁴

O valor de K_D encontrado para o VBBO em solução fisiológica é superior àquele encontrado para este fármaco em água, indicando que, como descrito anteriormente, a dimerização do VBBO é favorecida em um ambiente com maior força iônica. Também, em água, o ε_D para o triarilmetano tem um valor bastante próximo ao seu ε_M. Então, com o aumento da concentração do fármaco e, conseqüentemente, a concentração do dímero em solução, não se observa um desvio significativo da linearidade no gráfico obtido. Em solução fisiológica, ao contrário, o ε_D é bastante inferior ao seu ε_M e justifica o acentuado desvio da linearidade obtido no gráfico de absorbância em função da concentração para o fármaco neste meio.

Como anteriormente mencionado, para os demais fármacos utilizados neste trabalho, a constante de dimerização foi determinada em trabalhos anteriormente desenvolvidos. Os valores obtidos são apresentados na Tabela IV.5.

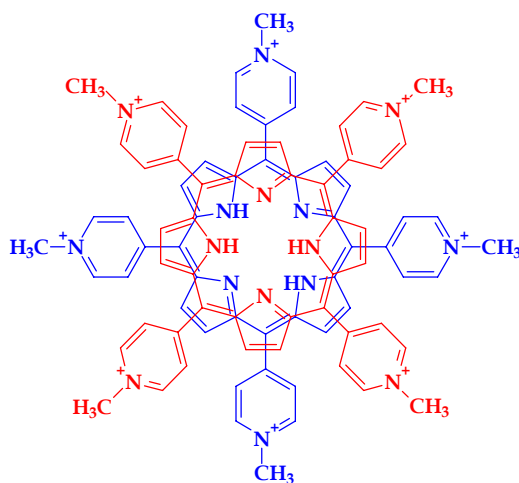
Tabela IV.5: Valores da constante de dimerização e dos coeficientes de absorvidade molar do monômero e do dímero para TMPyPH₂ e ZnPc

Fármaco	Ambiente	Absorvidade Molar (L.mol ⁻¹)		K _D (L.mol ⁻¹)
		ε _M	ε _D	
TMPyPH ₂ *	Água	2,00x10 ⁵	1,76x10 ⁵	1,44x10 ⁵
	Tampão Fosfato Salino	2,02x10 ⁵	1,73x10 ⁵	1,43x10 ⁵
ZnPc **	Piridina	2,41x10 ⁵	—	3,6x10 ⁴
	Lipossomas de DMPC	2,41x10 ⁵	—	1,0x10 ⁵

*(DE PAOLI, 2001)

** (NUNES, 1999)

Vários pesquisadores têm investigado o processo de dimerização da TMPyPH₂ e os resultados obtidos têm sido interpretados de maneira controversa (VERGELDT et al., 1995). Embora alguns autores tenham interpretado resultados obtidos por diferentes técnicas como evidência de que a porfirina não possui tendência a formar agregados em solução aquosa (DIXON; STEULLET, 1998; KADISH; MAIYA; ARAULLO-MCADAMS, 1991; PASTERNAK et al., 1972; PASTERNAK et al., 1985), para Kano e colaboradores (KANO et al., 1987; KANO; TAKEI; HASHIMOTO, 1990) a TMPyPH₂ existe como dímero em solução aquosa a concentrações inferiores a 2x10⁻⁷ mol.L⁻¹. A estrutura proposta pelo autor para o dímero é apresentada no Esquema IV.1.



Esquema IV.1: Estrutura proposta para o dímero da TMPyPH₂.

Kemnitz e Sakaguchi (KEMNITZ;SAKAGUCHI, 1992) determinaram, com base na análise de curvas de decaimento de fluorescência, parâmetros termodinâmicos para o processo de dimerização da TMPyPH₂. Os autores obtiveram valores de +0,15 eV e $\pm 13,4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, respectivamente, para a entalpia e para a entropia de dimerização deste fármaco em água, indicando que o seu processo de dimerização é entropicamente favorecido. A constante de dimerização determinada por estes mesmos pesquisadores é de $1,3 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ em água e está em acordo com o valor apresentado na Tabela IV.5.

A proximidade entre os valores de K_D obtidos para a TMPyPH₂ em água e em tampão fosfato salino (Tabela IV.5) indica que, diferentemente do observado para o VBBO, o aumento da força iônica do meio não possui um efeito significativo sobre o processo de dimerização da porfirina.

A ZnPc também possui uma forte tendência a formar agregados em solução, como indicado pelos dados da Tabela IV.5. Os dados mostram que a constante de dimerização para o fármaco é maior em lipossomas de DMPC do que aquela obtida em meio homogêneo. A alta solubilidade da ftalocianina de zinco em piridina justifica a menor tendência à dimerização encontrada neste meio.

Fármacos hidrofóbicos, como ZnPc utilizada neste projeto, tendem a se acumular na bicamada lipídica de lipossomas. Aqui, dependendo da concentração do fármaco, o número de moléculas confinadas em cada uma das partículas do lipossoma pode ser bastante grande. Isto resulta em várias interações intermoleculares entre estas moléculas e pode contribuir para o seu processo de dimerização (DHAMI;PHILLIPS, 1996).

IV.2.3. Determinação do Rendimento Quântico de Fluorescência

Após a absorção de um fóton de luz, uma molécula no estado fundamental (S_0) passa a ocupar estados singletes mais energéticos (S_n), de onde pode retornar para o estado fundamental por vários processos. A fluorescência é um processo radioativo no qual uma molécula excitada, no estado singlete, perde a energia absorvida na forma de luz.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) pode ser definido como {Lakowicz, 1984 259 /id; Turro, 1978 125 /id}:

$$\Phi_F = \frac{\text{n}^\circ \text{ de moléculas fluorescentes por unidade de tempo por unidade de volume}}{\text{n}^\circ \text{ de quanta absorvidos por unidade de tempo por unidade de volume}}$$

(Equação 16)

Desde que o número de moléculas é, em princípio, equivalente ao número de fótons absorvidos, esta propriedade fotofísica informa a relação entre a quantidade de moléculas que efetivamente fluorescem (n_F) e as moléculas que foram eletronicamente excitadas (N_{EXC}),

$$\Phi_F = \frac{n_F}{N_{EXC}}$$

(Equação 17).

O método mais comumente empregado para a determinação do rendimento quântico de fluorescência é o método relativo (DEMAS;CROSBY, 1971; GANTCHEV;VAN LIER, 1995), que faz uso da equação fornecida por Demas e Crosby (DEMAS;CROSBY, 1971):

$$\Phi_{F\text{-amostra}} = \left(\frac{\text{Área}_{\text{amostra}}}{\text{Área}_{\text{padrão}}} \right) \times \left(\frac{\text{Absorbância}_{\text{padrão}}}{\text{Absorbância}_{\text{amostra}}} \right) \times \left(\frac{n_{\text{amostra}}}{n_{\text{padrão}}} \right) \times \Phi_{F\text{-padrão}}$$

(Equação 18)

em que n é o índice de refração e a Área é calculada a partir do espectro de emissão de fluorescência corrigido. A correção do espectro de emissão é necessária, neste caso, porque permite determinar o verdadeiro formato das bandas de emissão (EATON, 1988). O fator $\frac{n_{\text{amostra}}}{n_{\text{padrão}}}$ é uma correção do índice de

refração, que é necessária porque conforme a radiação passa da solução para o ar, ou seja, de uma região com um índice de refração alto para uma região com índice

de refração baixo, a sua intensidade muda. Uma outra razão é que pode ocorrer reflexão interna dentro da cubeta. Assim, a correção do índice de refração quando solventes diferentes são usados para a amostra e para o padrão é fundamental na prevenção de erros no cálculo de Φ_F (DEMAS;CROSBY, 1971; EATON, 1988).

O rendimento quântico de fluorescência da ZnPc incorporada nos sistemas de liberação foi determinada utilizando-se uma solução deste mesmo fármaco em etanol como padrão. Os espectros de emissão de fluorescência corrigida são apresentados na Figura IV.10. A correção do espectro de emissão de fluorescência contribui para uma melhor definição das bandas de emissão do fármaco nos diferentes ambientes.

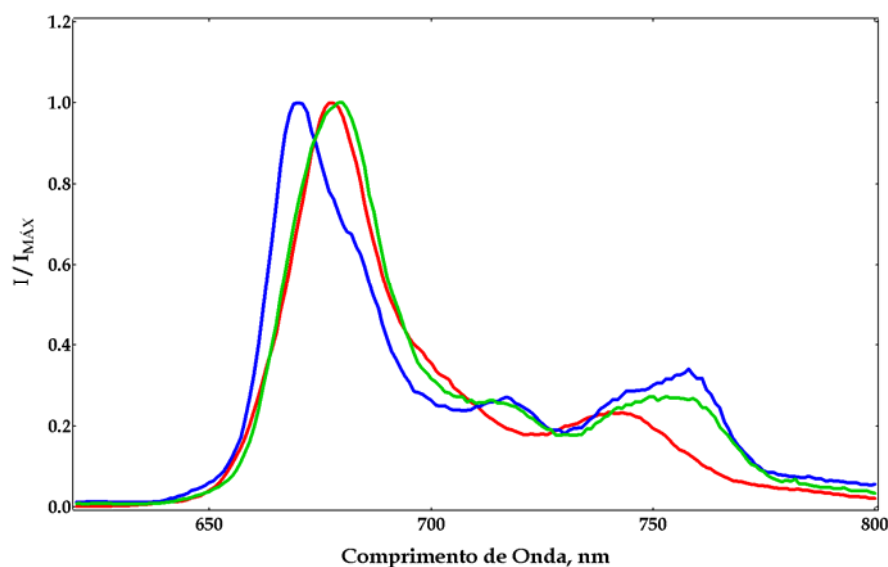


Figura IV.10. Espectro de emissão de fluorescência corrigido normalizado para a ZnPc em (-) etanol e lipossomas de (-) DPPC/colesterol/DDAB/LPC e (-) PC/colesterol/DDAB/LPC.

Os valores de Φ_F obtidos podem ser visualizados na Tabela IV.6. Para os cálculos, foi assumido que o índice de refração para a suspensão lipossomal é de 1 (um).

Tabela IV.6: Rendimentos quânticos de fluorescência da ZnPc em diferentes meios

AMBIENTE	Φ_F
Etanol	$0,28 \pm 0,01^*$
DPPC/colesterol/DDAB/LPC**	$0,30 \pm 0,04$
PC/colesterol/DDAB/LPC**	$0,31 \pm 0,03$

* Determinado por Nunes (NUNES, 1999) relativamente ao Violeta de Cresila.

** Razão molar de lipídio é 1,0/0,45/0,34/0,04

Os resultados obtidos demonstram que não houve variação significativa no valor de Φ_F com a incorporação do fármaco em meio lipossomal. Isto indica que, possivelmente, as propriedades fotofísicas relacionadas ao primeiro estado singlete da ZnPc não são afetadas pelo processo de incorporação. Embora os valores de Φ_F apresentados indiquem que a ftalocianina de zinco seja um fluoróforo de eficiência moderada, os dados sugerem também que, após excitação, o fármaco pode eficientemente apresentar o cruzamento intersistemas e, assim, produzir o seu estado triplete excitado em concentração suficiente para produção de espécies reativas de oxigênio. Desde que a produção das espécies reativas que atuam no processo de dano oxidativo é dependente da concentração do fármaco no seu estado excitado triplete, a ftalocianina de zinco deve ser eficiente na foto-erradicação de *E. coli* e *S. aureus* quando incorporada em seus sistemas de liberação.

A TMPyPH₂ tem sido empregada em vários ensaios fotodinâmicos e, por essa razão, a determinação de suas propriedade fotofísicas são importantes para a compreensão da eficiência do fármaco nos estudos foto-oxidativos.

Como anteriormente mencionado, a determinação do Φ_F para a TMPyPH₂ foram realizadas em trabalhos anteriores (DE PAOLI et al., 2002; KALYANASUNDARAM, 1984; LANG et al., 2001). Em nossos estudos, o composto padrão utilizado na determinação do Φ_F para a porfirina foi o violeta de cresila em metanol ($\Phi_F = 0,54$) (EATON, 1988; MAGDE et al., 1979). A Figura IV.11 apresenta os espectros característicos para a absorção e emissão de fluorescência corrigida para este composto.

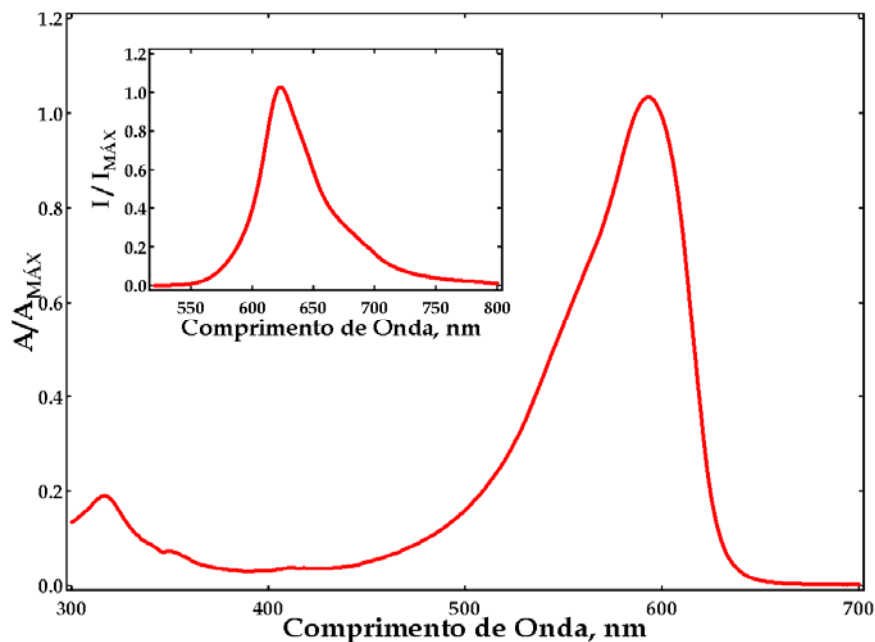


Figura IV.11: Espectros de absorção e emissão de fluorescência (inserto) normalizado do violeta de cresila em metanol.

O Φ_F determinado foi de $0,052 \pm 0,001$ e $0,050 \pm 0,001$ para o fármaco em água e tampão fosfato salino, respectivamente (DE PAOLI, 2001). Estes pequenos valores obtidos demonstram que a TMPyPH₂ não é um bom fluoróforo. Isto indica que, uma vez excitada, a porfirina retorna ao estado fundamental utilizando caminhos diferentes da emissão de fluorescência. Como para a ZnPc, os dados apontam para a eficiência da porfirina no processo de cruzamento intersistemas e, assim, sua eficiência nos estudos de fotodinâmicos para a erradicação dos microorganismos trabalhados.

O VBBO, por sua vez, é um composto da segunda geração de fármacos fotossensíveis que, neste trabalho, foi também utilizado nos estudos de erradicação fotodinâmica de *E. coli* e *S. aureus*. O rendimento quântico de fluorescência para este fármaco não foi estimado por ausência de aparelhagem adequada. Entretanto, de acordo com a literatura (BARTLETT;INDIG, 1999; LEWIS;INDIG, 2002; NAGUIB;STEEL;YOUNG, 2001), o rendimento quântico de fluorescência dos triarilmetanos é da ordem de 10^{-5} . Isto ocorre porque, como anteriormente mencionado, os movimentos rotacionais dos anéis aromáticos dos

triarilmetanos induzem o processo de relaxação não-radioativo de seu estado singlete excitado. A conversão interna é o modo preferencial de desativação do estado excitado singlete do fármaco.

IV.2.4. Determinação dos Espectros de Absorção e Tempo de Vida do Transiente

Desde que o estado excitado singlete possui um tempo de vida curto (nanossegundos), o processo de fotossensibilização em sistemas biológicos parece envolver principalmente o primeiro estado excitado triplete (T_1) do fármaco fotossensível (Spikes, 1977), cujo tempo de vida associado é da ordem de microssegundos. O estado excitado triplete é formado através do processo de cruzamento intersistemas após a excitação da amostra.

Para a determinação do espectro de absorção do transiente e do tempo de vida da espécie triplete dos fármacos fotossensíveis estudados, empregou-se a técnica de fotólise por pulso de laser. Esta técnica foi introduzida em 1949 (NORRICH;POTTER, 1949) como uma ferramenta poderosa para estudar os efeitos físico-químicos iniciais da luz sob a matéria. O princípio da fotólise por pulso de laser consiste na excitação de uma amostra por um pulso rápido de luz de alta intensidade num intervalo de tempo da ordem de nanossegundos. Nestas condições, formam-se espécies excitadas ou diferentes tipos de transientes (estados eletronicamente excitados, radicais, birradicais, carbenos, íons radicais ou carbocátions estáveis) em altas concentrações. O equipamento utilizado nestes experimentos permite a obtenção simultânea do espectro de absorção do transiente e a cinética de decaimento da espécie transiente em um dado comprimento de onda.

O espectro de absorção do transiente para a ZnPc em meio orgânico e lipossomas é apresentado na Figura IV.12.

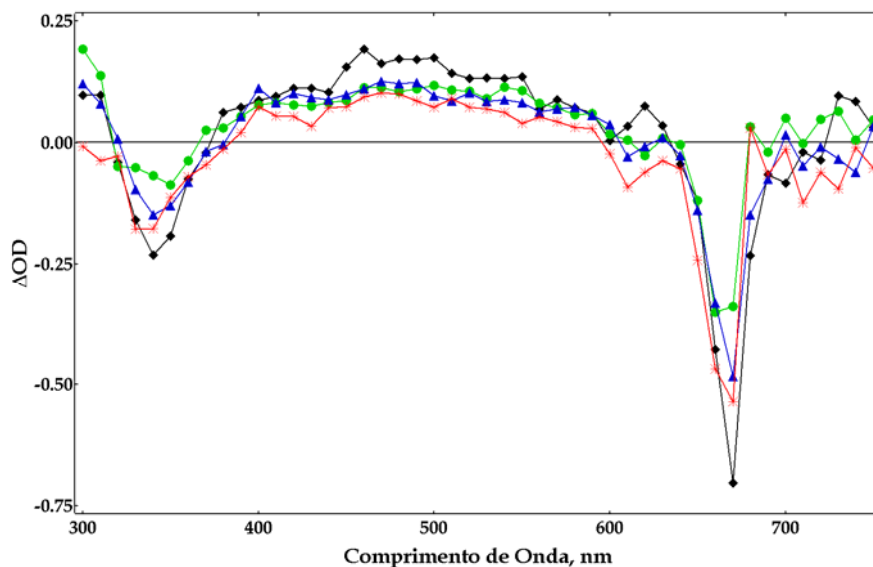


Figura IV.12: Espectro de absorção do transiente da ZnPc em (◆) etanol, (✱) DMSO/DMF 50% (v/v) e lipossomas de (●) de DPPC/colesterol/DDAB/LPC e (▲) PC/colesterol/DDAB/LPC, ambas formulações com a razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04. As leituras de absorção do transiente foram determinadas 9 ns após o pulso de excitação do laser.

As leituras de absorção do transiente foram determinadas 9 (nove) ns após o pulso de excitação do laser. As curvas de absorção obtidas são bem definidas e mostram uma absorção máxima do transiente centrada em 470 nm, correspondente a transições entre o estado triplete de menor energia (T_1) e estados tripletes de maior energia (T_n). Podem-se observar, também, faixas de comprimentos de onda em que a absorção do transiente registrada é negativa. A posição destas bandas (340 e 670 nm, respectivamente) é equivalente à posição das bandas Soret e Q da ftalocianina de zinco no estado fundamental e está relacionada à diminuição da densidade eletrônica do fármaco no seu estado fundamental.

O comprimento de onda de máxima absorção do fármaco foi utilizado para monitorar o decaimento absorção da espécie triplete gerada em função do tempo. O perfil cinético obtido para a ZnPc em etanol pode ser visto na Figura IV.13. O perfil obtido para os demais ambientes estudados é semelhante ao apresentado nesta Figura. A análise dos dados com o software do próprio equipamento

permitiu a determinação dos tempos de vida para o transiente nos diferentes meios. A Tabela IV.7 apresenta os resultados obtidos.

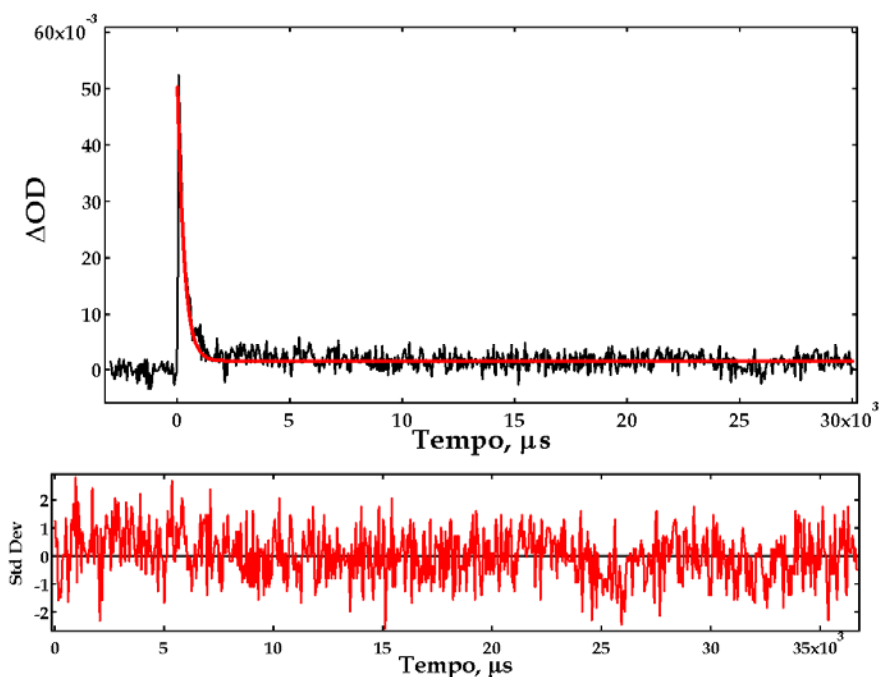


Figura IV.13: Decaimento do transiente da ZnPc em etanol. O sinal do transiente foi detectado 9 ns após o pulso de excitação do laser.

Tabela IV.7: Tempo de vida do transiente da ZnPc em meio orgânico e lipossomas

AMBIENTE	τ_T (μs)
Etanol	$0,30 \pm 0,01$
DMSO/DMF 50% (v/v)	$0,42 \pm 0,06$
DPPC/colesterol/DDAB/LPC *	$5,7 \pm 0,33$
PC/colesterol/DDAB/LPC *	$2,3 \pm 0,12$

* Razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04.

Observa-se, pelos dados da Tabela, que o processo de incorporação em lipossomas aumenta o tempo de vida do estado triplete da ZnPc. Quanto maior o tempo de permanência do fármaco no estado excitado triplete, maior é a probabilidade de interação do fármaco com outras moléculas e, assim, a probabilidade de produção de espécies reativas de oxigênio responsáveis pelo

dano oxidativo às células vivas. É conhecido que, além de sua eficácia na produção de oxigênio singlete, a ZnPc é capaz de atuar através do mecanismo Tipo I (HADJUR et al., 1997), produzindo o ânion radical superóxido e o radical hidroxila. (HADJUR et al., 1997; MAREE;KUZNETSOVA;NYOKONG, 2001). Desde que estes radicais são altamente danosos para os sistemas biológicos, a produção destas espécies demonstra a eficiência ftalocianina de zinco nos processos de foto-oxidação.

Vários trabalhos encontrados na literatura têm apresentado resultados da caracterização fotofísica do estado excitado triplete da TMPyPH₂ em diferentes meios (BONNET et al., 1982; CHIRVONY et al., 1997; KRUK et al., 1998a; KRUK et al., 1998b). A Figura IV.14 apresenta o espectro de absorção da porfirina TMPyPH₂ em água (DE PAOLI, 2001). O perfil obtido para o fármaco em tampão fosfato salino se sobrepõe à curva apresentada.

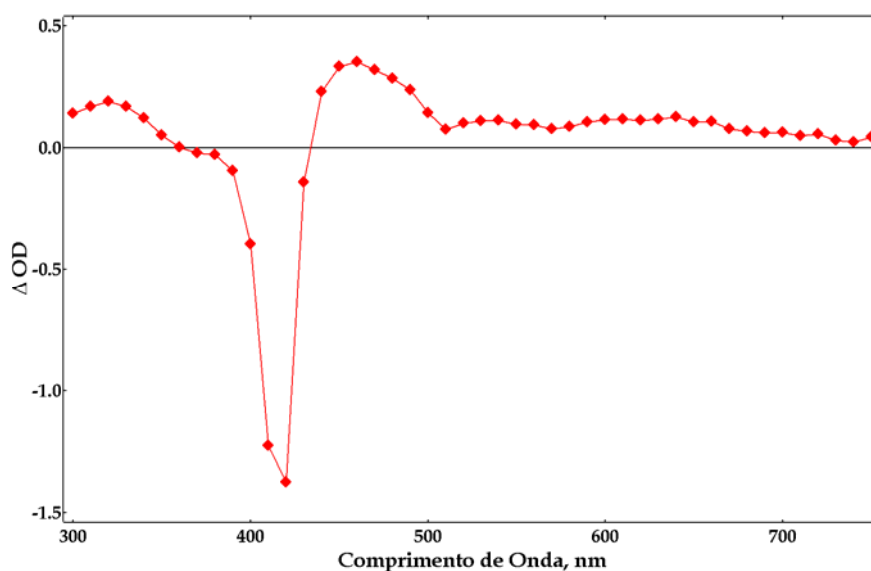


Figura IV.14: Espectro de absorção do transiente da TMPyPH₂ em água. As leituras de absorção do transiente foram determinadas 13 ns após o pulso de excitação do laser.

A curva obtida é bem definida e pode ser caracterizada por um máximo de absorção triplete centrada em 470 nm, além da banda de absorção do transiente negativa (centrada em 420 nm), devido à diminuição da população eletrônica do fármaco no seu estado fundamental na região da banda Soret.

A análise do decaimento da espécie triplete gerada para a porfirina forneceu valores de τ_T de $2,27 \pm 0,01$ e $2,19 \pm 0,01$ μs em água e tampão fosfato salino, respectivamente (DE PAOLI, 2001). Este tempo de permanência no estado triplete é longo o suficiente para permitir a produção das espécies reativas de oxigênio responsáveis pelo dano oxidativo às células vivas.

Para o VBBO, a caracterização do estado excitado triplete foi feita em água. Após a excitação da amostra, foi detectado o sinal de uma espécie transiente em 410 nm. O perfil cinético do decaimento é apresentado na Figura IV.15.

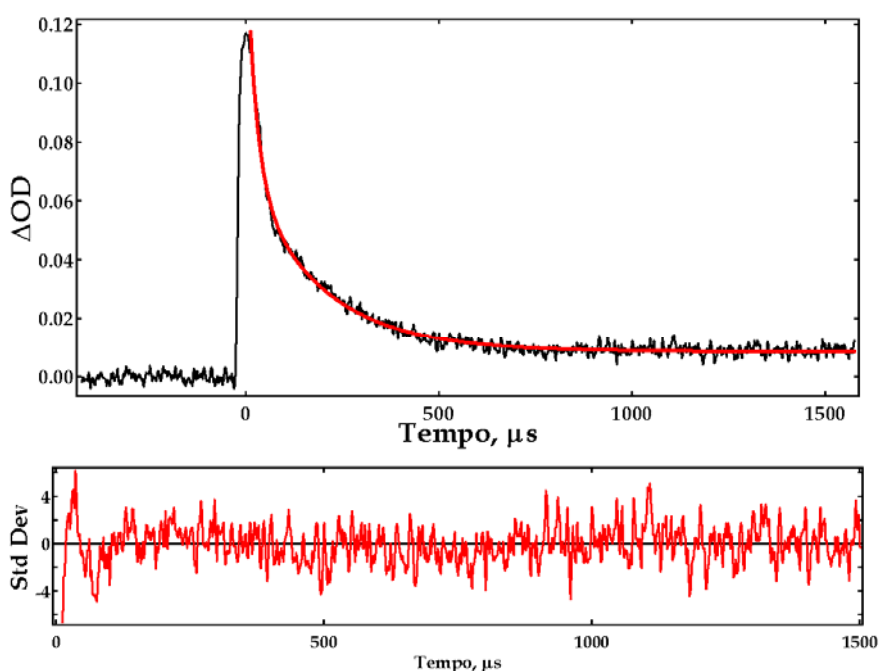


Figura IV.15: Decaimento do transiente VBBO em água. O sinal do transiente foi detectado 9 ns após o pulso de excitação do laser.

O tempo de vida associado ao decaimento registrado foi $0,14 \pm 0,02$ μs . Este τ_T é da mesma ordem de grandeza daquele obtido para a ZnPc em meio orgânico. Este resultado pressupõe a habilidade do fármaco em interagir com biomoléculas no estado excitado triplete e, assim, produzir espécies reativas de oxigênio que mediam a sua ação fotodinâmica. Julliard e colaboradores (VIOLA et al., 1996) determinaram que o VBBO atua de acordo com o mecanismo Tipo I de

fotossensibilização, ou seja, a produção do ânion radical superóxido e do radical hidroxila.

Embora tenhamos detectado o sinal da espécie transiente do VBBO, não foi possível determinar claramente o espectro de absorção do transiente deste fármaco após sua excitação com um sistema laser no comprimento de onda de 355 nm. Indig e colaboradores (BAPTISTA;INDIG, 1998; BARTLETT;INDIG, 1999) também não conseguiram caracterizar claramente a formação de triplete ou radical livre de triarilmetanos em solução aquosa quando irradiados com laser em 532 nm. Estas observações são indicativas de que o processo de cruzamento intersistemas não compete significativamente com os processos não radiativos de relaxação a partir do primeiro estado singlete excitado dos triarilmetanos para o estado fundamental. Entretanto, em meios mais viscosos que a água ou em microambientes que dificultam o processo de relaxação, o processo de cruzamento intersistemas torna-se mais competitivo e a foto-reatividade do fármaco tende a aumentar (BAPTISTA;INDIG, 1998). Acredita-se que a associação do VBBO com as células de *E. coli* e *S. aureus* contribua para o aumento da foto-reatividade deste fármaco, de forma a observar-se uma morte foto-induzida eficiente destes microorganismos. Tal comportamento foi observado anteriormente para o Cristal Violeta, um análogo estrutural do VBBO (WAINWRIGHT, 1998).

IV.2.5. Determinação do Rendimento Quântico de Formação do Estado Triplete

Vários são os processos que podem ocorrer com uma molécula quando esta absorve radiação e passa a popular o estado singlete excitado (S_n). O cruzamento intersistemas é o processo em que as moléculas do fármaco sofrem a inversão do spin de um de seus elétrons e passam a popular o seu estado excitado triplete (T_n). A eficiência deste processo é dada pelo rendimento quântico de formação do estado excitado triplete (Φ_T) do fármaco. O Φ_T fornece, portanto, uma estimativa da concentração das moléculas do fármaco no estado triplete após a excitação. Desde que a ação fotodinâmica é diretamente dependente da interação dos

fármacos neste estado excitado com substratos biológicos ou com o oxigênio molecular (Mecanismos I e II de fotossensibilização), é importante que o estado triplete seja produzido em alta concentração; portanto, o Φ_T é um importante parâmetro fotofísico a ser determinado.

Vários são os métodos disponíveis para a determinação do rendimento quântico de formação do estado triplete (AMAND;BENSASSON, 1975). Neste trabalho, o Φ_T foi determinado utilizando-se a técnica de flash fotólise a laser. A determinação de Φ_T para a TMPyPH₂ e para a ZnPc foi feita empregando-se o Feoforbide-a como composto de referência ($\Phi_T = 0,65$ em benzeno) (YANG et al., 2000). O fármaco VBBO não teve o Φ_T determinado porque, como descrito no item anterior, não foi possível determinar o espectro de absorção do transiente do triarilmetano.

O cálculo de Φ_T tem início com a determinação do espectro real do estado triplete e o coeficiente de absorvidade molar no estado triplete excitado (ϵ_T) para os fármacos fotossensíveis no comprimento de onda de máxima absorção de seus transientes (460 nm para o Feoforbide-a, 470 nm para a porfirina e 480 nm para a ftalocianina de zinco). As leituras de absorção do transiente foram determinadas 13 ns e 9 ns, respectivamente, após o pulso de excitação do laser para a TMPyPH₂ e para os demais fármacos.

Como descrito anteriormente, o espectro de absorção do transiente registrado é caracterizado por faixas de comprimentos de onda com absorção menor do que zero (absorção negativa) como resultado da absorção do fármaco no estado fundamental. Entretanto, é possível determinar o espectro real do transiente dos fármacos ($\Delta A(t)$) corrigindo-se a absorção triplete registrada através da equação:

$$\Delta A(t) = A_T + \alpha A_F \quad (\text{Equação 5; Item III.3.2.5. da Seção Experimental}).$$

O valor de $\alpha(t)$ é a razão entre o número de moléculas no estado triplete e a concentração total de moléculas num tempo t:

$$\alpha(t) = \frac{C_T(t)}{C} \quad (\text{Equação 19}).$$

O α é um número positivo e menor do que 1 (um) e pode ser estimado pela razão entre o valor da absorbância no ponto mais negativo do espectro de absorção do transiente e a absorbância no estado fundamental. Os valores de α determinados foram 0,11 para o Feoforbide-a, 0,16 para a TMPyPH₂ e 0,35 para a ZnPc. As Figuras IV.16 - IV.18 apresentam o espectro de absorção no estado fundamental, bem como os espectros de absorção do triplete registrado e corrigido para todos os fármacos.

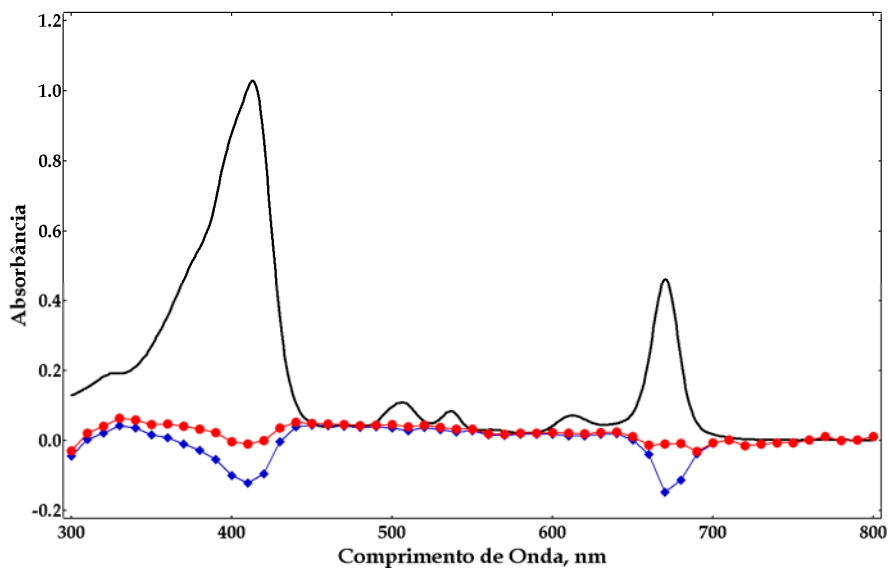


Figura IV.16: Espectros de (–) absorção no estado fundamental, (♦) absorção do transiente e (●) absorção do transiente corrigido $\Delta A(t)$ para o Feoforbide-a em benzeno.

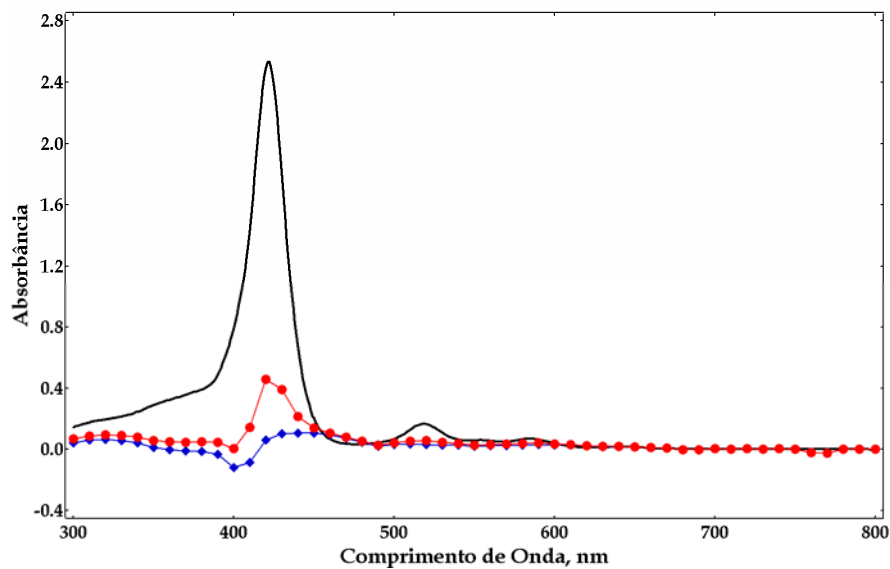


Figura IV.17: Espectros de (–) absorção no estado fundamental, (♦) absorção do transiente e (●) absorção do transiente corrigido ($\Delta A(t)$) para a TMPyPH₂ em água.

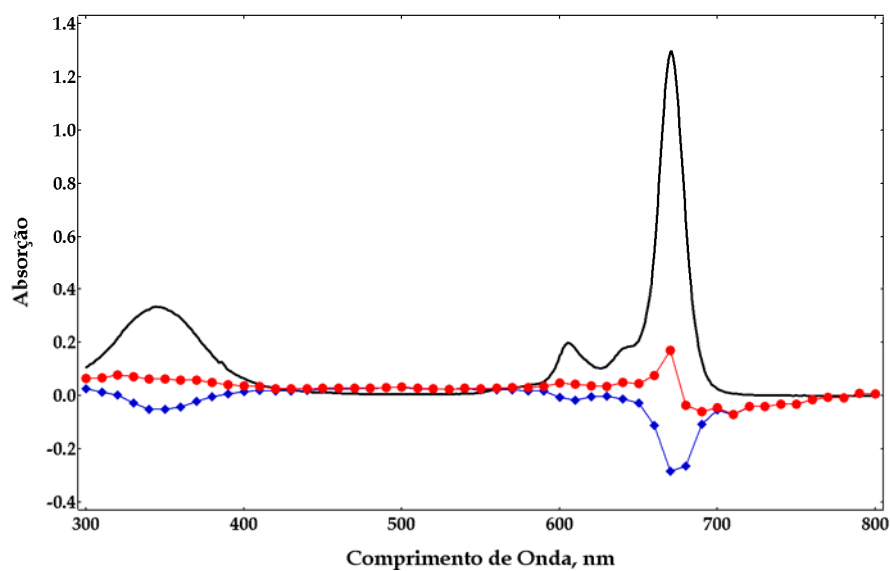


Figura IV.18: Espectros de (–) absorção no estado fundamental, (♦) absorção do transiente e (●) absorção do transiente corrigido ($\Delta A(t)$) para a ZnPc em DMSO/DMF 50% (v/v).

Uma vez que o valor de α é conhecido, o coeficiente de absorvidade molar no estado triplete excitado (ϵ_T) para um fármaco num dado comprimento de onda (λ) pode ser calculado de acordo com a equação:

$$\frac{\varepsilon_T(\lambda)}{\varepsilon_F(\lambda)} = \frac{A_T(\lambda)}{\alpha A_F(\lambda)} \quad (\text{Equação 6; item III.3.2.5. da Parte Experimental}).$$

O conhecimento de ε_T é fundamental para a determinação do Φ_T e os valores calculados para os fármacos fotossensíveis são apresentados na Tabela IV.8.

Tabela IV.8: Coeficiente de Absortividade Molar do estado excitado triplete para os fármacos fotossensíveis

Fármaco	Ambiente	ε_T (L. mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
Feoforbide-a	Benzeno	7,40x10 ⁴
TMPyPH ₂	Água	7,90x10 ⁴
ZnPc	DMSO/DMF 50% (v/v)	2,80x10 ⁴

O coeficiente de absorvidade molar do estado triplete obtido para o Feoforbide-a está bastante próximo daquele reportado na literatura (7,59 L.mol⁻¹.cm⁻¹) (YANG et al., 2000).

A absorção do transiente dos fármacos é dependente da energia utilizada para a excitação da amostra. Os decaimentos dos transientes gerados para os fármacos fotossensíveis no comprimento de onda de máxima absorção triplete foram registrados como uma função da energia de excitação crescente. A absorbância máxima do transiente cresce linearmente com o aumento da energia de excitação e, conseqüentemente, cresce também a concentração das moléculas do fármaco no estado triplete excitado. Assim, a inclinação da reta obtida está relacionada ao coeficiente de absorvidade molar e ao rendimento quântico de formação do estado triplete. Então, conhecendo-se o ΔA para a amostra e para o fármaco padrão, é possível calcular o Φ_T através da equação:

$$\frac{\Delta A_{\text{amostra}}}{\Delta A_{\text{padrão}}} = \frac{\Phi_{T_amostra} (\varepsilon_T - \varepsilon_F)_{\text{amostra}}}{\Phi_{T_padrão} (\varepsilon_T - \varepsilon_F)_{\text{padrão}}} \quad (\text{Equação 20})$$

Desde que os fármacos no estado fundamental não absorvem radiação no comprimento de onda de máxima absorção do estado triplete excitado (460 nm para o Feoforbide-a, 470 nm para a TMPyPH₂ e 480 nm para a ZnPc), o ϵ_F nestes comprimentos de onda tende a zero e a Equação 20 pode ser re-escrita como:

$$\frac{\Delta A_{\text{amostra}}}{\Delta A_{\text{padrão}}} = \frac{\Phi_T_{\text{amostra}} (\epsilon_T)_{\text{amostra}}}{\Phi_T_{\text{padrão}} (\epsilon_T)_{\text{padrão}}} \quad (\text{Equação 21}).$$

A Tabela IV.9 apresenta os valores de ΔA e Φ_T para o Feoforbide-a e para a TMPyPH₂ e ZnPc nos seus ambientes de estudo. Os valores de ϵ_T empregados foram listados na Tabela IV.8.

Tabela IV.9: Rendimento quântico de formação do estado triplete excitado para os fármacos fotossensíveis

Fármaco	Ambiente	ΔA	Φ_T
Feoforbide-a *	Benzeno	0,46	0,65
TMPyPH ₂	Água	0,60	0,79
ZnPc	DMSO/DMF 50% (v/v)	0,17	0,63

* utilizado como composto padrão (YANG et al., 2000).

Para a porfirina, os valores de Φ_T encontrados na literatura encontram-se na faixa de 0,73 - 0,89 (KRUK et al., 1998a; LANG et al., 2001; REDDI et al., 2002); Para a ZnPc, o valor de Φ_T publicado é de 0,67 (NYMAN;HYNNINEN, 2004). Em ambos os casos, os valores de rendimento quântico de formação do estado triplete encontrados são bastante próximos aos valores apresentados na Tabela IV.9. e indicam que, após excitação, o estado excitado triplete destes fármacos está sendo produzido com alta eficiência. Os resultados indicam, portanto, que os fármacos devem ser hábeis no desencadeamento dos mecanismos de fotossensibilização responsáveis pelo dano fotodinâmico.

IV.2.6. Determinação do Rendimento Quântico de Produção do Oxigênio Singlete

O oxigênio singlete, a forma reativa do oxigênio molecular, é produzido pela inversão de spin de um elétron do orbital mais externo da molécula (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001). O $^1\text{O}_2$ é um poderoso oxidante e, dada a sua capacidade de reação com vários tipos de tipos de biomolécula, desenvolve um importante papel em processos oxidativos em sistemas biológicos (NIEDRE;PATTERSON;WILSON, 2002; NYMAN;HYNNINEN, 2004; SPILLER et al., 1998). O oxigênio singlete é apontado como o principal responsável pela morte celular durante o dano celular foto-induzido contra células e bactérias (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004; STERNBERG;DOLPHIN, 1998). Por essa razão, o rendimento quântico de produção do oxigênio singlete é um parâmetro fotofísico de essencial importância na caracterização espectroscópica de fármacos para a terapia fotodinâmica.

O rendimento quântico de produção do oxigênio singlete pode ser determinado por diferentes métodos. Neste trabalho, a determinação do Φ_Δ foi realizada pelo método fotofísico (FERNANDEZ;BILGIN;GROSSWEINER, 1997; SPILLER et al., 1998), que consiste na monitoração da intensidade de fosforescência do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm. Os detalhes desta metodologia foram apresentados na Introdução da tese.

O composto padrão utilizado para a determinação do Φ_Δ da ZnPc em meio orgânico e lipossomas foi o Feoforbide-a. Sob excitação, este composto produz eficientemente o seu estado excitado triplete ($\Phi_T = 0,65$ em benzeno) (YANG et al., 2000) e transfere seu excesso de energia para o oxigênio molecular, gerando o $^1\text{O}_2$ com altos rendimento ($\Phi_\Delta = 0,59$ em metanol) (RÖDER et al., 2000). Para a TMPyPH₂ o composto padrão utilizado foi o fulereno. O rendimento quântico de produção do oxigênio singlete por este fármaco tem sido determinado pelo método direto e por medidas foto-térmicas (ARBOGAST et al., 1991; HUNG;GRABOWSKI, 1991). O valor obtido, $\Phi_\Delta = 0,76$ em benzeno, demonstra

que o fulereno é um eficiente gerador de $^1\text{O}_2$. O perfil cinético de decaimento de fosforescência do $^1\text{O}_2$ produzido pela ZnPc em etanol é dado na Figura IV.19.

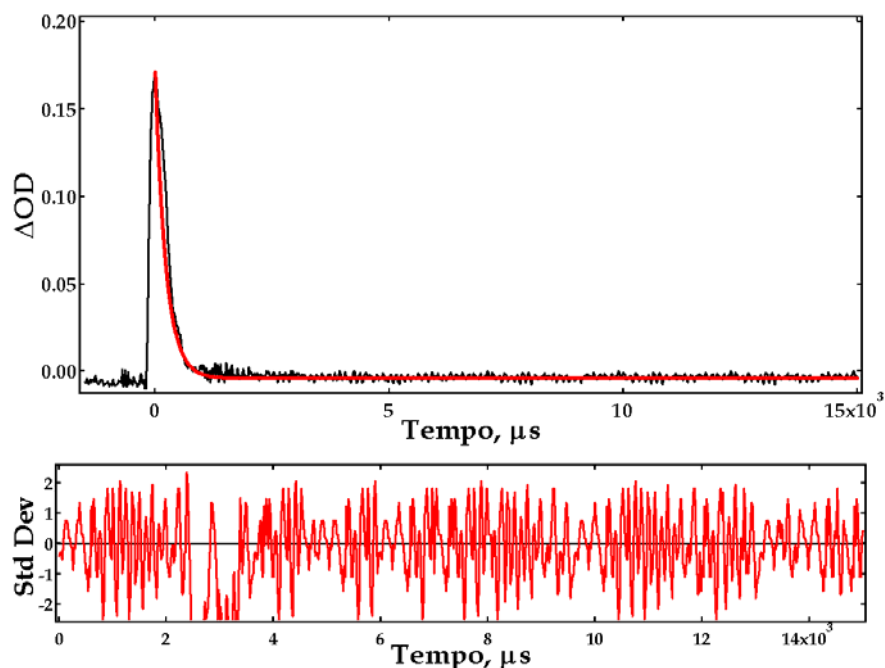


Figura IV.19: Decaimento de fosforescência do $^1\text{O}_2$ gerado pela ZnPc em etanol.

A análise do decaimento de fosforescência do oxigênio singlete resolvido no tempo permite estimar a sua intensidade máxima de emissão no tempo $t = 0$ bem como o tempo de vida para o processo de desativação. Estes parâmetros são necessários para o cálculo do Φ_{Δ} (ver Introdução).

O tempo de vida do oxigênio singlete (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001) se encontra na faixa de 10 - 100 μs , em solventes orgânicos. Em um ambiente aquoso, o tempo de vida do oxigênio singlete é reduzido para aproximadamente 2 μs porque a energia do estiramento da ligação O - H da água é próxima à energia do estado excitado do oxigênio singlete. Desta forma, a energia de excitação é dissipada na forma de calor pelo estiramento e movimento vibracional das moléculas de água. O tempo de vida do $^1\text{O}_2$ pode ser aumentado, entretanto, pela utilização de água deuterada. O curto tempo de vida do oxigênio singlete restringe sua atividade a um diâmetro próximo ao ponto em que foi produzido (cerca de 10 nm).

A Tabela IV.10 apresenta os valores de rendimentos quânticos de oxigênio singlete produzidos pela ftalocianina de zinco e pela porfirina utilizadas neste trabalho.

Tabela IV.10: Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete para os fármacos ZnPc e TMPyPH₂ nos diferentes ambientes estudados.

FÁRMACO	AMBIENTE	Φ_{Δ}
ZnPc	Etanol	0,57 ± 0,01
	DPPC/ colesterol/ DDAB / LPC*	0,37 ± 0,02
	PC/ colesterol/ DDAB / LPC*	0,28 ± 0,01
TMPyPH ₂ **	D ₂ O	0,74 ± 0,01
	Tampão Fosfato Salino	0,73 ± 0,03

* Razão molar de lipídio 1,0/0,45/0,34/0,04

** Determinado em trabalho anterior (DE PAOLI, 2001).

Para a ZnPc, o valor de Φ_{Δ} determinado em etanol está bastante próximo aos valores encontrados na literatura (ALLEN;SHARMAN;VAN LIER, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004), e é um indicativo de sua eficiência como fármaco fotossensível. Quando incorporado em seu sistema de liberação, entretanto, os valores de Φ_{Δ} são reduzidos. Isto ocorre porque, como anteriormente descrito, é esperado que a fotoquímica de fármacos incorporados em lipossomas seja diferente daquela determinada em solução homogênea, incluindo a produção e mobilidade do oxigênio singlete (HOEBEKE, 1995). Estudos relatados de difusão do oxigênio singlete gerado no interior da bicamada de lipossomas mostrou a habilidade desta espécie reativa em reagir com uma molécula supressora localizada em outra partícula lipossomal ou na fase aquosa (HOEBEKE, 1995), indicando que a reatividade da espécie reativa não é afetada pelo seu sítio de produção.

Os Φ_{Δ} obtidos para a ZnPc em lipossomas não são indicativos, entretanto, de uma diminuição da eficiência do fármaco como agente fotossensível. Ao contrário, os valores de Φ_{Δ} calculados indicam a potencialidade do fármaco na

produção desta espécie reativa. Além disso, a ZnPc pode atuar, também, através do mecanismo de fotossensibilização do Tipo I (HADJUR et al., 1997), ou seja, através da produção de outras espécies reativas de oxigênio capazes de induzir o dano oxidativo e, conseqüentemente, a morte de células vivas.

Para a TMPyPH₂, foi obtido um alto rendimento quântico de produção de oxigênio singlete em ambos os ambientes estudados, comprovando a sua eficiência como agente fotossensível para a TFD e justificando a sua ampla utilização em estudos de fotossensibilização. Desde que não foram observadas variações no valor de Φ_{Δ} para este fármaco em tampão fosfato salino, os dados indicam que a força iônica do meio não afeta as propriedades fotoquímicas do fármaco.

Não foram realizados testes para a determinação do rendimento quântico de produção do oxigênio singlete pelo VBBO. Julliard e colaboradores (VIOLA et al., 1996) não puderam detectar o sinal de emissão de fosforescência do oxigênio singlete em 1270 nm produzido pelo VBBO em tampão fosfato ou incorporado em lipossomas. Embora existam diferentes metodologias para a detecção do Φ_{Δ} , o método fotofísico é o mais específico e seguro para a determinação da produção da espécie reativa de oxigênio (VIOLA et al., 1996). Como anteriormente mencionado, o dano foto-induzido pelo fármaco é mediado por outras espécies reativas de oxigênio, como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila (VIOLA et al., 1996).

IV.3. Estudos Envolvendo Microorganismos

IV.3.1. Determinação da Curva de Crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Os estudos envolvendo os microorganismos tiveram início com a caracterização do crescimento de *E. coli* e *S. aureus* no caldo BHI. Uma curva de crescimento bacteriano (PELCZAR;REID;CHAN, 1980; TORTORA;FUNKE;CASE,

2000) demonstra o aumento no número de células durante um período de tempo e pode ser dividida em quatro fases distintas de crescimento.

Após o inóculo, as bactérias não se reproduzem imediatamente no novo meio de cultura. Este período, conhecido como Fase Lag, pode se estender de uma hora até vários dias e é caracterizado por intensa atividade metabólica da população bacteriana, principalmente síntese de DNA e enzimas. Na Fase Log ou de crescimento exponencial, as células iniciam o processo de divisão. Durante este período, a reprodução celular encontra-se extremamente ativa e, conseqüentemente, ocorre um aumento significativo no número de células presentes. Em um determinado momento a velocidade de crescimento diminui e o número de morte celular é equivalente ao número de células novas e a população se torna estável. Este período é conhecido como Fase Estacionária. Quando o número de células mortas excede o número de células novas, a população microbiana entra na Fase de Morte celular ou de declínio.

As curvas de crescimento para *E. coli* e *S. aureus* foram obtidas através de leituras de absorbância no comprimento de onda de 650 nm em função do tempo e podem ser vistas na Figura IV.20.

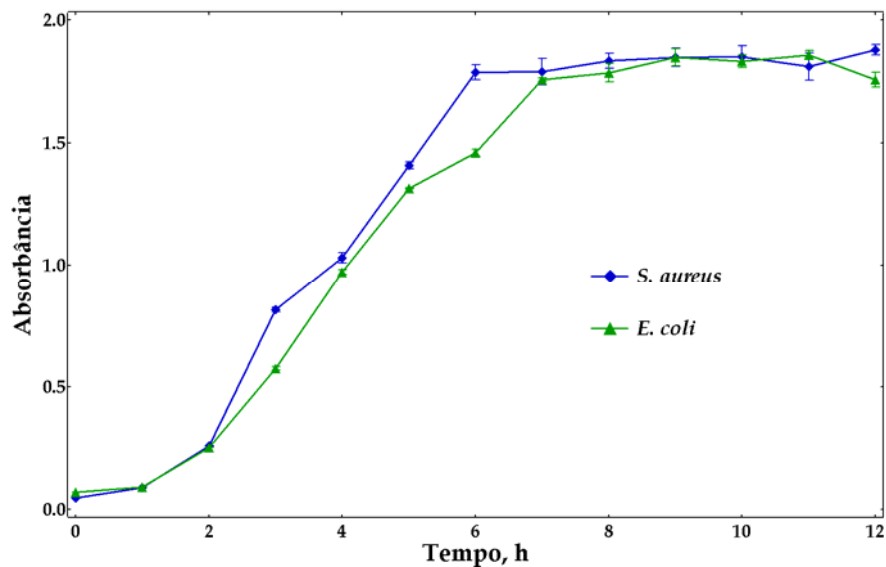


Figura IV.20: Curvas de crescimento para os microorganismos estudados em caldo-BHI.

É certo que existem variações estruturais e fisiológicas entre as células colhidas em diferentes fases de crescimento e, portanto, certas condições físicas e substâncias químicas podem afetar, de modo desigual, microorganismos de diferentes fases (PELCZAR;REID;CHAN, 1980). Por esta razão, a importância da determinação das curvas de crescimento foi verificar o tempo necessário para que cada um dos microorganismos atingisse a fase estacionária do crescimento bacteriano. Isto se deve ao fato de que estudos de morte foto-induzida de bactérias encontrados na literatura padronizaram a incubação com os fármacos fotossensíveis com os microorganismos cultivados até a fase estacionária (KOMERIK;WILSON, 2002; REDDI et al., 2002; SCHÄFER et al., 2000; SOL et al., 1998; SOL et al., 2004). As curvas de crescimento determinadas demonstram que a fase estacionária foi atingida após 6 e 7 horas de crescimento para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Estes foram, portanto, os tempos de crescimentos padronizados para as populações bacterianas antes do início dos ensaios fotodinâmicos.

A leitura de absorvância é um método indireto para a determinação da curva de crescimento da população bacteriana. Entretanto, se durante as leituras de absorvância for realizada a contagem do número de células, estes valores podem ser usados para estimar o número de bactérias em experimentos futuros em que somente a absorvância seja quantificada. Aqui, suspensões microbianas no início da Fase Estacionária foram diluídas até uma absorvância de 0,2 em 650 nm, correspondendo a uma densidade de células de 10^7 e 10^8 UFC. mL⁻¹ para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

IV.3.2. Determinação da Concentração dos Fármacos Fotossensíveis Acumulados por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Os estudos envolvendo erradicação fotodinâmica de bactéria são uma tentativa de encontrar uma solução eficaz para o problema da resistência de microorganismos à ação de antibióticos. Neste trabalho, a eficiência fotodinâmica de três fármacos fotossensíveis contra *E. coli* e *S. aureus* está sendo avaliada. A

porfirina catiônica TMPyPH₂ é um potente agente fotodinâmico cujo mecanismo de ação é baseado na produção de oxigênio singlete (DE PAOLI et al., 2002; KRUK et al., 1998a; MERCHAT et al., 1996b). O VBBO é um fármaco catiônico da segunda geração que atua através da produção de espécies radicalares de oxigênio como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila, altamente danosos para os sistemas biológicos (VIOLA et al., 1996). A ZnPc, também pertencente à segunda geração de fármacos fotossensíveis, atua por ambos os mecanismos de fotossensibilização (Mecanismo I e II) (HADJUR et al., 1997; TEDESCO;ROTTA;LUNARDI, 2003). Nestes ensaios, lipossomas catiônicos estão sendo utilizados como sistema de liberação para a ZnPc. Alguns estudos, como anteriormente descrito, têm demonstrado que bactérias Gram-negativas não são sensíveis à ação fotodinâmica de fármacos neutros ou negativamente carregados, a menos que a permeabilidade da parede externa seja alterada por tratamento químico (ASHKENAZI;NITZAN;GÁL, 2003; LACEY;PHILLIPS, 2001; REDDI et al., 2002). Entretanto, estes microorganismos são eficientemente foto-erradicados pela ação de fármacos positivamente carregados. Por esta razão, os fármacos empregados neste estudo são catiônicos ou incorporados em sistema de liberação positivamente carregado.

Os estudos da interação dos microorganismos com os agentes fotodinâmicos foram iniciados com a determinação da concentração destes fármacos acumulada pelas células dos microorganismos. Desde que a eficiência do processo fotodinâmico é dependente do acúmulo de fármaco pelas células alvo, esta investigação é de fundamental importância (ALLEN;SHARMAN;VAN LIER, 2001; CARRÉ et al., 1999; NYMAN;HYNNINEN, 2004; RODAL et al., 1998; ROMANOVA et al., 2003; SOL et al., 1998; SOL et al., 2004).

A concentração dos fármacos TMPyPH₂, VBBO e ZnPc incorporados por *E. coli* e *S. aureus* foi determinada por um procedimento espectroscópico modificado daquele inicialmente descrito na literatura (MERCHAT et al., 1996a; MERCHAT et al., 1996b). A quantidade de fármaco não incorporado pelo microorganismo, após incubação, foi determinada registrando-se o espectro de absorção da solução sobrenadante recolhida após a centrifugação da suspensão

dos microorganismos. A concentração do fármaco foi calculada empregando-se a absorvância da solução em um comprimento de onda específico e o seu coeficiente de absorvância molar neste mesmo comprimento de onda. A diferença entre a concentração de incubação e aquela determinada para a solução sobrenadante do fármaco fornece a concentração deste que foi incorporada pelos microorganismos. O procedimento é repetido após a lavagem dos microorganismos com solução fisiológica. Subseqüentemente, procede-se com a re-suspensão do microorganismo com solução SDS 2%. Esta análise permite estimar a concentração do corante que permanece efetivamente ligada aos microorganismos e, portanto, informa sobre a intensidade da interação do agente fotodinâmico com a parede das células da bactéria (MERCHAT et al., 1996a).

A concentração dos fármacos retida imediatamente após a incubação com os microorganismos e após lavagem das células com solução fisiológica foi calculada em número de moléculas de corante por célula bacteriana (N_C). O N_C é calculado pela razão entre o número de moléculas de corante (N) de fármaco incorporado por mililitro de suspensão bacteriana e a densidade de células nesta suspensão, expressa pelo número de unidades formadoras de colônias (UFC) existentes em um mililitro de solução :

$$N_C = \frac{N \cdot \text{mL}^{-1}}{\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}} = \frac{N \cdot \text{mL}^{-1}}{10^8 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}} \quad (\text{Equação 22})$$

Por sua vez, o valor de N é determinado por:

$$N (\text{mL}^{-1}) = [\text{fármaco}]_{\text{incorporado}} (\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}) * N_A = \frac{[\text{fármaco}]_{\text{incorporado}} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) * N_A}{10^3} \quad (\text{Equação 23})$$

em que a $[\text{fármaco}]_{\text{incorporado}}$ é determinada como descrito anteriormente e N_A é o número de Avogadro.

A Tabela IV.11 apresenta os resultados obtidos para incorporação da porfirina TMPyPH₂ por *E. coli* e por *S. aureus*.

Tabela IV.11: Concentração da TMPyPH₂ incorporada por 10⁸ células de *E. coli* e/ou *S. aureus*

	Tempo de Incubação	[TMPyPH ₂] _{inc} , μmol.L ⁻¹	N.mL ⁻¹	N _c	
				sem lavagem	com lavagem
<i>E. coli</i>	5 minutos	5,0	3,0x10 ¹⁵	3,6x10 ⁶	1,1x10 ⁶
		10,0	6,0x10 ¹⁵	4,2x10 ⁶	2,4x10 ⁶
		25,0	1,5x10 ¹⁶	1,9x10 ⁷	2,8x10 ⁶
		50,0	3,0x10 ¹⁶	2,3x10 ⁷	5,6x10 ⁶
		100,0	6,0x10 ¹⁶	3,4x10 ⁷	9,0x10 ⁶
	20 minutos	0,50	3,0x10 ¹⁴	8,4x10 ⁵	6,0x10 ⁴
		5,0	3,0x10 ¹⁵	6,0x10 ⁶	1,7x10 ⁶
		10,0	6,0x10 ¹⁵	1,1x10 ⁷	2,2x10 ⁶
		25,0	1,5x10 ¹⁶	2,6x10 ⁷	3,4x10 ⁶
		50,0	3,0x10 ¹⁶	4,2x10 ⁷	5,1x10 ⁶
		100,0	6,0x10 ¹⁶	6,4x10 ⁷	6,6x10 ⁶
		<i>S. aureus</i>	5 minutos	5,0	3,0x10 ¹⁵
10,0	6,0x10 ¹⁵			4,8x10 ⁶	2,4x10 ⁶
25,0	1,5x10 ¹⁶			5,4x10 ⁶	2,7x10 ⁶
50,0	3,0x10 ¹⁶			8,4x10 ⁶	3,0x10 ⁶
100,0	6,0x10 ¹⁶			1,4 x10 ⁷	3,1x10 ⁶
20 minutos	0,50		3,0x10 ¹⁴	1,5x10 ⁶	1,2x10 ⁵
	5,0		3,0x10 ¹⁵	4,8x10 ⁶	3,7x10 ⁶
	10,0		6,0x10 ¹⁵	5,4x10 ⁶	4,5x10 ⁶
	25,0		1,5x10 ¹⁶	6,0x10 ⁶	4,8x10 ⁶
	50,0		3,0x10 ¹⁶	1,1x10 ⁷	5,1x10 ⁶
	100,0		6,0x10 ¹⁶	1,4x10 ⁷	5,7x10 ⁶

Os resultados obtidos para a interação da TMPyPH₂ com *E. coli* indicam que, à medida que aumentamos a concentração de porfirina usada na incubação das células, cresce também o número de moléculas retidas por cada célula da bactéria. O aumento do tempo de incubação para 20 minutos também contribuiu para a eficiência da incorporação da porfirina, uma vez que o número de moléculas acumuladas é quase duas vezes superior àquele determinado para a bactéria após 5 minutos de incubação. A lavagem das células centrifugadas com solução fisiológica induz a liberação de moléculas do fármaco para a solução e, como consequência, observa-se uma redução no número de moléculas do fármaco retidas em cada célula de *E. coli*.

Resultados similares foram obtidos nos ensaios de incorporação da TMPyPH₂ por *S. aureus* para ambos os tempos de incubação (Tabela IV.11). Entretanto, pode-se observar que, à medida que aumenta a concentração de incubação do fármaco, os valores de N_C calculados demonstram que a variação no número de moléculas de corante retido em cada célula da bactéria é menos significativo do que aquele determinado para *E. coli*. O mesmo é observado para a taxa de retenção do fármaco após a lavagem do microrganismo com solução fisiológica. Observa-se, porém, que para um tempo de incubação de 20 minutos, a retenção de moléculas do fármaco, após a lavagem das células com solução fisiológica, é cerca de 1,8 vez maior. Após a lavagem de *E. coli*, para todas as diferentes concentrações do fármaco utilizadas no estudo, o tempo de incubação parece não afetar significativamente o número de moléculas que permanecem retidas, desde que os valores de N_C calculados para ambos os tempos de incubação (5 ou 20 minutos) são próximos (com exceção do resultado obtido para 100,0 μmol.L⁻¹). Também, após 20 minutos de incubação e lavagem do microorganismo, observa-se uma incorporação mais eficiente do fármaco pela *S. aureus* após incubação inicial com o corante na faixa de 0,05 – 25,0 μmol.L⁻¹ do que a observada para a *E. coli*. Para concentrações de incubação superiores, similares taxas de retenção foram obtidas.

Desde que a ação fotodinâmica é dependente da concentração dos fármacos acumulados pelas células alvo (RODAL et al., 1998) os resultados obtidos são um

forte indicativo da eficiência da TMPyPH₂ na foto-erradicação dos microorganismos.

A Tabela IV.12 apresenta os resultados obtidos para incorporação do VBBO por *E. coli* ou *S. aureus*. Para ambos os microorganismos, a determinação de N_C foi realizada após 5 minutos de incubação com o fármaco.

Tabela IV.12: Concentração do VBBO incorporado por 10⁸ células de *E. coli* e/ou *S. aureus*

Microorganismo	[VBBO] _{inc} μmol.L ⁻¹	N (mL ⁻¹)	N _C	
			sem lavagem	com lavagem
<i>E. coli</i>	0,5	3,0x10 ¹⁴	3,0x10 ⁶	3,0x10 ⁶
	5,0	3,0x10 ¹⁵	2,7x10 ⁷	1,4x10 ⁷
	10,0	6,0x10 ¹⁵	5,5x10 ⁷	3,5x10 ⁷
	25,0	1,5x10 ¹⁶	1,4x10 ⁸	1,1x10 ⁸
	50,0	3,0x10 ¹⁶	2,9x10 ⁸	2,1x10 ⁸
	100,0	6,0x10 ¹⁶	5,9x10 ⁸	4,6x10 ⁸
<i>S. aureus</i>	0,5	3,0x10 ¹⁴	3,0x10 ⁶	3,0x10 ⁶
	5,0	3,0x10 ¹⁵	2,5x10 ⁷	1,9x10 ⁷
	10,0	6,0x10 ¹⁵	4,8x10 ⁷	3,7x10 ⁷
	25,0	1,5x10 ¹⁶	1,3x10 ⁸	1,2x10 ⁸
	50,0	3,0x10 ¹⁶	2,8x10 ⁸	2,7x10 ⁸
	100,0	6,0x10 ¹⁶	5,7x10 ⁸	5,5x10 ⁸

Os dados apresentados demonstram que a retenção do fármaco pelas células de ambas *E. coli* e *S. aureus*, após cinco minutos de incubação, é bastante eficiente. Para a faixa de concentração de VBBO utilizada para a incubação dos microorganismos, a variação em N_C observada é muito superior àquela determinada nos ensaios envolvendo a TMPyPH₂. Isto indica que a interação entre o VBBO e os microorganismos é bastante forte. De fato, foi sugerido em um trabalho anterior (GOLDING et al., 1998) que a interação entre o verde de malaquita, um triarilmetano como o VBBO, com as células de *S. aureus* se processa

através de uma ligação eletrostática entre os grupamentos amina terciária ativa do corante e os lipídios resultando em um complexo estável e insolúvel.

Os dados da Tabela IV.12 mostram que, imediatamente após a incubação com o corante, não há uma significativa diferença entre o número de moléculas de corante incorporado por cada célula de *E. coli* ou *S. aureus*, sendo levemente superior para *E. coli*. A lavagem das células centrifugadas reduz apenas levemente o número de moléculas associadas aos microorganismos, sendo esta observação mais um indicativo da forte interação entre o VBBO e ambas as bactérias estudadas. Observa-se, porém, que após o processo de lavagem das células, o fármaco permanece levemente mais retido pelas células de *S. aureus*, indicando uma maior interação entre as células o VBBO e o microorganismo Gram-positivo.

Para ambas os microorganismos, a alta retenção de VBBO pressupõe sua eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio no interior da célula bacteriana e, conseqüentemente, nos estudos de morte foto-induzida dos microorganismos.

A Tabela IV.13 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de incorporação da ZnPc por *E. coli* ou *S. aureus*. A ZnPc foi veiculada a partir de lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04. A outra formulação lipossomal preparada e estudada na etapa de caracterização fotofísica dos fármacos (PC/colesterol/DDAB/LPC e razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04) não foi utilizada nos ensaios envolvendo os microorganismos. A razão para esta escolha foi baseada no fato de que a ZnPc encapsulada na primeira formulação demonstrou-se mais eficiente na produção de oxigênio singlete, o intermediário chave do processo fotodinâmico (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004; STERNBERG;DOLPHIN, 1998) (ver Tabela IV.10). Portanto, a ZnPc incorporada em lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC deve ser mais eficiente na foto-erradicação dos microorganismos.

Desde que a liberação do fármaco é intermediada pela interação entre a célula da bactéria e os lipossomas, a concentração de ZnPc retida pelos

microorganismos foi determinada após incubação das bactérias com os lipossomas por 20, 40 e 60 minutos.

Tabela IV.13: Concentração do ZnPc incorporado por 10^8 células de *E. coli* e/ou *S. aureus*. A ZnPc foi liberada de lipossomas catiônicos constituídos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04

Microorganismo	Tempo de incubação	[ZnPc] _{inc} , $\mu\text{mol.L}^{-1}$	N (mL^{-1})	N _C (sem lavagem)
<i>E. coli</i>	20 min	3,3	$2,0 \times 10^{15}$	$1,4 \times 10^7$
	40 min	3,3	$2,0 \times 10^{15}$	$1,5 \times 10^7$
	60 min	3,3	$2,0 \times 10^{15}$	$1,6 \times 10^7$
<i>S. aureus</i>	20 min	3,3	$2,0 \times 10^{15}$	$1,2 \times 10^8$
	40 min	3,3	$2,0 \times 10^{15}$	$1,2 \times 10^8$
	60 min	3,3	$2,0 \times 10^{15}$	$1,2 \times 10^8$

Os dados da Tabela IV.13 demonstram que a ZnPc é mais eficientemente incorporada pela *S. aureus* do que pela *E.coli*. Para a *E. coli*, o N_C aumenta apenas levemente com o tempo de incubação. Por outro lado, não foi observado um aumento da quantidade de fármaco incorporado pela *S. aureus* após 20 minutos de incubação. Em ambos os casos, a alta concentração de moléculas do fármaco em cada célula do microorganismo é um indicativo da eficiência dos lipossomas na veiculação da ftalocianina de zinco e pressupõe a eficiência deste fármaco na fotoerradicação dos microorganismos.

Como descrito na seção experimental da tese (Capítulo III), a concentração de ZnPc incorporada pelas bactérias foi estimada pela diferença entre a concentração da ZnPc lipossomal antes do processo de incubação e imediatamente após a incubação. Desde que a ZnPc não é solúvel em meio aquoso, não foi possível determinar o espectro de absorção para o fármaco em solução fisiológica após lavagem das células. Também, não foi obtido um espectro de absorção resolvido para o fármaco após a re-suspensão das células em solução de SDS 2%, de modo que não foi possível estimar a força da interação entre o fármaco e o

corante. Também, devido à insolubilidade da ZnPc em meio aquoso e à ausência de espectro resolvido em meio micelar, não foi possível estimar a concentração de ZnPc retida pelas células dos microorganismos após incubação com o fármaco na ausência de sistema de liberação (adição de uma alíquota da solução estoque da ZnPc em DMSO/DMF 50% (v/v) na suspensão bacteriana).

IV.3.3. Estudos Controle para a Determinação da Toxicidade da Luz e a Toxicidade Intrínseca dos Fármacos Fotossensíveis para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

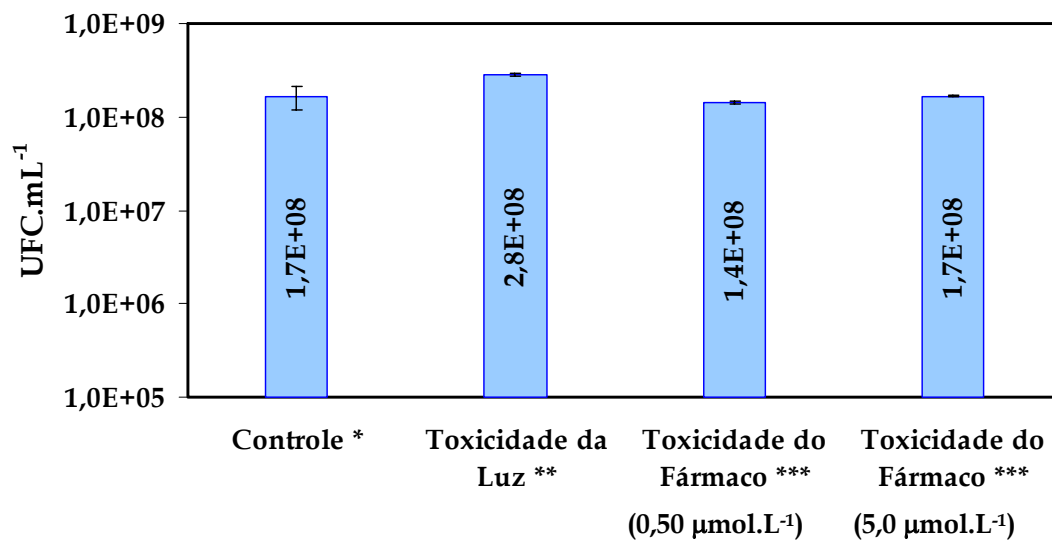
Como descrito anteriormente, a terapia fotodinâmica vem sendo avaliada como método alternativo para o controle de infecções causadas por microorganismos resistentes à ação de antibióticos. A grande vantagem da TFD é que, desde que a erradicação da bactéria é mediada por espécies reativas de oxigênio, é improvável que o microorganismo desenvolva resistência à ação fotodinâmica (LACEY;PHILLIPS, 2001).

Entre os princípios da terapia fotodinâmica, espera-se que o fármaco fotossensível ou a luz, quando isoladas, não apresentem toxicidade para as células vivas (RODRIGUEZ;AWRUCH;DICELIO, 2002). Desde que estamos interessados em determinar a eficiência fotodinâmica de diferentes fármacos na erradicação de *E. coli* e *S. aureus*, torna-se necessário realizar ensaios controle com o intuito de se determinar: (i) a toxicidade destes fármacos fotossensíveis para *E. coli* e *S. aureus* na ausência de luz bem como (ii) a toxicidade da luz para estas bactérias nas faixas de comprimentos de onda utilizadas para a irradiação destes microorganismos.

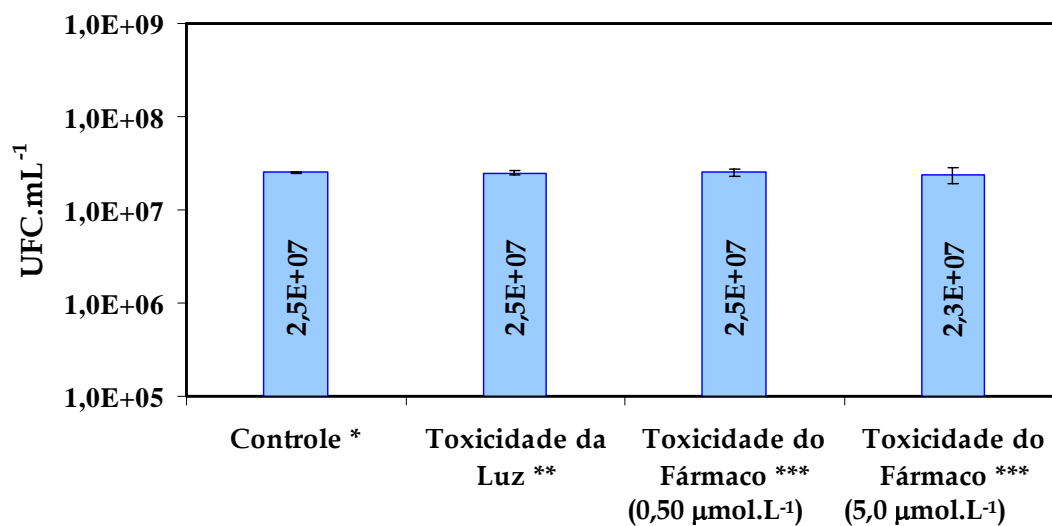
Em todos os ensaios fotodinâmicos realizados, a densidade de células nas suspensões bacterianas se encontrou na faixa de 10^7 - 10^8 células.

A Figura IV.21 apresenta os resultados obtidos quando uma suspensão de *E. coli* ou *S. aureus* foi submetida à irradiação por 10 minutos (o tempo máximo de irradiação em nossos estudos) com luz na faixa de comprimento de onda utilizada para a excitação da TMPyPH₂ (400 a 500 nm). A Figura apresenta, também, o efeito

de 0,5 e 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do fármaco sobre uma suspensão das bactérias após incubação por 20 minutos na ausência de luz.



(A)



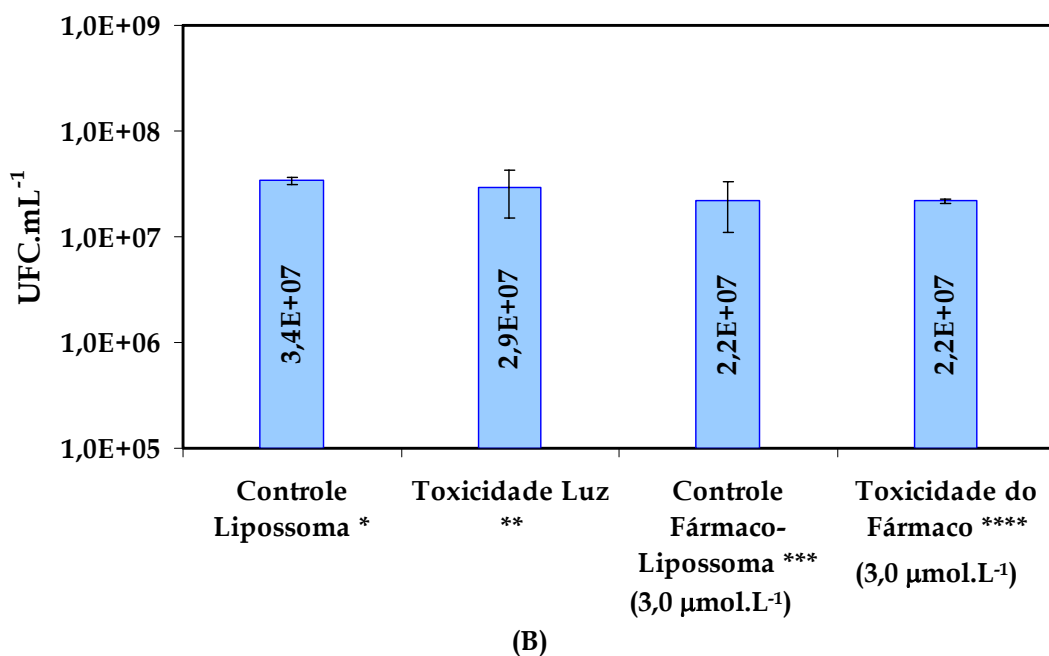
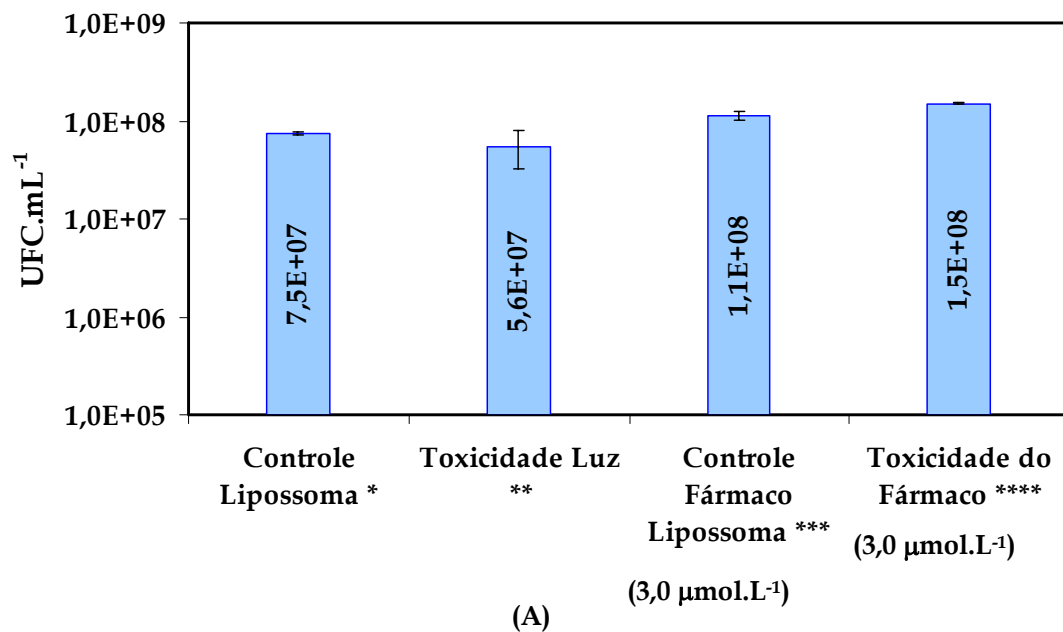
(B)

* Sem fármaco e sem luz; ** Faixa de comprimento de onda de 400 - 500 nm; *** Toxicidade intrínseca do fármaco (sem irradiação).

Figura IV.21: Estudos controle da toxicidade da luz e da TMPyPH₂ contra (A) *E. coli* e (B) *S. aureus*.

Os ensaios indicaram que a luz, isoladamente, não é tóxica para ambos os microorganismos. A porfirina também não mostrou um efeito tóxico para *E. coli* e *S. aureus* na faixa de concentração de 0,5 - 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Como descrito na Seção Experimental, nos ensaios fotodinâmicos envolvendo a ZnPc incorporada em lipossomas catiônicos, uma suspensão dos microorganismos foi centrifugada e as bactérias re-suspendidas diretamente com os lipossomas. Para a determinação da toxicidade da luz, as bactérias foram re-suspendidas em lipossomas sem fármaco incorporado (lipossomas vazios) e, após 20 minutos de incubação, submetidos à irradiação com luz na faixa de comprimentos de onda entre 600 - 700 nm por 10 minutos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura IV.22. Um outro experimento foi realizado para determinar a toxicidade do fármaco para as bactérias (Figura IV.22), em que as células foram re-suspendidas em lipossomas contendo a ZnPc incorporada e incubadas por 20 minutos na ausência de luz. A concentração da ftalocianina de zinco no sistema de liberação era de aproximadamente 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

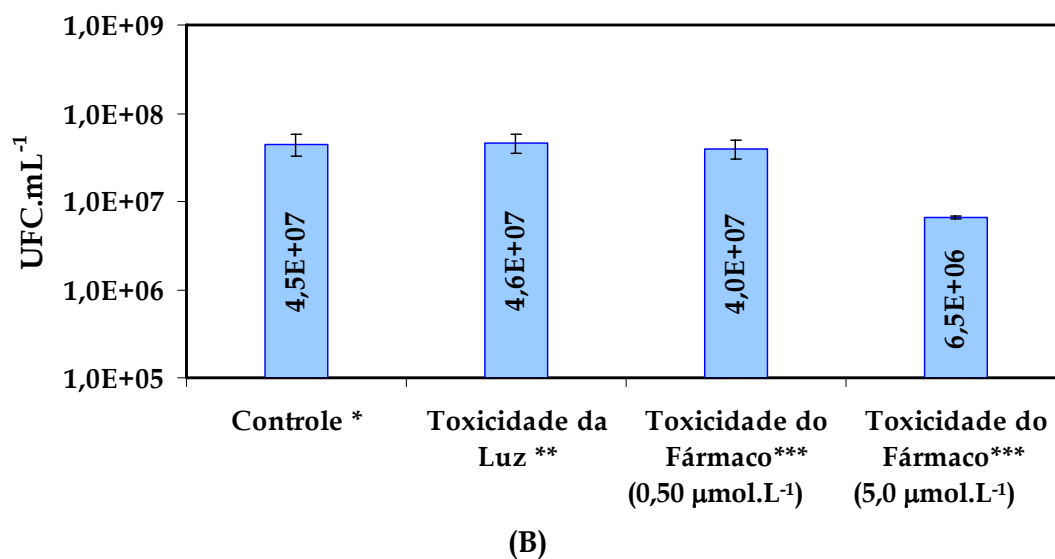
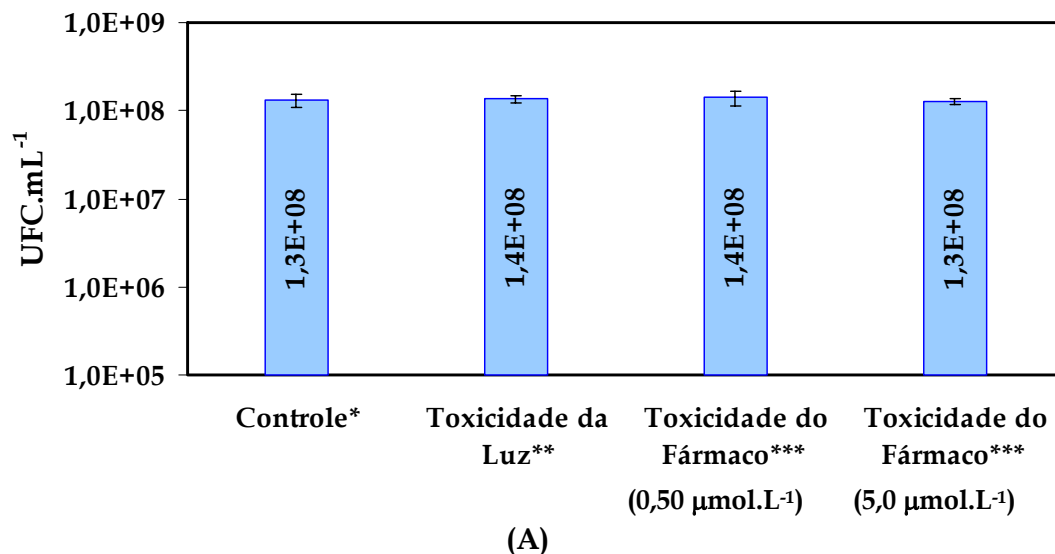


* Controle do efeito de lipossomas sem fármaco incorporado sobre as suspensões bacterianas e sem luz; ** Irradiação de microorganismos incubados com lipossomas sem fármaco incorporado. Faixa de comprimento de onda de 600 - 700 nm; *** Controle do efeito de lipossomas com o fármaco incorporado sobre as suspensões bacterianas; **** Toxicidade intrínseca do fármaco (sem irradiação).

Figura IV.22: Estudos controle da toxicidade da luz e da ZnPc incorporada em lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC (razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04) contra (A) *E. coli* e (B) *S. aureus*.

O número de UFC.mL⁻¹ determinadas para a suspensão lipossomal original, ou seja, sem incubação das bactérias com sistemas de lipossomas e sem irradiação (dados não apresentados), não foram significativamente diferentes daqueles determinados após o período de incubação com lipossomas vazios ou com o fármaco incorporado. Isto indica que, os lipossomas em si não possuem qualquer toxicidade para as células bacterianas. Também, os dados da Figura IV.22 demonstram que, semelhante ao observado para a porfirina, não há um efeito bactericida significativo induzido pela luz ou pelo fármaco liberado a partir de lipossomas para ambas *E. coli* e *S. aureus*.

A Figura IV.23 apresenta os resultados obtidos para os ensaios do efeito direto da luz na faixa de 600 - 700 nm (a faixa de comprimentos de onda em que ocorre a máxima absorção do fármaco) sobre *E. coli* e *S. aureus* bem como os resultados de toxicidade do VBBO nas concentrações de 0,5 e 5,0 µmol.L⁻¹ sobre uma suspensão destas bactérias. Neste ensaio, o tempo de incubação foi de 5 minutos.



* Sem fármaco e sem luz; ** Faixa de comprimento de onda de 600 - 700 nm; *** Toxicidade intrínseca do fármaco (sem irradiação).

Figura IV.23: Estudos controle da toxicidade da luz e do VBBO contra (A) *E. coli* e (B) *S. aureus*.

Como demonstrado, a luz não apresenta efeito bactericida sobre o microorganismo estudado. Quanto aos ensaios para estimar a toxicidade inerente do corante, não foram observadas variações significativas no número de células viáveis quando *E. coli* foi incubada com 0,5 ou 5,0 µmol.L⁻¹. Para a *S. aureus*, o fármaco não se mostrou tóxico na concentração de 0,5 µmol.L⁻¹. Com o aumento

da concentração de VBBO empregada na incubação para 5,0 μM observa-se uma redução no número de colônias. Entretanto, dado o alto número de UFC/mL utilizado na incubação, o efeito bactericida observado é desprezível.

De acordo com Viola (VIOLA et al., 1996), este triarilmetano mostra também um efeito tóxico moderado quando incubado no escuro com células tumorais. Neste caso, o VBBO se acumula preferencialmente na mitocôndria da célula devido à atração eletrostática entre a sua carga positiva e a força diretora dos potenciais de membrana de ambas membranas plasmática e mitocondrial. De acordo com a autora, a toxicidade parece provir de um desacoplamento da fosforilação oxidativa induzido pelo corante.

A ausência de toxicidade do corante para *E. coli* pode ser explicada em termos de sua estrutura celular. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede externa que atua como uma barreira extra para a interação de moléculas com a membrana citoplasmática (KOMERIK;WILSON;POOLE, 2000; POLO et al., 2000). Desta forma, as bactérias Gram-negativas devem ser menos afetadas por agentes bactericidas. De fato, a membrana externa destas bactérias contribui para a resistência a antibióticos observada (KOMERIK;WILSON;POOLE, 2000; MCKEEGAN;BORGES-WALMSLEY;WALMSLEY, 2002). Por outro lado, bactérias Gram-positivas como a *Staphylococcus aureus* não possuem esta proteção para a interação de moléculas com a sua membrana citoplasmática e devem, portanto, serem mais facilmente afetadas por compostos que apresentem uma ação bactericida, como o VBBO.

IV.3.4. Estudos Fotodinâmicos para a Erradicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Uma vez determinado que os fármacos fotossensíveis e a luz utilizada para a excitação destes não possui um efeito tóxico significativo sobre os microorganismos estudados, procedeu-se com os estudos de erradicação fotodinâmica de *E. coli* e *S. aureus*. A morte foto-induzida de bactérias em

suspensão pode ser obtida através da liberação seletiva da luz sobre as células alvo contendo o fármaco fotossensível incorporado.

A dose fotodinâmica (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001) é uma medida da energia absorvida por um fármaco. Matematicamente, a dose fotodinâmica (D_{TFD}) pode ser descrita (Equação 24) como o produto da velocidade de fluência da luz ($\psi(\lambda, q, t)$), o coeficiente de extinção molar do fármaco fotossensível ($\epsilon(\lambda)$) e a concentração do fármaco incorporado pelas células alvo ($C(q, t)$):

$$D_{TFD} = \int \int_0^q \epsilon(\lambda) \cdot C(q, t) \cdot \psi(\lambda, q, t) dt dq \quad (\text{Equação 24})$$

Em procedimentos experimentais, é possível calcular a dose fotodinâmica através da equação:

$$D_{TFD} = t \cdot I \quad (\text{Equação 25}),$$

em que t é o tempo de irradiação e I é a intensidade de luz que incide sobre a amostra, e pode ser calculada por:

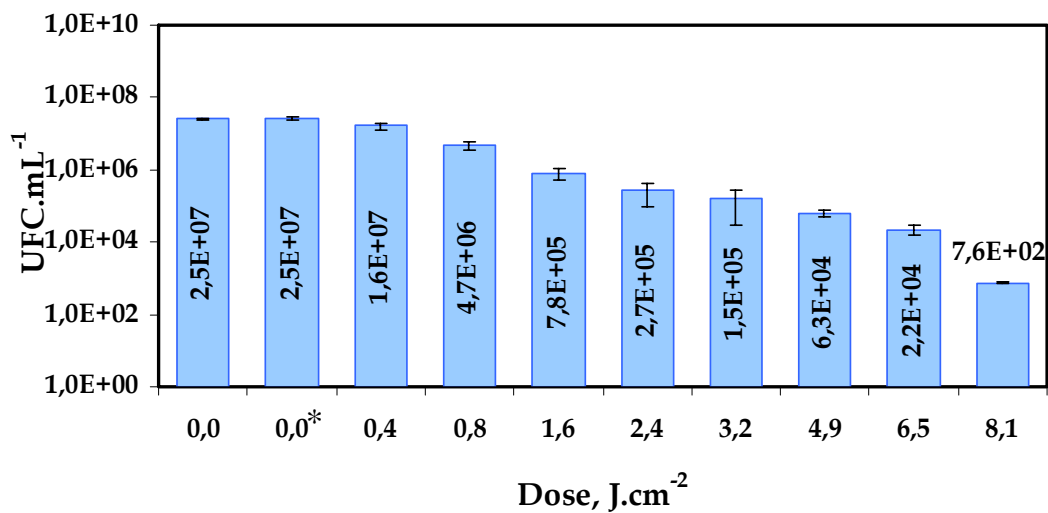
$$I = \frac{P}{A} \quad (\text{Equação 26});$$

Aqui, P é a potência da fonte de irradiação empregada nos ensaios fotodinâmicos e A é a área do feixe da radiação. A intensidade da luz utilizada foi de 14 mW.cm^{-2} nos estudos envolvendo a TMPyPH₂ e 44 mW.cm^{-2} nos ensaios envolvendo o VBBO e a ZnPc.

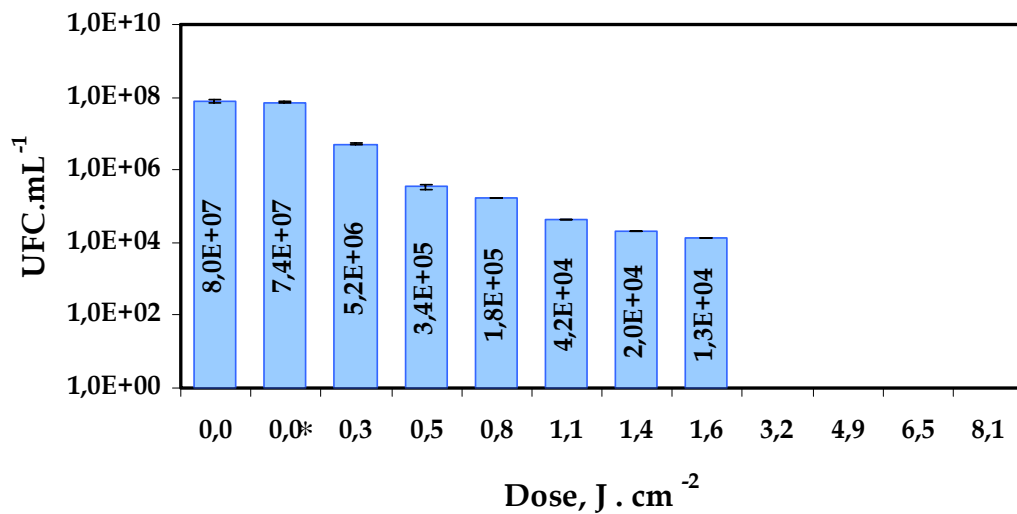
Para os ensaios fotodinâmicos, foram construídos gráficos do decréscimo do número de colônias viáveis (UFC.mL^{-1}) como uma função da dose de radiação aplicada sobre os microorganismos. Para ambas as bactérias, as células em suspensão não foram separadas do fármaco não incorporado pelas células após a incubação, ou seja, a ação fotodinâmica observada foi induzida não apenas pelo

fármaco retido pelas bactérias, como também pelo fármaco livre na suspensão ao redor das células. A densidade de bactérias em suspensão foi de $10^7 - 10^8$ UFC.mL⁻¹.

Para a TMPyPH₂, os resultados obtidos na erradicação de *S. aureus* e *E. coli* podem ser vistos nas Figuras IV.24 e IV.25, respectivamente. A eficiência fotodinâmica na erradicação de ambas as bactérias foi avaliada com o fármaco nas concentrações de 0,5 e 5,0 μmol.L⁻¹. O tempo de incubação da suspensão bacteriana com a porfirina foi de 20 minutos. O tempo máximo de irradiação foi 10 minutos (8,1 J.cm⁻²).



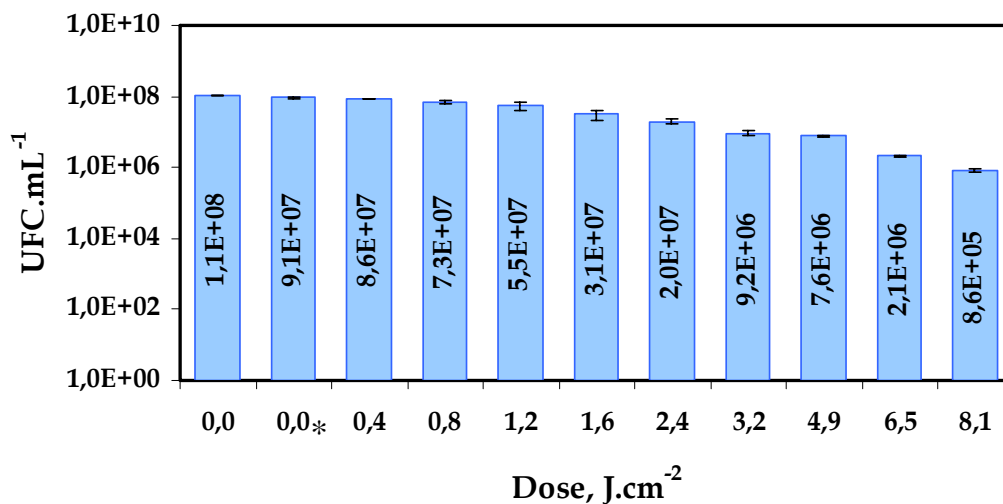
(A)



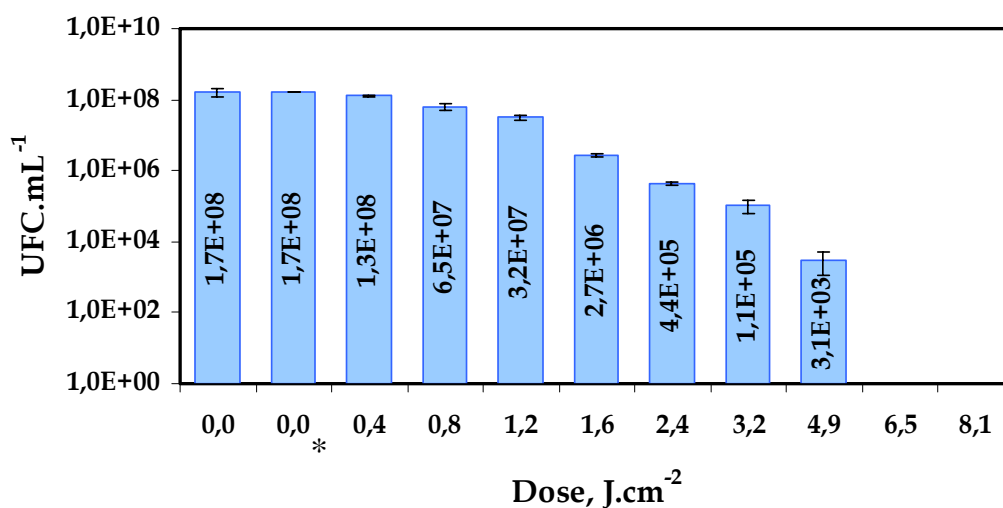
(B)

* Após incubação com o fármaco e sem irradiação.

Figura IV.24: Decréscimo do número de colônias viáveis de *S. aureus* como função da dose de radiação aplicada para a ativação da TMPyPH₂ nas concentrações de (A) 0,5 µmol.L⁻¹ e (B) 5,0 µmol.L⁻¹.



(A)



(B)

* Após incubação com o fármaco e sem irradiação.

Figura IV.25: Decréscimo do número de colônias viáveis de *E. coli* como função da dose de radiação aplicada para a ativação da TMPyPH₂ nas concentrações de (A) 0,5 μmol.L⁻¹ e (B) 5,0 μmol.L⁻¹.

As Figuras IV.24 e IV.25 mostram que TMPyPH₂ é capaz de induzir a morte dos microorganismos após a sua excitação. Para ambas as bactérias, a concentração de 0,5 μmol.L⁻¹ da porfirina (Figuras IV.24(A) e IV.25(A)) não foi

eficiente na total erradicação das bactérias dentro do tempo máximo de irradiação proposto (10 minutos). Para a *S. aureus*, observa-se uma redução de cerca de 10^4 UFC.mL⁻¹ com uma dose de radiação de 8,1 J.cm⁻²; para a *E. coli*, a mesma dose de radiação proporciona uma redução de aproximadamente 10^3 UFC.mL⁻¹. Observa-se, entretanto, que o aumento da concentração do fármaco para 5,0 µmol.L⁻¹ proporciona uma diminuição mais acentuada no número de UFC.mL⁻¹. Não foi observado um crescimento efetivo de colônias de *S. aureus* e *E. coli* após a aplicação de 3,2 J.cm⁻² e 6,5 J.cm⁻², respectivamente (Figuras IV.24(B) e IV.25(B)). Isto ocorre porque o aumento da concentração da porfirina induz o aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio produzidas após a sua excitação e, conseqüentemente, a eficiência no dano foto-induzido às bactérias. Então, o aumento da concentração do fármaco proporciona uma redução na dose de radiação necessária para a total erradicação do microorganismo. Entretanto, é importante ressaltar que altas concentrações dos fármacos devem ser evitadas nos ensaios de morte foto-induzida. Além do fator econômico envolvido, elevadas concentrações podem induzir a formação de dímeros ou agregados superiores destes fármacos. Como anteriormente descrito, os dímeros afetam a eficiência fotodinâmica dos fármacos (BORISSEVITCH et al., 1997; RODRIGUEZ;AWRUCH;DICELIO, 2002).

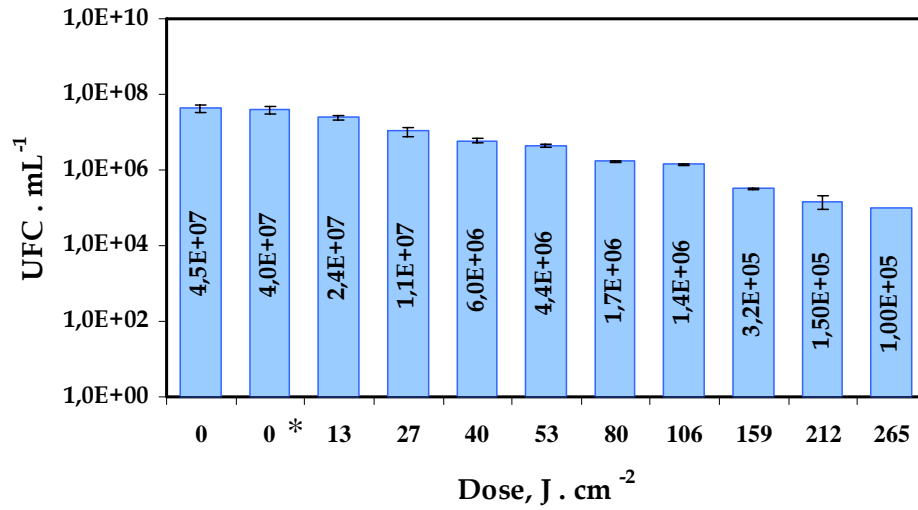
Uma observação interessante foi relatada na literatura. Jori e colaboradores (MERCHAT et al., 1996b) observaram em seus ensaios de erradicação fotodinâmica de *E. coli* com a TMPyPH₂ que o processo de fotossensibilização é acompanhado por um aumento na concentração do corante retido pelas células do microorganismo. Estes pesquisadores determinaram a concentração de porfirina livre em solução após uma lavagem das células com solução de tampão fosfato salino. Não foram oferecidas explicações adicionais para esta observação.

A comparação entre as Figuras IV.24 e IV.25 demonstra que a erradicação total de *S. aureus* requer menores doses de radiação do que *E. coli*. A razão para isto é, provavelmente, o efeito protetor exercido pela parede externa da *E. coli*, ausente na *S. aureus*, que dificulta a interação das espécies reativas com a

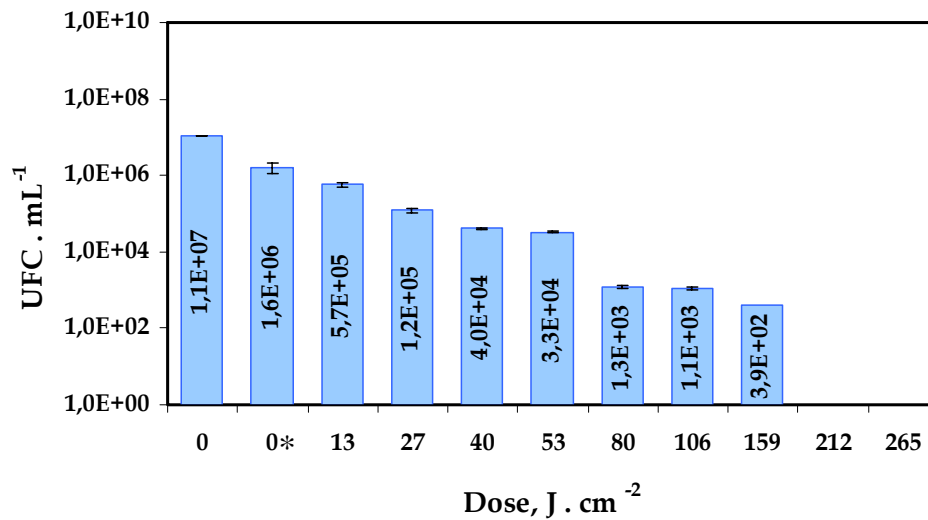
membrana citoplasmática desta bactéria (KOMERIK;WILSON;POOLE, 2000; POLO et al., 2000).

A ação fotodinâmica observada para a TMPyPH₂ está em acordo com as propriedades fotofísicas determinadas para o fármaco. O baixo rendimento quântico de fluorescência era um indicativo de que a molécula empregava outros caminhos, diferentes da emissão de fluorescência, para retornar ao seu estado fundamental. A eficiência no processo de cruzamento intersistemas é atestada pelo alto rendimento quântico de formação do seu estado excitado triplete. A transferência de energia para o oxigênio molecular também é eficiente, como demonstrado pelo seu rendimento de produção de oxigênio singlete, a principal espécie reativa envolvida no dano fotodinâmico. A difusão livre para o oxigênio singlete em células foi estimada entre 10 - 20 nm (SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000). Isto indica que, mesmo quando esta espécie reativa é produzida pelo fármaco livre em solução (fármaco não retido pelas células), ela pode se difundir e danificar a membrana da célula da bactéria, induzindo a sua morte.

O VBBO é fármaco fotossensível da segunda geração que tem se mostrado bastante promissor para a terapia fotodinâmica de tumores (VIOLA et al., 1996). Outros estudos têm descrito a potencialidade da utilização do verde de malaquita, também pertencente à classe dos triarilmetanos, como fármaco fotossensível para a erradicação de *S. aureus* (GOLDING et al., 1998). As Figuras IV.26 e IV.27 apresentam, respectivamente, os perfis de erradicação de *S. aureus* e *E. coli* como uma função da dose fotodinâmica utilizada nos ensaios. O tempo de incubação com o fármaco foi de 5 minutos.



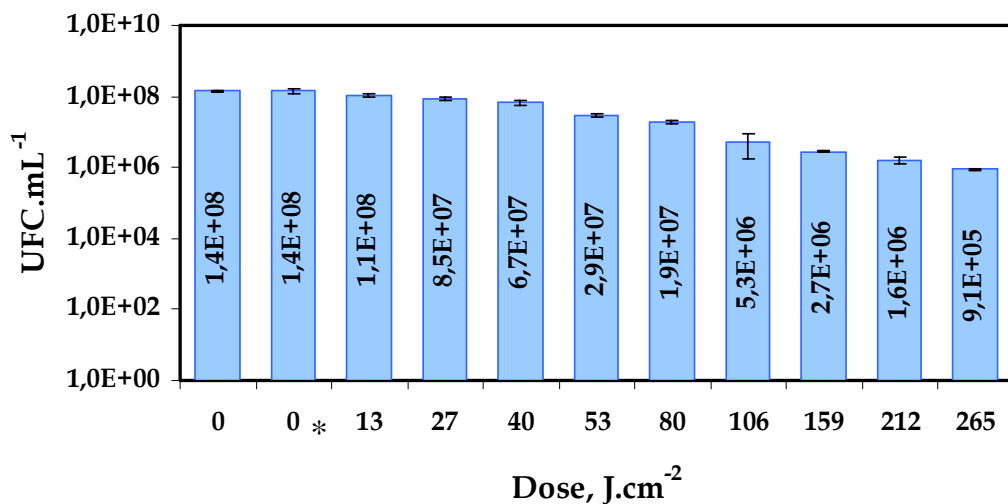
(A)



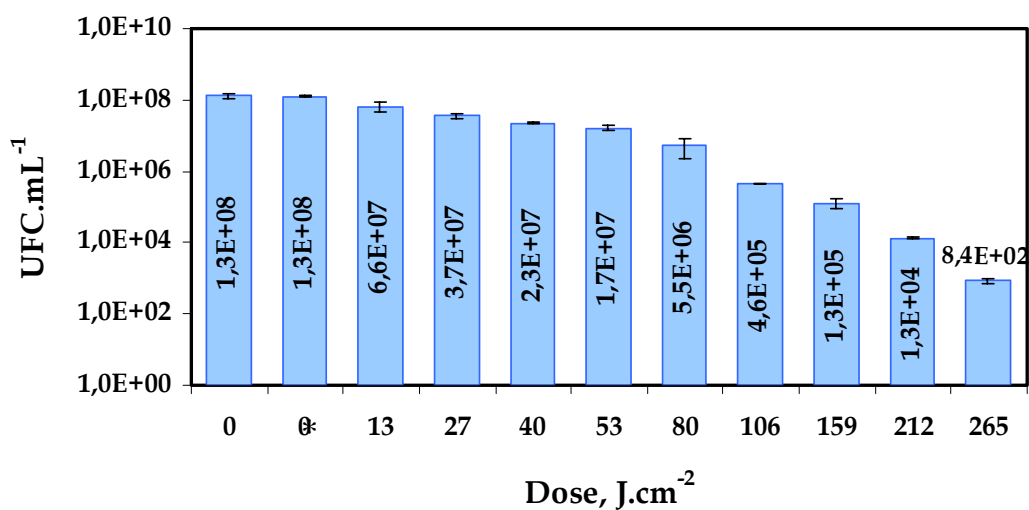
(B)

* Após incubação com o fármaco e sem irradiação.

Figura IV.26: Decréscimo do número de colônias viáveis de *S. aureus* como função da dose de radiação aplicada para a ativação da TMPyPH₂ nas concentrações de (A) 0,5 μmol.L⁻¹ e (B) 5,0 μmol.L⁻¹.



(A)



(B)

* Após incubação com o fármaco e sem irradiação.

Figura IV.27: Decréscimo do número de colônias viáveis de *E. coli* como função da dose de radiação aplicada para a ativação da TMPyPH₂ nas concentrações de (A) 0,5 μmol.L⁻¹ e (B) 5,0 μmol.L⁻¹.

Nestes ensaios, novamente se observa que a erradicação de *E. coli* foi mais difícil do que para a *S. aureus* (Figuras IV.26(B) e IV.27(B)), como resultado da proteção exercida pela membrana externa da bactéria Gram-negativa.

Como descrito anteriormente, nestes estudos de foto-erradicação de bactérias não estamos avaliando apenas a eficiência dos fármacos retidos pelos microorganismos em induzir dano foto-oxidativo, desde que o processo de irradiação é iniciado imediatamente após o tempo de incubação das bactérias com o fármaco nas concentrações de 0,5 ou 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Entretanto, o estudo para a determinação da concentração de fármaco incorporado pelas células de bactérias demonstrou que o VBBO foi mais eficientemente retido pelos microorganismos do que a TMPyPH₂ (Tabelas IV.9 e IV.10). Então, esperava-se que, para uma mesma concentração de fármaco, o VBBO fosse mais eficiente que a porfirina nestes estudos na foto-erradicação de bactéria. Os resultados apresentados nas Figuras IV.26 e IV.27 demonstram que, embora o triarilmetano foi mais eficientemente incorporado por *E. coli* ou *S. aureus*, este fármaco não foi tão eficiente quanto a TMPyPH₂ na erradicação destas bactérias.

Para a menor concentração do VBBO (0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), observou-se uma redução de apenas 10² UFC.mL⁻¹ quando uma dose de 265 J.cm⁻² incidem sobre a suspensão de *S. aureus* ou *E. coli* (Figuras IV.26 (A) e IV.27(A)). Para a mesma concentração de porfirina, observou-se uma redução muito mais significativa no número de colônias viáveis com uma dose de apenas 8,1 J.cm⁻² (Figuras IV.24(A) e IV.25(A)). Com o aumento na concentração do VBBO para 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, observou-se que o dano fotodinâmico também aumentou, como resultado do aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio formadas. Entretanto, é necessária a aplicação de 212 J.cm⁻² para induzir 100% de morte na suspensão de *S. aureus*; para a *E. coli*, não se observou a total erradicação do microorganismo, mesmo após a incidência de 265 J.cm⁻² de radiação (a dose máxima aplicada nestes ensaios) sobre uma suspensão desta bactéria (Figuras IV.26(B) e IV.27(B)). Para a TMPyPH₂, uma dose bastante inferior foi suficiente para a total erradicação total de ambos os microorganismos (Figuras IV.24(B) e IV.25(B)).

Como anteriormente descrito, o dano celular induzido pelo VBBO é baseado na produção de espécies reativas de oxigênio como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila (VIOLA et al., 1996). As distâncias de difusão destas espécies radicalares foram estimadas em aproximadamente 3 nm em

fungos (SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000). Para o radical hidroxila, as distâncias de difusão foram estimadas em 6,1 nm em células tumorais do tipo HL-60 (SOBOLEV;JANS;ROSENKRANZ, 2000), sendo estas curtas distâncias de difusão indicativas da alta reatividade destes radicais de oxigênio produzidos.

Espécies reativas de oxigênio como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila são constantemente produzidas em baixos níveis nos organismos vivos (TORTORA;FUNKE;CASE, 2000). Desde que estas espécies são altamente danosas, as células necessitam de um sistema de proteção para neutralizar a ação destes radicais. Este sistema de proteção inclui enzimas como a Superóxido Dismutase (SOD), que age sobre o ânion radical superóxido, bem como a catalase e peroxidase, que controlam os efeitos nocivos do peróxido de hidrogênio:



Em condições de estresse oxidativo, como durante o procedimento fotodinâmico, ocorre um aumento da concentração destas espécies reativas. Em resposta, as células aumentam a atividade destas enzimas protetoras e mais enzimas devem ser sintetizadas se uma quantidade suficiente não está presente para combater as espécies reativas de oxigênio (HALLIWELL;GUTTERIDGE, 1989). Por outro lado, os sistemas vivos não possuem proteção contra a ação do oxigênio singlete.

Baseado nestas informações, é possível supor que a ação fotodinâmica do VBBO é menos eficiente que aquela observada para a TMPyPH₂, ao menos em parte, devido à ação protetora destas enzimas. Por outro lado, considerando-se o tempo total de irradiação da suspensão bacteriana (10 minutos), é pouco provável que a concentração destas enzimas seja significativamente aumentada como

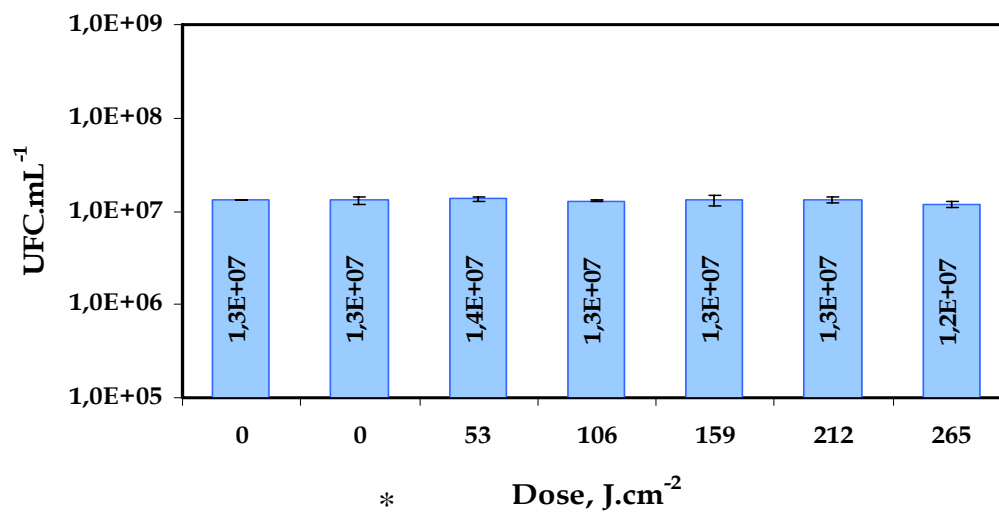
resposta ao estresse oxidativo induzido. Então, a diferença na eficiência fotodinâmica observada para o VBBO e a TMPyPH₂ deve envolver também outros fatores.

A caracterização fotofísica do VBBO demonstra que este fármaco possui baixos rendimentos quânticos de fluorescência e curtos tempos de vida para a permanência no estado singlete excitado. Também, o seu estado triplete foi difícil caracterização, uma vez que não foi possível determinar o espectro do transiente para o composto em água. Esta desestabilização do estado excitado do fármaco ocorre em resposta ao movimento rotacional dos anéis aromáticos do fármaco. Baseado em sua caracterização espectroscópica, é possível supor, então, que este fármaco possua uma eficiência de produção de espécies reativas reduzida quando comparado com a TMPyPH₂. Em adição, a constante de dimerização (K_D) determinada para o VBBO em solução fisiológica (o ambiente em que estes experimentos foram realizados) indicou que este fármaco possui uma forte tendência à dimerização neste meio. Desde que a dimerização afeta as propriedades fotofísicas do fármaco (BORISSEVITCH et al., 1997; RODRIGUEZ;AWRUCH;DICELIO, 2002), o equilíbrio monômero - dímero é um fator determinante para a eficiência fotodinâmica do fármaco.

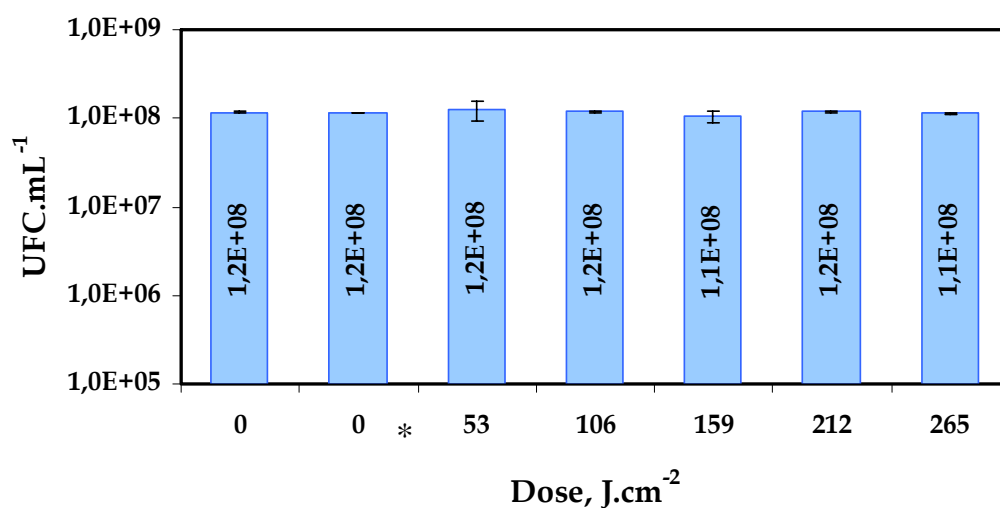
A ZnPc, assim como o VBBO, é um fármaco da segunda geração. Atualmente, este fármaco se encontra nas Fases I e II dos testes clínicos para tratamento de tumores na Europa (GARBO, 1996; HADJUR et al., 1997; JORI, 1996; TEDESCO;ROTTA;LUNARDI, 2003). Neste trabalho, a ftalocianina de zinco veiculada em lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04 está sendo avaliada como fármaco fotossensível para a erradicação de *S. aureus* e *E. coli*. A escolha de um sistema de liberação catiônico para a ZnPc se deve à observação de que microorganismos Gram-negativos, como a *E.coli*, são resistentes à ação de fármacos neutros ou negativamente carregados, mas são afetados pela ação de fármacos positivamente carregados (ASHKENAZI;NITZAN;GÁL, 2003; LACEY;PHILLIPS, 2001; REDDI et al., 2002). Desde que a ZnPc é neutra, os lipossomas carregados contribuem para a incorporação do fármaco pelas bactérias, como demonstrado pelos dados da

Tabela IV.13. Por sua vez, o fármaco parece não ser retido pelos microorganismos após a incubação direta das bactérias em suspensão com uma alíquota de solução estoque da ftalocianina de zinco em DMSO/DMF 50% (v/v). Em acordo com essa observação, não foi observada variação no número viável de UFC.mL⁻¹ das suspensões após excitação do fármaco, como demonstrado na Figura IV.28. Também, desde que o fármaco é insolúvel em meio aquoso (os experimentos foram realizados em solução fisiológica), o fármaco tende a formar agregados neste meio e, conseqüentemente, não são produzidas espécies reativas que intermedeiam o dano fotodinâmico (ANGELI et al., 2000; RODRIGUEZ;AWRUCH;DICELIO, 2002).

A Figura IV.29 apresenta o perfil de erradicação de *E. coli* e *S. aureus* após incubação das bactérias por 20 minutos com os lipossomas catiônicos. Como nos experimentos controle para a determinação da toxicidade da luz e a toxicidade intrínseca da ZnPc para as bactérias, uma suspensão dos microorganismos foi centrifugada e as bactérias re-suspendidas diretamente com os lipossomas. A concentração do fármaco encapsulado no sistema de liberação foi de aproximadamente 3,0 µmol.L⁻¹.



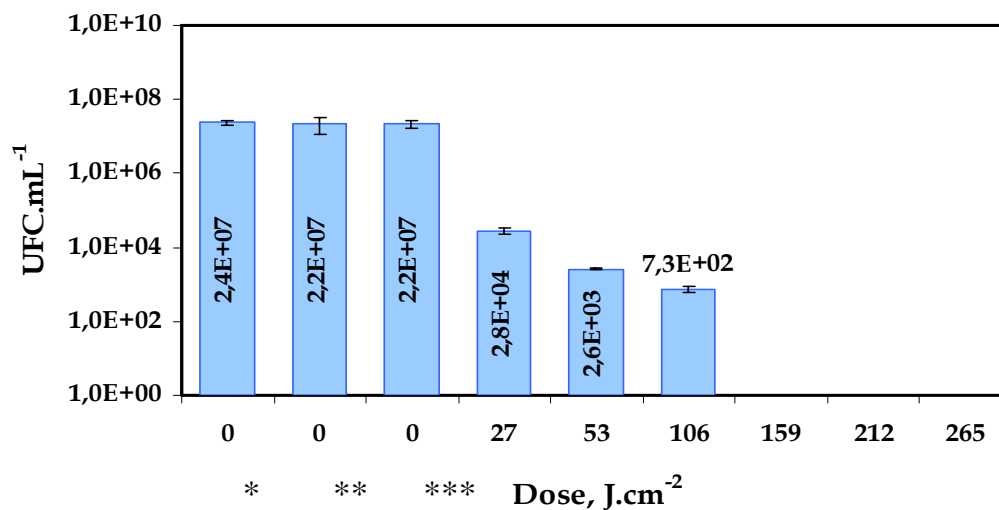
(A)



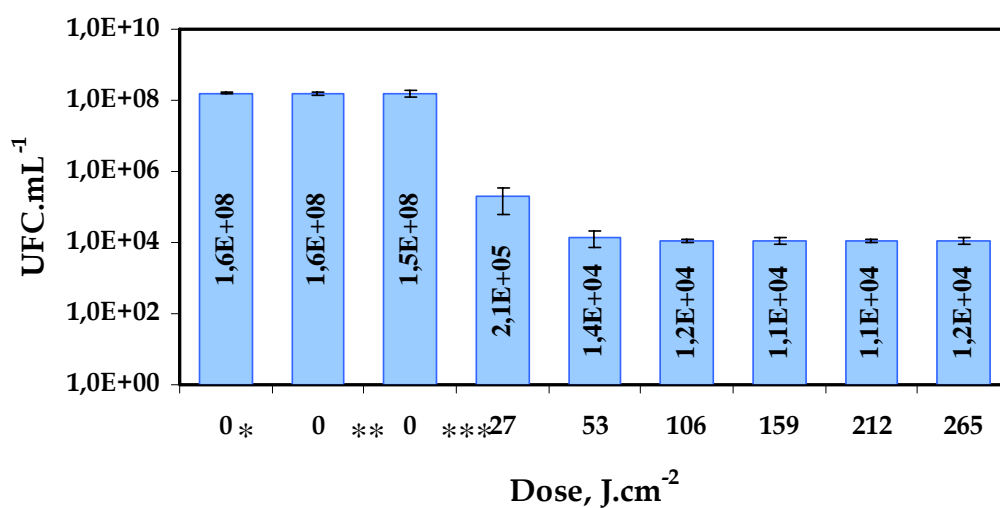
(B)

* Após incubação com o fármaco e sem irradiação.

Figura IV.28: Ação fotodinâmica da ZnPc sobre (A) *S. aureus* e (B) *E. coli* como função da dose de radiação aplicada após incubação da suspensão bacteriana com uma alíquota de solução estoque do fármaco em DMSO/DMF 50% (v/v).



(A)



(B)

* sem incubação com lipossomas e sem luz; ** imediatamente após re-suspensão de bactérias em lipossomas com fármaco, sem incubação e sem luz; *** após incubação das bactérias com lipossomas e sem luz;

Figura IV.29: Decréscimo do número de colônias viáveis de (A) *S. aureus* e (B) *E. coli* como função da dose de radiação aplicada para a ativação da ZnPc. A ftalocianina de zinco foi liberada a partir de lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04. A concentração do fármaco encapsulado foi de aproximadamente 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A caracterização fotofísica da ftalocianina de zinco demonstrou que o fármaco possui um alto rendimento quântico de formação do estado triplete excitado com longos tempos de vida do transiente e um moderado rendimento quântico de produção de oxigênio singlete. Desde que o fármaco foi eficientemente incorporado pelas bactérias após a incubação com os lipossomas (Tabela IV.13), era esperado que este fármaco fosse bastante eficiente na fotorradicação das bactérias. Entretanto, durante o procedimento de irradiação, observou-se o fotobranqueamento da solução que afetou a sua eficiência fotodinâmica. O fotobranqueamento é um termo designado para indicar que o fármaco é degradado pela luz (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004; PANDEY, 2000) e, conseqüentemente, a densidade óptica de sua solução decresce durante a exposição à luz (Figura IV.30).

Para ambas *S. aureus* e *E. coli* observou-se um acentuado decréscimo no número de UFC.mL⁻¹ (aproximadamente 10³ UFC.mL⁻¹) após aplicação de 27 J.cm⁻². Então, o número de colônias decresce mais lentamente. Para *S. aureus*, a total erradicação do microorganismo foi observada após aplicação de 159 J.cm⁻². Para *E. coli*, por sua vez, não foram observadas variações no número de UFC.mL⁻¹ após aplicação de 106 J.cm⁻². Neste caso, a menor eficiência fotodinâmica observada para a erradicação de *E. coli* pode ser atribuída ao fotobranqueamento do fármaco associado com a proteção exercida pela membrana externa do microorganismo Gram-negativo.

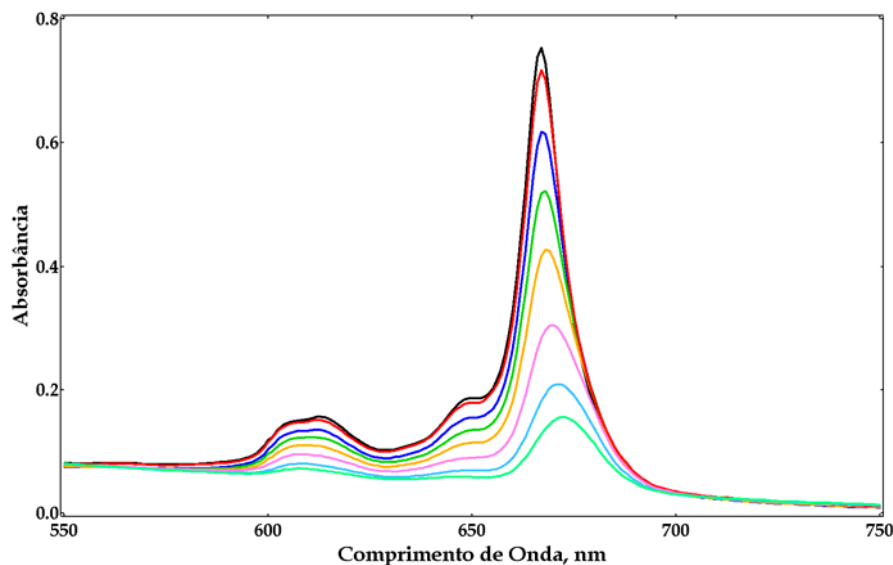


Figura IV.30: Espectros de absorção da ZnPc incorporada em lipossomas catiônicos de DPPC/colesterol/DDAB/LPC na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04 mostrando o fotobranqueamento do fármaco na região das bandas Q. A dose fotodinâmica foi ($J.cm^{-2}$): (—) 0; (—) 27; (—) 53; (—) 80; (—) 106; (—) 159; (—) 212; (—) 265.

O fotobranqueamento pode ocorrer devido a ambos os mecanismos de fotossensibilização (MACDONALD;DOUGHERTY, 2001; NYMAN;HYNNINEN, 2004). Embora a degradação da amostra seja indesejável, o fotobranqueamento pode, entretanto, fornecer um efeito benéfico durante o tratamento de tumores. Estudos têm mostrado que existe uma dose fotodinâmica mínima para a indução de necrose de tecidos tumorais. Se o fotobranqueamento ocorre antes desta dose limite ser atingida, o tecido sadio não poderá sofrer danos (PANDEY, 2000). Portanto, o fotobranqueamento desempenha uma função importante na seletividade que é observada no tratamento. Também, o fotobranqueamento contribui para a redução da fotossensibilidade após tratamento com PDT (NYMAN;HYNNINEN, 2004).

IV.3.5. Influência do Tempo de Incubação Sobre a Eficiência Fotodinâmica dos Fármacos Fotossensíveis na Erradicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Em princípio, a importância do tempo de incubação dos fármacos fotossensíveis com os microorganismos é baseada na necessidade de retenção das moléculas do fármaco pelas células para que o efeito fotodinâmico observado seja eficiente. Neste trabalho, a influência do tempo de incubação sobre a eficiência da TMPyPH₂ e do VBBO na foto-erradicação de *S. aureus* e *E. coli* foi avaliada. Para a ZnPc, este ensaio não foi realizado porque, como discutido no tópico anterior, a retenção do fármaco pelos microorganismos é dependente da interação entre os lipossomas e as bactérias, que pressupõe a necessidade de incubação.

Nestes ensaios, as suspensões das bactérias foram irradiadas imediatamente após a adição do fármaco fotossensível. Desta forma, a retenção de moléculas dos fármacos pelas bactérias não seria eficiente. Os resultados obtidos para ambos os microorganismos (Figuras não apresentadas) não indicaram, entretanto, qualquer diferença significativa na eficiência fotodinâmica dos fármacos com relação àquela observada após a incubação destes com as células (resultados apresentados e discutidos no tópico anterior). Isto é um forte indicativo de que membrana da célula bacteriana é um alvo importante na ação fotodinâmica destes fármacos. Semelhante conclusão foi obtida por Bertoloni e colaboradores (BERTOLONI et al., 2000), em seu estudo de morte foto-induzida de *S. aureus*, utilizando-se a hematoporfirina como agente fotossensível.

Uma possibilidade é que a erradicação fotodinâmica induzida seja iniciada com a peroxidação de lipídios da membrana da bactéria. A peroxidação de lipídio afeta a integridade da membrana, induzindo perda de fluidez e aumento da permeabilidade iônica (SOBOLEV; JANS; ROSENKRANZ, 2000).

Os lipídios são moléculas altamente susceptíveis à ação de espécies reativas e, portanto, muitos estudos têm sido realizados com estes compostos visando uma melhor compreensão do dano fotodinâmico à membrana celular .

A peroxidação de lipídio segue um mecanismo radicalar (NEW, 1990):



O passo inicial para a peroxidação de lipídio é a abstração de um átomo de hidrogênio da cadeia lipídica, com a produção de um radical alquila (L^\bullet). O lipídio radical reage então rapidamente com oxigênio para formar um radical peroxila (LOO^\bullet). O radical peroxila pode, então, reagir com outro ácido graxo insaturado (LH) produzindo o peróxido de lipídio e um novo radical alquila (etapa de propagação).

Peroxidação de ácidos graxos insaturados pode ser induzida por ambos os mecanismos de fotossensibilização (HOEBEKE, 1995). Por sua vez, estudos utilizando lipossomas como modelo de membranas mostraram que, para fármacos produtores de oxigênio singlete, a adição de supressores desta espécie reativa à formulação lipossomal, contribui para a proteção contra a perda da integridade da membrana lipossomas induzida pela peroxidação de lipídio (HOEBEKE, 1995).

V. CONCLUSÕES

Os lipossomas catiônicos foram propostos como sistema de liberação para a ftalocianina de zinco por este ser um fármaco hidrofóbico e potencialmente ativo na Terapia Fotodinâmica. Três diferentes formulações foram preparadas pelo método de injeção etanólica e caracterizadas quanto à sua estabilidade por técnicas espectroscópicas. Formulações estáveis são de fundamental importância, pois previnem a liberação do fármaco para o meio aquoso, mantendo constante a formulação proposta por vários dias. Portanto, contribuem para a eficácia da incorporação dos mesmos pelo tecidos alvos. A primeira formulação proposta (DPPC/colesterol/DDAB na razão molar de lipídio de 1,0/0,49/0,34) demonstrou uma acentuada instabilidade pouco tempo após a sua preparação. Outras duas formulações foram então propostas: DPPC/colesterol/DDAB/LPC e PC/colesterol/DDAB/LPC, ambas na razão molar de lipídio de 1,0/0,45/0,34/0,04, buscando uma formulação mais estável. O perfil de degradação obtido demonstrou que as formulações foram estáveis por 10 dias, sendo adequadas para a utilização como sistemas de liberação em suspensão. Estas formulações possuem tamanho de partículas pequeno, o que em muito favorece a sua interação com as bactérias e, conseqüentemente, a liberação do fármaco nas mesmas. De fato, a ZnPc foi eficientemente incorporada por ambos os microorganismos após a incubação com os lipossomas de DPPC/colesterol/DDAB/LPC.

A caracterização espectroscópica da TMPyPH₂ indicou que a porfirina não é um bom fluoróforo, com baixos valores de rendimento quântico de fluorescência.

Isto foi indicativo de que este fármaco usa de outros caminhos para retornar ao estado fundamental que a desativação a partir do seu primeiro estado excitado singlete. Observou-se que a porfirina é eficiente na formação do seu estado triplete excitado, com tempo de vida longo do transiente e alto rendimento quântico de produção de oxigênio singlete. Portanto, os dados demonstraram que a TMPyPH2 possui as características de um excelente fármaco fotossensível.

A ZnPc possui seu máximo de absorção dentro da Janela Terapêutica, o que faz da ftalocianina um interessante fármaco para os procedimentos fotodinâmicos. A ZnPc apresentou um alto rendimento quântico de produção do seu estado excitado triplete em meio orgânico, indicando que a produção do estado triplete excitado da ftalocianina é eficiente. Também, a ZnPc apresentou longos tempos de vida do transiente quando incorporada no seus sistemas catiônicos de liberação (lipossomas de DPPC/colesterol/DDAB/LPC e PC/colesterol/DDAB/LPC) , bem como moderados rendimentos quânticos de produção de oxigênio singlete nestes ambientes lipossomais. Sabe-se ainda que a ftalocianina é uma eficiente produtora de espécies radicalares de oxigênio como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila, que são altamente danosos para os sistemas biológicos. Portanto, a ZnPc também possui as propriedades fotofísicas de um bom fármaco fotossensível.

O VBBO é um fármaco da segunda geração que está sendo avaliado como fármaco fotossensível para a terapia fotodinâmica. Este fármaco possui uma forte absorção dentro da Janela Terapêutica, que é uma propriedade fundamental entre os fármacos fotossensíveis. Estudos indicam que a rotação dos anéis aromáticos do VBBO induz a rápida desativação do seu estado excitado singlete por conversão interna. Por esta razão, não foi possível caracterizar adequadamente o seu estado singlete excitado. Em adição, embora tenhamos detectado um sinal do transiente para o fármaco em água, com um curto tempo de vida associado, não foi possível determinar o espectro de absorção do transiente para o fármaco neste meio. Isto é um indicativo de que o processo de cruzamento intersistemas não compete significativamente com o processo de conversão interna para o fármaco. Então, aparentemente o VBBO não possui as propriedades de um eficiente fármaco

fotossensível. Entretanto, a produção de espécies reativas de oxigênio como o ânion radical superóxido e o radical hidroxila foi detectada após a excitação do fármaco por técnicas de EPR (VIOLA et al., 1996), o que indica que o fármaco pode induzir dano foto-induzido. Em adição, estudos conduzidos por Indig e colaboradores (BAPTISTA;INDIG, 1998; BARTLETT;INDIG, 1999) indicam que a formação de complexos entre os e a proteína BSA dificultam o processo de relaxação e tornam o processo de cruzamento intersistemas mais competitivo. Nestas condições, a foto-reatividade do fármaco tende a aumentar. Portanto, a associação do fármaco com as bactérias pode ser um fator determinante para a ação fotobiológica do fármaco.

Nos estudos envolvendo os microorganismos, todos os três fármacos utilizados neste trabalho foram retidos pelas bactérias *E. coli* e *S. aureus* (densidade de células entre $10^7 - 10^8$ UFC.mL⁻¹). Não foi observada uma redução significativa do número de células viáveis induzida pelos fármacos *per se* na ausência de luz (toxicidade intrínseca dos fármacos) ou, isoladamente, pela luz utilizada para a excitação dos fármacos fotossensíveis (toxicidade da luz).

A TMPyPH₂ 5,0 µmol.L⁻¹ se mostrou bastante eficiente na erradicação de ambas as bactérias, em acordo com as propriedades fotofísicas determinadas para este fármaco. Menores concentrações do fármaco, embora reduzissem o número de colônias viáveis, não foram eficazes na total erradicação do microorganismo.

O VBBO, por sua vez, mostrou-se muito menos eficiente do que a porfirina na erradicação de *E. coli* e *S. aureus*, mesmo na faixa de concentração mais alta utilizada do fármaco (5,0 µmol.L⁻¹). Nesta condição, mesmo a maior dose fotodinâmica utilizada (265 J.cm⁻²) não foi suficiente para a total erradicação de *E. coli*. Dada a dificuldade para a caracterização fotofísica dos estados excitados singlete e triplete do fármaco, associada com a forte tendência à formação de agregados do fármaco em solução fisiológica (o ambiente em que estes experimentos foram realizados), estas observações são coerentes. A eficiente erradicação dos microorganismos pode ser obtida extendendo-se o tempo de irradiação e, portanto, a dose fotodinâmica fornecida ao sistema.

A ZnPc, embora possua propriedades fotofísicas de um fármaco fotossensível eficiente, teve a sua eficiência comprometida nos ensaios fotodinâmicos pelo processo de fotobranqueamento, que consiste em sua degradação química.

Para ambos os fármacos fotossensíveis, observou-se que a erradicação de *S. aureus* foi mais fácil do que a erradicação de *E. coli*. Esta observação foi atribuída ao efeito protetor exercido pela membrana externa da bactéria Gram-negativa.

Não foi observado qualquer efeito na eficiência da TMPyPH₂ e do VBBO quando os ensaios fotodinâmicos foram realizados sem a incubação dos microorganismos com os fármacos fotossensíveis. Esta observação indica que a membrana da célula bacteriana é um alvo importante na ação fotodinâmica destes fármacos e deve ser mediada pela peroxidação de lipídios da membrana, que induz perda de fluidez e aumento da permeabilidade iônica da célula.

Em resumo, a terapia fotodinâmica mostrou-se eficiente como método alternativo para a erradicação de bactérias patogênicas e sugerem a necessidade e importância do desenvolvimento de pesquisas adicionais neste campo. Por exemplo, os resultados obtidos mostraram a importância dos ensaios visando determinar a eficiência de fármacos para a erradicação destes microorganismos, desde que fármacos promissores como o VBBO e a ZnPc mostraram-se menos eficazes que a TMPyPH₂. Em adição, o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos pode contribuir para a adequação dos protocolos visando erradicação de microorganismos, desde que permite a liberação de uma ampla variedade de fármacos (hidrofóbios e hidrofílicos) e com diferentes cargas efetivas associadas (neutros, catiônicos, aniônicos). O uso de sistemas de liberação contribui, portanto, para um aumento significativo do número de fármacos que podem ser usados em tais ensaios fotodinâmicos.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN,C.M., SHARMAN,W.M., VAN LIER,J.E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** , v.5, p.161-69, 2001.

AMAND,B., BENSASSON,R. Determination of triplet quantum yields by laser flash absorption spectroscopy. **Chemical Physics Letters** , v.34, n.1, p.44-48, 1975.

AMOR,T.B., BERTOLOTTO,L., JORI,G. Porphyrins and related compounds as photoactivatable insecticides. 3. Laboratory and fiels studies. **Photochemistry and Photobiology**, v.71, n.2, p.124-28, 2000.

AMOR,T.B., JORI,G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.915-25, 2000.

ANGELI,N.G., LAGORIO,M.G., SAN ROMÁN,E.A., DICELIO,L.E. *Meso*-Substituted Cationic Porphyrind of Biological Interest. Photophysical and Physicochemical Properties in Solution and Bound to Liposomes. **Photochemistry and Photobiology**, v.72, n.1, p.49-56, 2000.

AOKI,H., FUJI,K., MIYAJIMA,K. Effect of blood on the uptake of charged liposomes by perfused rat liver: cationic glucosamine-modified liposomes interact with erythrocyte and escape phagocytosis by macrophages. **International Journal of Pharmaceutics**, v.149, p.15-23, 1997.

ARBOGAST,J.W., DARMANYAN,A.P., FOOTE,C.S., RUBIN,Y., DIEDERICH,F.N., ALVAREZ,M.M., ANZ,S.J., WHETTEN,R.L. Photophysical Properties of C₆₀. **Journal of Physical Chemistry**, v.95, p.11-12, 1991.

ASHKENAZI,H., NITZAN,Y., GÁL,D. Photodynamic Effects of Antioxidant Substituted Porphyrin Photosensitizers on Gram-positive and -negative bacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v.77, n.2, p.186-91, 2003.

ATKINS,P.W. **Physical Chemistry**. fifth edition.ed. Oxford: Oxford University Press, 1994

BAKKER-WOUDENBERG,I.A.J.M. Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents for treatment of infection or for imaging infectious foci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.19, p.299-311, 2002.

BAPTISTA,M.S., INDIG,G.L. Effect of BSA binding on Photophysical and Photochemical Properties of Triarylmethane dyes. **Journal of Physical Chemistry B**, v.102, n.23, 1998.

BARTLETT,J.A., INDIG,G.L. Effect of Self-association and Protein Binding on the photochemical Reactivity of Triarylmethanes. Implication of Noncovalent Interactions on the competition between Photosensitization mechanisms Type I and Type II. **Photochemistry and Photobiology**, v.70, n.4, p.490-98, 1999.

BERTOLONI,G., LAURO,F.M., CORTELLA,G., MERCHAT,M. Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1475, p.169-74, 2000.

BOHNE, C., REDMOND, R. W., SCAIANO, J. C. **Use of Photophysical Techniques in the Study of Organize Assemblies. In: V. Photochemistry in Organized Constrained Media**. New York: VHC Publishers, 1991.cap.3,p. 79-132.

BONNET,R. Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. **Chemical Society Review**, p.19-33, 1995.

BONNET,R., RIDGE,R.J., LAND,E.J., SINCLAIR,R.S., TAIT,D., TRUSCOTT,T.G. Pulsed Irradiation of Water-soluble Porphyrins. **J.Chem.Soc., Faraday Trans.**, v.78, n.1, p.127-36, 1982.

BORISSEVITCH,I.E., TOMINAGA,T.T., IMASATO,H., TABAK,M. Fluorescence and Optical Absorption Study of Interaction of Two Water soluble porphyrins with Bovine Serum Albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation. **Journal of Luminescence**, v.69, p.65-76, 1996.

BORISSEVITCH,I.E., TOMINAGA,T.T., IMASATO,H., TABAK,M. Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin. **Analytica Chimica Acta**, v.343, p.281-86, 1997.

BORISSEVITCH,I.E., TOMINAGA,T.T., SCHMITT,C.C. Photophysical Studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.114, p.201-07, 1998.

BREZOVÁ,V., PIGOSOVÁ,J., HAVLINOVÁ,B., DVORANOVA,D., DUROVIC,M. EPR study of photochemical transformations of triarylmethanes dyes. **Dyes and Pigments**, v.61, p.177-98, 2004.

BROUARD,M. Laser Photochemistry: Some Recent Advances. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.51, p.17-20, 1990.

BYARUGABA,D.K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.24, p.105-10, 2004.

CALZAVARA-PINTON,P.G., VENTURINI,R., CAPEZZERA,R., SALA,R., ZANE,C. Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. **Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine**, v.20, p.144-47, 2004.

CARRÉ,V., GAUD,O., SYLVAIN,I., BOURDON,O., SPIRO,M., BLAIS,J., GRANET,R., KRAUSZ,P., GUILLOTON,M. Fungicidal Properties of meso-arylglycosylporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , v.48, p.57-62, 1999.

CATUOGNO,C., JONES,M.N. The antibacterial properties of solid supported liposomes on *Streptococcus oralis* biofilms. **International Journal of Pharmaceutics**, v.257, p.125-40, 2003.

CEVEC,G., RICHARDSEN,H. Lipid vesicles and membrane fusion. **Advanced Drug Delivery Reviews** , v.38, p.207-32, 1999.

CHIRVONY,V.S., GALIEVSKY,V.A., KRUK,N.N., FIDY,J., DZHAGAROV,B.M., TURPIN,P. Photophysics of cationic 5,10,15,20-tetrakis-(4-N-methylpyridyl)porphyrin bound to DNA, [poly(dA-dT)]₂ and [poly(dG-dC)]₂: on a possible charge transfer process between guanine and porphyrin in its excited singlet state. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.40, p.154-62, 1997.

COLLECTED AUTHORS **Liposomes: from physical structure to therapeutic applications**. 1st edition.ed. New York: Elsevier / North-Holland Biomedical Press, ed. Knight C. G. 1981

CUBEDDU,R., RAMPONI,R., TARONI,P., CANTI,G. Time-gated fluorescence spectroscopy of porphyrin derivatives and aluminium phthalocyanine incorporated in vivo in a murine ascitic tumor model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.11, p.319-28, 1991.

DAMAISEAU,S., SCHUITMAKER,H.J., LAGERBERG,J.W.M. Increase of the photosensitizing efficiency of bacteriochlorin-a by liposome incorporation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.60, p.50-60, 2001.

DE PAOLI, V. M. **Estudos fotofísicos da meso-tetrakis(4-N-metilpiridil)porfirina e seus complexos com sistemas micelares e com DNA.** 2001. Mestrado-, Universidade de São Paulo, 2001.

DE PAOLI, V.M., DE PAOLI, S.H., BORISSEVITCH, I.E., TEDESCO, A.C. Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH₂ associated with micelles and DNA. **Journal of Alloys and Compounds**, v.344, p.27-31, 2002.

DEMAS, J.N., CROSBY, G.A. Measurement of photoluminescence quantum yields. A review. **The Journal of Physical Chemistry**, v.75, n.8, p.991-1013, 1971.

DHAMIS, S., PHILLIPS, D. Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminium phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.100, p.77-84, 1996.

DIXON, D.W., STEULLET, V. Dimerization of Tetracationic Porphyrins: Ionic Strength dependence. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.69, p.25-32, 1998.

DOLMANS, D.E.J.G.J., UKUMURA, D., JAIN, R.K. Photodynamic therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p.380-87, 2003.

EATON, D.F. Reference Materials for Fluorescence Measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v.60, n.7, p.1107-14, 1988.

FENG, S.-S., RUAN, G., LI, Q.-T. Fabrication and Characterization of a novel drug delivery device liposome-in-microsphere (LIM). **Biomaterials**, v.25, p.5181-89, 2004.

FERNANDEZ, J.M., BILGIN, M.D., GROSSWEINER, L. Singlet Oxygen Generation by Photodynamic Agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.37, p.131-40, 1997.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.1203-09, 1998.

GANDINI,S.C.M., BORISSEVITCH,I.E., PERUSSI,J.R., IMASATO,H., TABAK,M. Aggregation of meso-tetrakis(4-N-methyl-pyridiumyl)porphyrin in its free base, Fe(III) and Mn(III) forms due to the interaction with DNA in aqueous solutions: Optical absorption, fluorescence and light scattering studies. **Journal of Luminescence**, v.78, p.53-61, 1998.

GANDINI,S.C.M., YUSHMANOV,V.E., PERUSSI,J.R., TABAK,M., BORISSEVITCH,I.E. Binding of the Mn(III) complex of *meso*-tetrakis(4-N-methyl-pyridiumyl)porphyrin to DNA. Effect of ionic Strength. **Journal of Inorganic Biochemistry** , v.73, p.35-40, 1999.

GANTCHEV,T.G., VAN LIER,J.E. Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulphonated metallophthalocyanines. **Photochemistry and Photobiology** , v.62, p.123-34, 1995.

GARBO,G.M. Purpurins and benzochlorins as sensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology** , v.34, p.109-16, 1996.

GOLDING,P.S., KING,T.A., MADDOCKS,L., DRUCKER,D.B., BLINKHORN,A.S. Photosensitization of *Staphylococcus aureus* with malachite green isothiocyanate: inactivation efficiency and spectroscopic analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.47, p.202-10, 1998.

HADJUR,C., WAGNIÈRES,G., IHRINGER,F., MONNIER,P.H., VAN DER BERG,H. Production of free radicals O_2^- and $\cdot OH$ by irradiation of the photosensitizer zinc(II)phthalocyanine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.38, p.196-202, 1997.

HALLIWELL,B.; GUTTERIDGE,J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicin**. Second Edition.ed. New York: Oxford University Press, 1989

HOEBEKE,M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.28, p.189-96, 1995.

HUNG,R.R., GRABOWSKI,J.J. A Precise Determination of the Triplet Energy Of C₆₀ By Photoacoustic Calorimetry. **Journal of Physical Chemistry**, v.95, p.6073-75, 1991.

JOHNSTON,L.J., SCHEPP,N.P. Laser Flash Photolysis Studies of the Reactivity of Styrene Radical Cations. **Pure and Applied Chemistry**, v.67, p.71-78, 1995.

JONES,M.N., KASZUBA,M., REBOIRAS,M.D., LYLE,I.G., HILL,K.J., SONG,Y.-H., WILMOT,S.W., CREETH,J.E. The targeting of phospholipid liposomes to bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1196, p.57-64, 1994.

JORI,G. Tumor Photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.36, p.87-93, 1996.

JUARRANZ,A., VILLANUEVA,A., DÍAZ,V., CAÑETE,M. Photodynamic effects of the cationic porphyrin, meso-tetra(4-N-methylpyridyl)porphine, on microtubules of HeLa cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.27, p.47-53, 1995.

KADISH,K.M., MAIYA,B.G., ARAULLO-MCADAMS,C. Spectroscopic Characterization of *meso*-Tetrakis(1-methylpyridium-4-yl)porphyrins, [(TMpyP)H₂]⁴⁺ and [(TMpyP)M]⁴⁺, in Aqueous Micellar Media, Where M = VO²⁺, Cu(II), and Zn(II). **Journal of Physical Chemistry**, v.95, p.427-31, 1991.

KALYANASUNDARAM,K. Photochemistry of Water-Soluble Porphyrins: Comparative Study of Isomeric Tetrapyrrolyl- and Tetrakis(N-Methylpyridiumyl)porphyrins. **Inorganic Chemistry**, v.23, p.2453-59, 1984.

KALYANASUNDARAM,K. **Photochemistry in Microheterogeneous Systems.** Orlando: Academic Press, 1987

KANEDA,Y. Virosomes: Evolution of the liposome as a target drug delivery system. **Advanced Drug Delivery Reviews** , v.43, p.197-205, 2000.

KANO,K., NAKAJIMA,T., TAKEI,M., HASHIMOTO,S. Self Aggregation of Cationic Porphyrin in water. **Bull.Chem.Soc.Jpn.** v.60, p.1281-87, 1987.

KANO,K., TAKEI,M., HASHIMOTO,S. Cationic Porphyrins in Water. ¹H NMR and Fluorescence Studies on Dimer and Molecular Complex Formation. **Journal of Physical Chemistry**, v.94, p.2181-87, 1990.

KAVARNOS,G.J., TURRO,N.J. Photosensitization by Reversible Eletron Transfer: Theories, Experimental Evidence, and Examples. **Chemical Review**, v.86, p.401-49, 1986.

KEMNITZ,K., SAKAGUCHI,T. Water-soluble porphyrin monomer-dimer systems: fluorescence dynamics and thermodynamic properties. **Chemical Physics Letters** , v.196, n.5, p.497-503, 1992.

KESSEL,D., CHENG,M.L. Biological and biophysical properties of the the tumor-localizing component of hematoporphyrin derivative. **Photochemistry and Photobiology**, v.45, p.3053-57, 1991.

KIM,H.-J., GIAS,E.L.M., JONES,M.N. The adsorption of cationic liposomes to *Staphylococcus aureus* biofilms. **Colloids and Surfaces A: Physicocgemical and Engineering Aspects**, v.149, p.561-70, 1999.

KOMERIK,N., WILSON,M. Factors influencing the susceptibility of gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.618-23, 2002.

KOMERIK,N., WILSON,M., POOLE,S. The effect of the photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. **Photochemistry and Photobiology**, v.72, n.5, p.676-80, 2000.

KONAN,Y.N., GURNY,R., ALLÉMANN,E. State of the art in the delivery of sensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.66, p.89-106, 2002.

KRUK,N.N., DZHAGAROV,B.M., GALIEVSKY,V.A., CHIRVONY,V.S., TURPIN,P. Photophysics of the cationic 5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin bound to DNA, [poly(dA-dT)]₂ and [poly(dG-dC)]₂: interaction with molecular oxygen studied by porphyrin triplet-triplet absorption and singlet oxygen luminescence. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.42, p.181-90, 1998a.

KRUK,N.N., SHISHPORENOK,S.I., KOROTKY,A.A., GALIEVSKY,V.A., CHIRVONY,V.S., TURPIN,P. Binding of the cationic 5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin at 5'CG3'and 5'GC3' sequences of hexadeoxyribonucleotides: triplet-triplet transient absorption, steady-state and time-resolved fluorescence and resonance Raman Studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.45, p.67-74, 1998b.

LACERDA, S.H.P. **Estudo Fotofísico da Temperatura na Dinâmica Micelar**. 2001.PhD-, FFCLRP - Universidade de São Paulo, 2001.

LACEY,J.A., PHILLIPS,D. The photosensitisation of *Escherichia coli* using disulphonated aluminium phthalocyanine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v.142, p.145-50, 2001.

LANG,K., KUBÁT,P., LHOTÁK,P., MOSINGER,J.,WAGNEROVÁ,D.M. Photophysical Properties and Photoinduced Electron Transfer within Host-guest complexes of 5,10,15,20-Tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin with water-soluble

calixarenes and cyclodextrines. **Photochemistry and Photobiology** , v.74, n.4, p.558-65, 2001.

LASIC,D.D. Novel Applications of Liposomes. **Trends in Biotechnology**, v.16, n.307, p.321, 1998.

LAURO,F.M., PRETTO,P., COVOLO,L., JORI,G., BERTOLONI,G. Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysineconjugates. **Photochemistry and Photobiology Sciences**, v.1, p.468-70, 2002.

LEWIS,L.M., INDIG,G.L. Solvent effect on the spectroscopic properties of triarylmethane dyes. **Dyes and Pigments**, v.46, p.145-54, 2000.

LEWIS,L.M., INDIG,G.L. Effect of dye aggregation on triarylmethanes-mediated photoinduced damage of hexokinase and DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.67, p.139-48, 2002.

LIVERMORE,D.M. Antibiotic Resistance in Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p.S3-S10, 2000.

LUNARDI,C.N., ROTTA,J.C.G., TEDESCO,A.C. Zinc tetranitrophthalocyanine: isomer separation and photophysical photobiological evaluation in J774A tumor cells. **Journal of Porphyrins and Phtalocyanines**, v.7, p.493-99, 2003.

MACDONALD,I.J., DOUGHERTY,T.J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** , v.5, p.105-29, 2001.

MAGDE,D., BRANNON,J.H., CREMERS,T.L., OLMSTED,J. Absolute Luminescence Yield of Cresyl Violet. A Standard for the red. **The Journal of Physical Chemistry**, v.83, n.6, p.696-99, 1979.

MAREE,M.D., KUZNETSOVA,N., NYOKONG,T. Silicon octaphenoxyphthalocyanines:photostability and singlet oxygen quantum yields.

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, v.140, p.117-25, 2001.

MAREE,M.D., NYOKONG,T. Effect of the oligomerization on the photochemical properties of silicon octaphenoxypthalocyanine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** , v.142, p.39-46, 2001.

MARGALIT,R., SHAKLAI,N., COHEN,S. Fluorimetric Studies on the Dimerization Equilibrium of Protoporphyrin IX and its haemato derivate. **Biochemical Journal**, v.209, p.547-52, 1983.

MARQUARDT,D.W. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear parameters. **J.Soc.Indust.Appl.Math.** v.11, n.2, p.431-41, 1963.

MCKEEGAN,K.S., BORGES-WALMSLEY,I., WALMSLEY,A.R. Microbial and viral drug resistance mechanisms. **Trends in Microbiology**, v.10, n.10, p.S8-S14, 2002.

MERCHAT,M., BERTOLONI,G., GIACOMINI,P., VILLANUEVA,A., JORI,G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.32, p.153-57, 1996a.

MERCHAT,M., SPIKES,J.D., BERTOLONI,G., JORI,G. Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.35, p.149-57, 1996b.

MINNOCK,A., VERNON,D.I., SCHOFIELD,J., GRIFFITHS,J., PARISH,J.H., BROWN,S.B. Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both gram-negative and gram-positive bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.32, n.159, p.164, 1996.

NAGAYASU,A., UCHIYAMA,K., KIWADA,H. The size of liposomes: a factor which affects this targeting efficiency to tumor and therapeutic activity of

liposomal antitumor drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.40, p.75-82, 1999.

NAGUIB,Y.M.A., STEEL,C., YOUNG,M.A. Decay kinetics of photosensitized triplet crystal violet in acetonitrile. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** , v.141, p.33-38, 2001.

NEELY,A.N., HOLDER,I.A. Antimicrobial resistance. **Burns**, v.25, p.17-24, 1999.

NEW,R.R.C. **Liposomes, a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1990

NIEDRE,M., PATTERSON,M.S., WILSON,B.C. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *in vivo* and tissues *in vivo*. **Photochemistry and Photobiology**, v.75, n.4, p.382-91, 2002.

NISHIJIMA,S.KUROKAWA,I. Antimicrobial resistance of *staphylococcus aureus* isolated from skin infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.19, p.241-43, 2002.

NORRICH,R.G.W.POTTER,G.**Nature** , v.164, p.658, 1949.

NUNES, S. M. **Estudos Fotoquímicos e Fotofísicos das Interações entre Ftalocianinas e Lipossomos**. 1999. Mestrado-, FFCLR/USP, 1999.

NUNES, S. M. **A potencialidade do uso de diferentes sistemas de liberação de fármacos na Terapia Fotodinâmica: preparação de estudos fotofísicos**. 2003.PhD-, FFCLRP/USP, 2003.

NUNES,S.M.T., SGUIIIA,F.S., TEDESCO,A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminium phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.2, p.273-84, 2004.

NYMAN,E.S., HYNNINEN,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.

OLIVEIRA,C.A., MACHADO,A.E.H., PESSINE,F.B.T. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc-phthalocynine and cholesterol for use in photodynamic therapy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.133, p.69-78, 2005.

OULMI,D., MAILLARD,P., VEVEZ-BIZET,C., MOMENTEAU,M., BRAULT,D. Glycosylated Porphyrins: Characterization of Association in Aqueous Solution by Absorption and Fluorescence Spectroscopies and Determination of Singlet Oxygen Yield in Organic Media. **Photochemistry and Photobiology** , v.67, n.5, p.511-18, 1998.

OWENS,J.W., SMITH,R., ROBINSON,R., ROBINS,M. Photophysical properties of porphyrins, phthalocyanines, and benzochlorins. **Inorganic Chimica Acta** , v.279, p.226-31, 1998.

PANDEY,R.K. Recent Advances in Photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** , v.4, p.368-73, 2000.

PASTERNAK,R.F., GIBBS,E.J., GAUDEMER,A., ANTEBI,A., BASSNER,S., DE POY,L., TURNER,D.H., WILLIAMS,A., LAPLACE,F., LANSARD,M.H., MERIENNE,C., PERRÉE-FAUVET,M. molecular Complexes of Nucleosides and Nucleotides with a Monomeric Cationic Porphyrin and Some of its Metal Derivatives. **Journal of American Chemical Society**, v.107, p.8179-86, 1985.

PASTERNAK,R.F., HUBER,P.R., BOYD,P., ENGASSER,G., FRANCESCONI,L., GIBBS,E., FASELLA,P., VENTURO,G.C., HINDS,L.d.C. On the aggregation of Meso-Substitued Water-Soluble porphyrins. **Journal of American Chemical Society**, v.94, n.4511, p.4517, 1972.

PELCZAR,M.; REID,R.; CHAN,E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Macgraw-Hill do Brasil, 1980

PHOENIX,D.A., SAYED,Z., HUSSAIN,S., HARRIS,F.,WAINWRIGHT,M. The phototoxicity of phenothiazinium derivates against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.39, p.17-22, 2003.

POLO,L., SEGALLA,A., BERTOLONI,G., JORI,G., SCHAFFNER,K., REDDI,E. Polylysine-Porphycene conjugates as efficient photosensitizers for the inactivation of microbial pathogens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.59, p.152-58, 2000.

POOLE,K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p.500-08, 2001.

RAMIAH,D., ECKERT,I., KALLIAT,T.A., WEIDENFELLER,L., EPE,B. Squaraine dyes for photodynamic therapy: study of their cytotoxicity and genotoxicity in bacteria and mammalian cells. **Photochemistry and Photobiology**, v.76, n.6, p.672-77, 2002.

RANG,H.P.;DALE,M.M.; RITTER,J.M. **Farmacologia**. Terceira Edição.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1995

REDDI,E., CECCON,M., VALDUGA,G., JORI,G., BOMMER,J.C., ELISEI,F., LATTERINI,L., MAZZUCATO,U. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v.75, n.5, p.462-70, 2002.

RIGOLI, I. C. **Estudo da Dinâmica de N-Alquil Éteres Tripletes em sistemas Organizados**. 2000.Master-, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2000.

ROBINSON,A.M., BANNESTER,M., CREETH,J.E., JONES,M.N. The interaction of phospholipids liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.186, p.43-53, 2001.

RODAL,G.H., RODAL,S.K., MOAN,J., BERG,K. Liposome-bound Zn(II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 45, p.150-59, 1998.

RÖDER,B., HANKE,Th., OELCKERS,St., HACKBARTH,St., SYMIETZ,Ch. Photophysical Properties of pheophorbide a in solution and in model of membrane systems. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.4, p.37-44, 2000.

RODRIGUEZ,M.E., AWRUCH,J., DICELIO,L. Photophysical properties of Zn(II) phthalocyanines incorporated into liposomes. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines** , v.6, p.122-29, 2002.

ROMANOVA,N.A., BROVKO,L.Y., MOORE,L., POMETUN,E., SAVITSKY,A.P., UGAROVA,N.N., GRIFFITHS,M.W. Assessment of Photodynamic Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* by using ATP Bioluminescence. **Applied and Environmental Microbiology** , v.69, n.11, p.6393-98, 2003.

ROTTA,J.C.G., LUNARDI,C.N., TEDESCO,A.C. Nitric Oxide Release from the S-Nitrosothiols_Zinc Phthalocyanine complex by flash photolysis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.587-94, 2003.

ROVALDI,C.R., PIEVSKY,A., SOLE,N.A., FRIDEN,P.M., ROTHSTEIN,D.M., SPACCIAPOLI,P. Photoactive Porphyrin Derivative with Broad-Spectrum Activity against Oral Pathogens In Vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.12, p.3364-67, 2000.

RYTER,S.W., TYRRELL,R.M. Singlet molecular Oxygen ($^1\text{O}_2$): A Possible Effector of Eukaryotic Gene Expression. **Free Radical Biology & Medicine**, v.24, n.9, p.1520-34, 1998.

SAHOO,S.K., LABHASETWAR,V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v.8, n.24, p.1112-20, 2003.

SANDERSON,N.M., GUO,B., JACOBS,A.E., HANDLEY,P.S., CUNNIFFE,J.G., JONES,M.N. The interaction of cationic liposomes with the skin-associated bacterium *Staphylococcus epidermis*: effects of ionic strength and temperature. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.207-14, 1996.

SCAIANO,J.C. Exploratory laser flash photolysis study of free radicals and magnetic field effects in melatonin chemistry. **Journal of Pineal Research**, v.19, n.4, p.189-95, 1995.

SCHÄFER,M., SCHIMITZ,C., FACIUS,R., HORNECK,G., MILOW,B., FUNKEN,K.-H., ORTNER,J. Systematic study of parameters influencing the action of rose bengal with visible light on bacterial cells: comparison between the biological effect and singlet oxygen production. **Photochemistry and Photobiology**, v.71, n.5, p.514-23, 2000.

SHAWAR,R., COOPER,B.H. Comparative kinetics of hematoporphirin derivative uptake and susceptibility of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus faecalis* to photodynamic action. **Photochemistry and Photobiology**, v.52, n.4, p.825-30, 1990.

SHLAES,D.M. The abandonment of antibacterials: why and wherefore? **Current Opinion in Pharmacology**, v.3, p.470-73, 2003.

SMETANA,Z., BEN-HUR,E., MENDELSON,E., SALZBERG,S., WAGNER,P., MALIK,Z. Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.44, p.77-83, 1998.

SOBOLEV,A., JANS,D.A., ROSENKRANZ,A.A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v.73, p.51-90, 2000.

SOL,V., BRANLAND,P., CHALEIX,V., GRANET,R., GUILLOTON,M., LAMARCHE,F., VERNEUIL,B., KRAUSZ,P. Amino porphyrins as photoinhibitors of Gram-positive and -negative bacteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p.4207-11, 2004.

SOL,V., BRANLAND,P., GRANET,C., KALDAPA,B., VERNEUIL,B., KRAUSZ,P. Nitroglycosylated meso-arylporphyrins as photoinhibitors of gram-positive bacteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** , v.8, p.3007-10, 1998.

SOUKOS,N.S., WILSON,M., BURNS,T., SPEIGHT,P.M. Photodynamic Effects of Toluidine Blue on Human Oral Keratinocytes and Fibroblasts and *Streptococcus sanguis* Evaluated In Vitro. **Laser in Surgery and Medicine**, v.18, p.253-59, 1996.

SPIKES, J. D. **Photosensitization**. In: SMITH, K. C. *The Science of Photobiology*. New York: Plenum Press, 1977.p. 87

SPIKES, J. D. **Photosensitization**. In: SMITH, K. C. *The Science of Photobiology*. Second Edition .ed. New York: Plenum Press, 1989.cap.chapter 3,p. 79-110.

SPILLER,W., KLIESCH,H., WÖHRLE,D., HACKBARTH,S., RÖDER,B., SCHNURPFEIL,G. Singlet Oxygen Quantum Yields of Different Photosensitizers in Polar Solvents and Micellar Solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.2, p.145-58, 1998.

STERNBERG,E.D., DOLPHIN,D. Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, v.54, p.4151-202, 1998.

STEWART,F., BAAS,P., STAR,W. What does photodynamic therapy have to offer radiation oncologists (or their cancer patients?). **Radiotherapy and Oncology**, v.48, p.233-48, 1998.

STOJILJKOVIC,I., KUMAR,V., SRINIVASAN,N. Non-iron methalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake system of pathogenic bacteria. **Molecular Microbiology** , v.31, n.2, p.429-42, 1999.

SZOCS,K., GABOR,F., CSIK,G., FIDY,J. δ - Aminolevulinic acid-induced porphyrin synthesis and photodynamic inactivation of *Escherichia coli* B. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.50, p.8-17, 1999.

SZPAKOVSKY,M., REISS,J., GRACZYK,S., LASOCKI,K., GRZYBOWSKI,J. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to a photodynamic effect of arginine-haematoporphyrin derivative. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.8, p.23-27, 1997.

TAYLOR,P.W., STAPLETON,P.D., LUZIO,J.P. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, v.7, n.21, p.1086-91, 2002.

TEDESCO, A. C. **Estudos Fotoquímicos, Fotofísicos e Fotobiológicos de agentes fotossensibilizadores aplicáveis à terapia fotodinâmica de neoplasias**. 2001., Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto; USP, 2001.

TEDESCO,A.C., ROTTA,J.C.G., LUNARDI,C.N. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Current Organic Chemistry**, v.7, n.2, p.187-96, 2003.

TORTORA,G.J.;FUNKE,B.R.;CASE,C.L. **Microbiologia**. 6. ed.; Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000

TURCHIELLO,R., VENA,F., MAILLARD,P., SOUZA,P., BENTLEY,M., TEDESCO,A. Cubic Phase gel as drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.70, p.1-6, 2003.

TURRO,N. **Molecular Photochemistry**. New York: W.A. Benjamin Inc., 1978

VAN HENEGOUWEN,G.M.J.B. Medicinal Photochemistry: Phototoxic And Phototherapeutic Aspects of Drugs. **Advances in Drug Research**, v.29, p.79-170, 1997.

VERGELDT,F.J., KOEHORST,R.B.M., VAN HOEK,A., SCHAAFSMA,T.J. Intramolecular interactions in the ground and excited state of tetrakis(N-methylpyridyl)porphyrins. **Journal of Physical Chemistry**, v.99, p.4397-405, 1995.

VERMURIS,, RHODES,C.T. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.70, p.95-111, 1995.

VIOLA,A., HADJUR,C., JEUNET,A., JULLIARD,M. Electron paramagnetic resonance evidence of the generation of superoxide ($O^{\bullet-}$) and Hydroxyl ($\bullet OH$) radicals by irradiation of a new photodynamic therapy photosensitizer, victoria blue BO. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.32, p.49-58, 1996.

VIOLA,A., LUTZ,N., MAROC,C., CHABANNON,C., JULLIARD,M., COZZONE,P.J. Metabolic effects of photodynamically induced apoptosis in a erythroleukemic cell line. A ^{31}P NMR spectroscopic study of victoria-blue-BO-sensitized TF-1 cells. **International Journal of Cancer**, v.85, p.733-39, 2000.

VOGEL,A. **Análise Inorgânica Quantitativa**. 4th.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1981

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

WAINWRIGHT,M. The emerging chemistry of blood product disinfection. **Chemical Society Reviews**, v.31, p.128-36, 2002.

WAINWRIGHT,M. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.510-20, 2003.

WAINWRIGHT,M., PHOENIX,D.A., MARLAND,J., WAREING,D.R.A., BOLTON,F.J. A study of the photobactericidal activity in the phenotyazinium series. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.19, p.75-80, 1997.

WATVE,R.M., BELLARE,J.R. Manufacture of liposomes: a review. **Current Science**, v.68, p.715-24, 1995.

WILSON,M. Photolysis of oral bacteria and its potential use in the treatment of caries and periodontal diseases. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.299-306, 1993.

WILSON,M., BURNS,T., PRATTEM,J., PEARSON,G.J. Bacteria in supragingival plaque samples can be killed by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, p.569-74, 1995.

WOODLE,M.C., LASIC,D.D. Sterically stabilized liposomes. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1113, p.171-99, 1992.

YANG,H.-Y., ZHANG,Z., HAN,Z.-H., YAO,S.-D. An investigation of the triplet state of pheophorbide a using laser flash photolysis. **Dyes and Pigments**, v.46, p.139-43, 2000.

ZEINA,B., GREENMAN,J., PURCELL,W.M., DAS,B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v.144, p.274-78, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)