

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

RUY CARVALHO MATTOSINHO DE CASTRO FERRAZ

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DA QUIMILUMINESCÊNCIA COMO FONTE DE
LUZ EM TERAPIA FOTODINÂMICA PARA CONTROLE MICROBIANO

São Carlos – SP
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RUY CARVALHO MATTOSINHO DE CASTRO FERRAZ

Avaliação da viabilidade da quimiluminescência como fonte de luz em terapia fotodinâmica
para controle microbiano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Física do Instituto de Física de
São Carlos da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Física Aplicada –
Opção Física Biomolecular.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristina Kurachi

São Carlos – SP
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Ferraz, Ruy Carvalho Mattosinho de Castro

Avaliação da viabilidade da quimiluminescência como fonte de luz em terapia fotodinâmica para controle microbiano / Ruy Carvalho Mattosinho de Castro Ferraz; orientadora Cristina Kurachi.-- São Carlos, 2010.

64 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de concentração: Física Aplicada – opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Quimiluminescência. 3. Controle microbiano. 4. Baixa intensidade. I. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos
meus pais, irmãos e a Ana.
Vocês fazem parte desta conquista.
Muito Obrigado. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus, por proporcionar a vida.

Agradeço aos meus pais, Egberto e Christina, que sempre me proporcionaram condições e apoio nos meus projetos. Sem o apoio de vocês, nada disso seria possível. Obrigado! Amo vocês.

Agradeço aos meus irmãos, Karina e Leandro, por toda a alegria e conforto que sempre estavam dispostos a proporcionar. Às vezes sem saber que estavam me apoiando, me ajudavam, e muito. Muito obrigado. Amo vocês.

Agradeço a Ana. Sempre ao meu lado, em todos os momentos, com carinho, paciência, e amor me apoiando e me fortalecendo. Agradeço ao carinho, apoio e atenção de toda a família da Ana, em especial ao Dininho, Martha e Marina. Ana, essa conquista também é sua. Amo você.

Agradeço a pesquisadora Débora Balogh do IFSC, pelo apoio, orientações e atenção no início da pesquisa.

Agradeço ao Professor Dr. Baader/IQ-USP e ao seu aluno Fernando Heering pela oportunidade oferecida e pela atenção em seu Laboratório de Quimiluminescência Orgânica. Parte deste trabalho deve à vocês.

Agradeço aos professores da FOAr/UNESP, em especial a Prof^a Dr^a Ana Claudia Pavarina e suas alunas Ana Paula Dias Ribeiro e Flávia Zardo Trindade. Agradeço por toda a atenção, paciência, e orientações que me ofereceram. Parte deste trabalho, também é conquista de vocês.

Agradeço a todos os colegas e amigos do Grupo de Óptica, ao pessoal do LAT, LIEPO e da Oficina. Lili, Clóvis, Gustavo Sabino, Sebastião, Dirceu, Denis, Jeison, Everton, Gustavo Nicolodelli, Fernando, Mardoqueu, Natália, Juçaíra, Vitor e todos os demais da Biofotônica. Cada um em momentos diferentes e em momentos especiais, pelo apoio e orientações. Em especial, Carla e Emery pelas várias horas de atenção e orientação.

Agradeço ao Prof Dr. Vanderlei Bagnato por todos os momentos de ensino e conhecimento.

Agradeço em especial a minha orientadora, Prof^a Dr^a Cristina Kurachi, por toda dedicação, ensino e atenção.

Agradeço ao CNPq pelo suporte financeiro.

RESUMO

FERRAZ, R. C. M. C., **Avaliação da viabilidade da quimiluminescência como fonte de luz em terapia fotodinâmica para controle microbiano**. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

A terapia fotodinâmica é a combinação do agente fotossensibilizador, da fonte de luz e do oxigênio que pode resultar na oxidação de biomoléculas e gerar danos celulares. Esta técnica é aplicada em diversas situações, desde o controle microbiológico até o tratamento de câncer. A maioria dos estudos utiliza as fontes de luz tradicionais, ou seja, *lasers*, sistemas à LED e lâmpadas. No entanto, poucos são os estudos que se concentram em propostas de fonte de luz alternativas. Iluminação portátil, flexível e independente de energia elétrica são características de grande interesse, principalmente, aos países em desenvolvimento no qual há uma grande parcela da população não assistida por hospitais de referência, além de cidades que não possuem o fornecimento de energia elétrica. Neste estudo, foi avaliada a viabilidade do uso, *in vitro*, da quimiluminescência como uma fonte de luz para a terapia fotodinâmica, induzindo a redução microbiana de *Staphylococcus aureus*. A quimiluminescência é uma reação química onde por meio da mistura de reagentes líquidos ocorre a emissão de luz sem a necessidade de qualquer ativação externa. Previamente aos estudos da aplicação terapia fotodinâmica *in vitro*, foram avaliadas diversas reações de quimiluminescência no intuito de estabelecer as características mais viáveis ao efeito fotodinâmico. Através de um modelo similar a teoria de Förster, foi estabelecida a relação espectral entre a banda de emissão da quimiluminescência e o espectro de absorção do fotossensibilizador Photogem[®]. Na análise *in vitro*, o agente fotossensível foi utilizado em quatro concentrações entre 6 e 75 µg/ml e iluminação entre 60 minutos até 240 minutos. Longos tempos de irradiação são necessários devido a baixa intensidade de luz oriunda da quimiluminescência (intervalo de algumas dezenas de µW/cm²). Os resultados demonstraram que o longo tempo de experimento não gerou redução microbiana nos grupos em que foi avaliado o efeito isolado da fonte de luz e do fotossensibilizador. Porém, quando foi avaliado o efeito fotodinâmico na combinação da reação química e o fotossensibilizador, atingiu-se redução da bactéria próxima de 98% nas maiores concentrações de Photogem[®] e de dose de luz aplicada. Este estudo demonstra a possibilidade do uso da quimiluminescência como uma fonte de luz alternativa no controle microbiano através do efeito fotodinâmico, além de apresentar as vantagens de irradiação portátil, flexível entre outras quando comparada com as fontes de luz convencionais.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Quimiluminescência. Controle microbiano. Baixa intensidade.

ABSTRACT

FERRAZ, R. C. M. C., **Evaluation of the viability of the chemiluminescence as a PDT light source for microbial control**. 2010. 64p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Photodynamic therapy is a combined action of the photosensitizer, a light source and the oxygen that may result in an oxidation of biomolecules and cellular damage. This technique is used for several applications, from microbial control to cancer treatment. The majority of the studies use conventional light sources as lasers, LED systems and lamps, just a few focus on the proposal of alternative light sources. Portable, flexible and non-wired illumination are desired characteristics especially for developing countries where still great part of the population is not assisted by hospitals and several regions do not have electricity. In this study, the viability of chemiluminescence use a PDT light source was evaluated in the *in vitro* microbial reduction of *Staphylococcus aureus*. Chemiluminescence is a chemical reaction where after the reagents mixture a light emission occurs. Previously to the microorganism experiment, several chemiluminescence protocols were tested for the determination of the best reaction for this study photodynamic effect. Using a mathematical model similar to the Förster theory, the spectral relation of chemiluminescence emission and Photogem[®] absorption band was calculated. The photosensitizer was tested at four concentrations between 6 and 75 µg/ml and illumination at exposure times between 60 and 240 minutes. Long exposure times were needed due to the low irradiances of about dozens of µW/cm². The results showed that the experiment long procedure did not result in microbial reduction, which was verified at the individual effect of light and of photosensitizer. On the other hand, the photodynamic effect produced by the combination of the photosensitizer and chemiluminescence resulted in 98% microorganism reduction for the higher Photogem[®] concentrations and light dose. This study shows the viability of the chemiluminescence as a light source for the microbial control by PDT, associated with the characteristics of a portable and flexible illumination device.

Keywords: Photodynamic therapy. Chemiluminescence. Microbial control. Low irradiance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espectrofotômetro utilizado na avaliação da reação química.....	22
Figura 2 - Fotos da iluminação nas amostras durante o experimento	28
Figura 3 - Quimiluminescência industrializada com diferentes ativadores.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Intensidade de luz emitida em função das concentrações do IMI-H e H ₂ O ₂	33
Gráfico 2 – Tempo de T _{1/2} dos sistemas com diferentes concentrações de IMI-H e H ₂ O ₂	34
Gráfico 3 - Intensidade de luz de acordo com a concentração do ACT.	35
Gráfico 4 - Intensidade de luz pelos vários ACT em dois solventes diferentes	36
Gráfico 5 - T _{1/2} dos ACTs em dois solventes diferentes	37
Gráfico 6 - Espectro de emissão da amostra EtOAc+BPEA	39
Gráfico 7 - Decaimento da luminosidade da reação EtOAc+BPEA	40
Gráfico 8 - Espectro de emissão da amostra de quimiluminescência industrializada	41
Gráfico 9 - Decaimento da intensidade luminosidade perante o tempo	42
Gráfico 10 - Espectro de absorção na região do visível do Photogem®	43
Gráfico 11 - Espectro de emissão do LED verde	44
Gráfico 12 - Espectro de emissão do LED vermelho	44
Gráfico 13 - Espectros normalizados pelo pico.....	45
Gráfico 14 - UFC dos grupos 1.1, 1.2 e 1.3.....	48
Gráfico 15 - UFC dos grupos 2.1, 2.2, e 2.3.....	49
Gráfico 16 - UFC para o grupo III nos tempos avaliados	50
Gráfico 17 - UFC para o grupo IV	51
Gráfico 18 - Resultados dos grupos I, II, III e IV em 60 minutos avaliados.....	53
Gráfico 19 - Resultados dos grupos I, II, III e IV em 120 minutos avaliados.....	54
Gráfico 20 - Resultados dos grupos I, II, III e IV em 240 minutos avaliados.....	55
Gráfico 21 - Resultados dos grupos I, II, III e IV nos três tempos avaliados.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos analisados na etapa III.....	27
Tabela 2 - Subgrupos analisados no grupo I.....	29
Tabela 3 - Subgrupos analisados no grupo II.....	29
Tabela 4 - Subgrupos analisados no grupo III	30
Tabela 5 - Subgrupos analisados no grupo IV	30
Tabela 6 - Análise de diferentes ativadores e suas características	32
Tabela 7 - Pico de emissão das oito reações de QL avaliadas	37
Tabela 8 - Análise ponderada das reações de quimiluminescência avaliadas	39
Tabela 9 - Valores dos índices de η_{λ} e $\eta_e(\lambda)$	47
Tabela 10 - A diferença de UFC para os diferentes subgrupos avaliados	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

TFD	Terapia Fotodinamica
QL	Quimiluminescência
PDT	Photodynamic Therapy
FS	Fotossensibilizador
LED	Diodo Emissor de Luz
TCPO	Oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila)
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ACT	Ativador
BPEA	9,10-bis(feniletinil)antraceno
IMI-H	Imidazol
EtOAc	Acetato de Etila
CIEEL	Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence
ALA	Ácido 5-aminolevulinico
PpIX	Protoporfirina IX
LLLT	Low Level Light Treatment
MO	Microrganismo
USP	Universidade de São Paulo
IQ	Instituto de Química
NaOH	Hidróxido de Sódio
PE	Ponto de Ebulição
P ₂ O ₅	Pentóxido de Fósforo
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
IAEs	Índice de Aproveitamento Espectral
η_{λ}	Valor adimensional referente ao IAEs
IAEn	Índice de Aproveitamento Energético
$\eta_e(\lambda)$	Valor adimensional referente ao IAEn em função do comprimento de onda
ATCC	American Type Culture Collection
TSB	Tryptic Soy Broth
nm	Nanômetro
μ g	micrograma
ml	Mililitro
cm ²	Centímetro quadrado
u.a.	Unidade Arbitrária
J	Joule
μ l	Microlitro
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
T _{1/2}	Tempo de meia-vida
λ	Comprimento de onda
DBF	Dibutylftalato
DPA	9,10-difenilantraceno
ROD	Rodamina
mM	Milimolar
min	Minutos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Terapia fotodinâmica: Definições e características	13
1.2 Fonte de luz utilizada em Terapia Fotodinâmica	14
1.3 Quimiluminescências: fundamentos e características	15
1.4 Intensidade baixa e tempo prolongado na Terapia Fotodinâmica.....	16
1.5 Resistência antibioticoterapia e TFD em microbiologia	17
2 OBJETIVO.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Procedimentos da etapa I	21
3.1.1 Reagente e suas manipulações	21
3.1.2 Estabelecimento da reação de quimiluminescência	22
3.2 Planejamento da etapa II	23
3.3 Desenho experimental da etapa III.....	24
3.3.1 Agente fotossensibilizador	24
3.3.2 Fonte de luz	25
3.3.3 Preparo dos materiais microbiológicos	25
3.3.4 Procedimento in vitro.....	26
3.4.5 Análise dos resultados.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
4.1 Etapa I	32
4.2 Etapa II.....	43
4.3 Etapa III.....	48
5 FUTURAS DIREÇÕES	57
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Terapia fotodinâmica: Definições e características

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica utilizada em diversas práticas desde o tratamento de câncer até o controle microbiano. Muitos avanços são observados nas últimas décadas, porém desde o início do século XX o efeito fotodinâmica já era conhecido (1).

A base desta técnica é a presença de três elementos fundamentais: fotossensibilizador, fonte de luz e oxigênio. O fotossensibilizador (FS) é uma substância capaz de se tornar ativa apenas após a absorção de fótons nas condições de iluminação. O agente fotossensível ativo (excitado) tende a retornar ao seu estado fundamental, sendo necessária a liberação da energia absorvida. Essa energia liberada pode ser absorvida por alguns substratos, entre eles, o oxigênio tornando-se uma espécie altamente reativa e de meia-vida curta.

Os outros substratos ativados são, por exemplo, superóxidos e radicais livres, porém a produção do oxigênio *singlete* é um dos principais fatores no sucesso da terapêutica (2). O oxigênio, em condições normais, se encontra no estado fundamental *triplete* e através da transferência de energia do FS excitado, o oxigênio forma um estado eletrônico citotóxico, denominado oxigênio *singlete*. Este estado é altamente reativo promovendo principalmente o dano celular através da lise de membranas (3, 4). A citotoxicidade destes substratos ativados pode gerar danos às células devido à oxidação de componentes moleculares, danos na membrana celular, organelas, mitocôndrias e no núcleo celular, como é estabelecido pela literatura (5, 6). O oxigênio, geralmente, é de fácil acesso e disponibilidade na região de interesse, seja um tecido neoplásico (oxigênio molecular tecidual) ou um estudo *in vitro* em microbiologia (oxigênio do sistema).

A fonte de luz é a responsável pelo início do processo fotodinâmico. A fonte de luz deve possuir certas características que satisfaçam as necessidades da aplicação e um dos principais fatores é a relação do espectro de emissão desta fonte com o espectro de absorção do FS utilizado.

1.2 Fonte de luz utilizada em Terapia Fotodinâmica

As fontes de luz tradicionalmente utilizadas na TFD são, entre outras, as lâmpadas, *lasers* e sistemas à base de diodo emissor de luz (LED). Entre as lâmpadas, se destacam as de tungstênio, fluorescente, sódio com fósforo, xenônio e outras. Essas possuem uma intensidade alta, um espectro eletromagnético amplo e de difícil acoplamento óptico por fibras. No extremo desta característica, há a fonte de *laser* com fótons colimados, em fase e monocromático (comprimento de onda único).

Existem vários tipos de *laser*, como por exemplo, argônio, diodo entre outros. Essa fonte de luz é altamente eficaz no acoplamento óptico e amplamente utilizada na TFD. Há alguns anos, a fonte de luz baseada à LED é estudada e aplicada em muitas áreas da TFD, desde o tratamento de certas lesões em câncer de pele até a iluminação de sistemas de controle microbiano. O fator diferencial das vantagens do LED é que o custo dos sistemas *lasers* é elevado tanto na aquisição como em sua manutenção (7).

Outra característica relevante é a técnica utilizada para realizar a iluminação da área desejada. Através do *laser* é possível fazer o acoplamento por meio de fibra óptica, sendo possível iluminar áreas específicas e também fazer aplicações intersticiais. A fonte LED, normalmente não é acoplada a uma fibra óptica, porém, o aparelho de LED pode ser montado em diversas geometrias, com melhor adaptação à anatomia da região iluminada, enquanto que as lâmpadas não apresentam eficiente acoplamento óptico (2, 7).

Apesar destas vantagens, ainda têm-se inúmeros casos onde as fontes de luz convencionais se mostram bastante limitadas, como por exemplo, dependência de energia elétrica, ou seja, a maioria destes aparelhos está limitada pela não total portabilidade.

Essas desvantagens são potencializadas em países em desenvolvimento, como o Brasil, que possuem muitas cidades com escassez ou sem fornecimento de energia elétrica, além da concentração de centros hospitalares nas grandes cidades e por consequência, as populações das outras cidades possuem um atendimento deficitário.

De acordo com a literatura, há poucos estudos focados em novas fontes de luz aplicadas à TFD que possuam as necessidades intrínsecas na técnica (já descrita anteriormente) agregada à independência elétrica e portabilidade total. Desta maneira, surge a possibilidade de novas fontes de luz aplicadas e eficientes à TFD que tenham também, como características, a viabilidade econômica, fácil/inexistente manutenção, maleabilidade e

principalmente a independência elétrica gerando a possibilidade de realizar tratamentos fora das dependências hospitalares e até tratamento caseiro (*homecare*) (8).

1.3 Quimiluminescências: fundamentos e características

A quimiluminescência (QL) é uma reação química que resulta na emissão de luz, totalmente independente de energia elétrica. Existem alguns tipos de reações de quimiluminescência, como a oxidação de luminol, oxidação de luciferina e sistema de peróxi-oxalato. Os reagentes utilizados na reação determinam as características da luz emitida e entre estes atributos, se destacam a região do espectro eletromagnético, intensidade e duração de emissão (9).

O mecanismo da reação de QL aceito até os dias atuais foi descrito por Rauhut em 1967, no qual descreve o mecanismo de reação do sistema de peróxi-oxalato. A mistura se dá por meio do reagente oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO), associado à presença do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de um ativador (ACT), no caso, 9,10-bis(feniletinil)antraceno (BPEA). Essa reação ocorre em solução de imidazol (IMI-H) e acetato de etila (EtOAc).

O TCPO interage com o H_2O_2 , gerando assim um peróxido cíclico. Este é uma molécula com alto conteúdo energético que interage com o BPEA e assim é gerada uma sequência de eventos denominada “Mecanismo CIEEL” (“Chemically Initiated Electron Exchange Luminescence” – Luminescência Quimicamente Iniciada por Intercâmbio de Elétrons) proposto por Rauhut (op. cit.). Segundo este autor, existe um intermediário de alta energia meta-estável que interage com o ativador e é um dos responsáveis para o mecanismo CIEEL.

Quando as reações do mecanismo CIEEL terminam, o ACT está em seu estado eletronicamente excitado que, por sua vez, é instável e desta maneira retorna ao estado fundamental emitindo luz ao ambiente. Através de resultados do próprio Rauhut (op. cit.), foram propostas duas relações inversamente proporcionais em relação ao ACT: i) quanto menor o potencial de oxidação (tendência de doar/perder elétrons) maior a constante da velocidade de formação de estados eletronicamente excitados; ii) quanto menor a energia *singlete* do ativador, maior é o rendimento quântico de quimiluminescência (8, 10, 11, 12).

A reação do tipo peróxi-oxalato apresenta características passíveis na utilização em TFD, como o maior tempo de emissão de luz associado com o máximo de intensidade obtida quando comparada com as outras reações de QL. No entanto, quando a intensidade luminosa é comparada com as fontes de luz habituais (*lasers* e LED) de TFD, apresenta uma intensidade baixa. Assim, é necessário estudos nessa área para verificar a possibilidade do uso da QL como uma fonte de luz adequada de TFD em controle microbiano e lesões infectadas.

1.4 Intensidade baixa e tempo prolongado na Terapia Fotodinâmica

Estudos recentes apresentam os aspectos positivos no uso de baixa intensidade de luz e, conseqüentemente, tempos prolongados da Terapia Fotodinâmica (13-15). Segundo Babilas (2006), Tsutsui (2002) entre outros, aplicações *in vivo* demonstram que a baixa intensidade de luz no tecido irradiado não gera colapso vascular, ou seja, a área iluminada mantém o nível ideal de oxigenação. Garantida a boa oxigenação e associado com o uso adequado de FS e λ aplicado, tais trabalhos, obtiveram bons resultados na reação fotodinâmica (16-20).

Esses autores utilizaram tempos de iluminação relativamente altos, entre 120 e 240 minutos devido a faixa de intensidade aplicada (variação de 10 a 50 mW/cm²). Porém, esses estudos não buscaram atingir doses de luz observadas nos trabalhos tradicionais de TFD (próximo de 150 J/cm²). O fator crucial para não se utilizar doses tradicionais é devido ao tempo de aplicação, uma vez que fossem utilizadas essas doses, o tempo de iluminação alcançaria níveis inviáveis de 12 a 24 horas de terapia. Portanto, foi utilizado, em alguns casos, doses de luz no intervalo de 2 a 5 J/cm², tanto nos estudos *in vivo* como *in vitro*.

Babilas (2006) obteve bons resultados no trabalho realizado *in vitro* e *in vivo* com o ALA (agente precursor da PpIX), LED com pico em 633 nm em lesões de queratose actínica com doses entre 3 e 24 J/cm² (40mW/cm²) e dose igual 40 J/cm² (80 mW/cm²) apresentando-se eficiente a aplicação de LED, nos parâmetros utilizados, *in vivo* e *in vitro*. Attili (2009) também obteve sucesso na aplicação do ALA em carcinoma de Bowen em doses de 45 a 60 J/cm² (intensidade de 5 mW/cm²) e $\lambda = 620$ nm, através de sistema LED portátil (OLED), confirmando a possibilidade de aplicações fora de hospitais e clínica.

De acordo com Tsutsui (2002) que utilizou em sua pesquisa o fotossensibilizador mTHPC em modelo animal tumoral, comprimento de onda próximo de 652 nm e intensidade de 100mW obteve lesões tratadas não extensas e o autor estabelece a possibilidade de utilizar

tais parâmetros em aplicação intersticial em tumores sólidos. Seshadri (2008), também em modelo animal, aplicou o fotossensibilizador HPPH, 665 nm e intensidade de 7 mW durante 120 e 240 minutos. Os resultados desse trabalho confirmam o benefício de exposições de luz prolongadas, devido a resposta vascular potencializada e o autor sugere que tratamento com maior tempo de duração pode ser uma importante e nova alternativa à terapia fotodinâmica.

Bisland (2007), em seu trabalho, utiliza o termo **LLLT** (*Low-Level Light Treatment*) no tratamento de células de glioma empregando 635 nm e ALA como agente químico, atingindo de 1 a 5 J/cm² na intensidade de 10 mW/cm². E obteve bons resultados estabelecendo uma alternativa na aplicação da terapia fotodinâmica.

O principal fator que vem sendo usado para justificar as doses utilizadas nos estudos citados anteriormente é a constante oxigenação do sistema durante a TFD. Esta característica demonstra ser um dos responsáveis pelos bons resultados obtidos, como por exemplo, no controle microbiano, que alcançaram, aproximadamente, os níveis de redução microbiana determinados em trabalhos que utilizam intensidades mais altas (100 mW/cm²) e doses próximas de 150 J/cm² como relatado nestes trabalhos (21-23).

Certamente uma seção terapêutica de 2 horas, ainda, pode ser considerada cansativa para um paciente e inoperante ao ambiente hospitalar. No entanto, a possibilidade de um tratamento não-ambulatorial (nas residências, por exemplo) se torna atraente e viável. Principalmente com uma fonte de luz portátil (independência elétrica) e flexível como é o caso da quimiluminescência, uma potencial fonte de luz para aplicação em TFD antimicrobiana.

Os estudos encontrados na literatura empregando baixas intensidades são enquadrados no intervalo de algumas dezenas de miliwatts. A luz resultante de uma reação de QL é da ordem de microwatts, região de intensidade pouco avaliada e assim, relevante para maiores estudos.

1.5 Resistência antibioticoterapia e TFD em microbiologia

Os trabalhos referentes ao controle microbiológico foram intensificados quando foi observado, em escala mundial, existência de espécies microbianas resistentes a antibióticos, como a vancomicina (24-28). Devido à resistência a antibioticoterapia, surgem novas pesquisas na tentativa de terapias alternativas. A TFD apresenta bons resultados nesta área,

porque além de obter efetividade no tratamento, há pouca probabilidade de gerar resistência microbiana (24, 29, 30). Devido a alta diferenciação celular e funcional dos muitos microrganismos causadores de patologias, se faz necessário diferentes características no procedimento da TFD, como o fotossensibilizador utilizado e bem como a fonte de luz aplicada (31).

A espécie *Staphylococcus aureus*, identificada em diversos tipos de queimaduras, úlceras e grande responsável pelas infecções hospitalares é uma das principais espécies associadas as patologias humanas. Esta bactéria é um microrganismo que possui apenas uma camada externa à membrana citoplasmática (Gram positiva) (32, 33). A bactéria Gram positiva facilita a ação fotodinâmica que pode utilizar diferentes fotossensibilizadores e doses mais baixas de fonte de luz quando comparada com as doses tradicionalmente utilizadas na TFD para tratamentos de tumores (26, 34). A bactéria *S. aureus*, segundo a literatura, deve se apresentar como um potencial microrganismo para a validação da QL como fonte de luz aplicada na Terapia Fotodinâmica.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do uso da quimiluminescência, como fonte de luz, na redução microbiana por efeito fotodinâmico, por meio de estudos *in vitro* com a bactéria *Staphylococcus aureus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa realizada possui um desenho experimental dividido em três etapas: i) estabelecimento e caracterização da reação de quimiluminescência; ii) relação de eficiência fotodinâmica através da quantificação teórica do fotossensibilizador e da fonte de luz; iii) avaliação da resposta fotodinâmica em cultura de *S. aureus* empregando a quimiluminescência, como fonte de luz.

Etapa I: Estudo das reações de QL. O intuito desta etapa foi avaliar quais das reações de QL conciliavam da melhor maneira as seguintes características para gerar o melhor efeito fotodinâmico: i) banda de emissão; ii) intensidade luminosa; iii) tempo de duração da reação. Também nesta etapa, foi estabelecido o FS a ser utilizado e o microrganismo avaliado. Após esse primeiro momento, foi necessário busca00504

r orientações práticas e (ainda teóricas) em um dos maiores laboratórios de estudos avançados de quimiluminescência no Brasil, o Laboratório de Quimiluminescência Orgânica do Instituto de Química da USP de São Paulo, com o Professor Dr. Baader e seu aluno de doutorado (na época) Fernando Bartoloni Heering. Durante esta etapa, houve uma grande ajuda e orientação da pesquisadora Débora Balogh do IFSC/USP.

Etapa II: Estabelecido o uso da reação de QL, do MO e do FS, foi realizado um estudo teórico da relação espectral do perfil do espectro de emissão da QL e do espectro de absorção do FS, ou seja, a correlação espectral entre ambos os fatores.

Etapa III: Avaliou-se a viabilidade do uso de QL como fonte de luz na redução bacteriana do *S. aureus*, por efeito fotodinâmico. Foram estabelecidos grupos para verificar a toxicidade apenas do FS, apenas da fonte de luz, ausência desses dois fatores e a associação de ambos, consagrando neste último grupo, a técnica de TFD.

3.1 Procedimentos da etapa I

De acordo com a literatura, existem alguns tipos de reações de QL (oxidação de luminol, oxidação de luciferina e sistema de peróxi-oxalato) onde os reagentes do mecanismo CIEEL são variados e, consequentemente, observa-se alteração da intensidade de luz, do tempo e da banda de emissão. Segundo Albertini (1998), as reações do tipo peróxi-oxalato possui um dos maiores tempos e de intensidade de emissão.

O objetivo da pesquisa não foi estudar diferentes FSs e muito menos o efeito fotodinâmico em diferentes microrganismos. Portanto, o fotossensibilizador Photogem[®] e a bactéria *Staphylococcus aureus* foram escolhidos. Ambas as escolhas foram realizadas devido aos seus bons resultados observados em análise da literatura.

Ainda na etapa I, foi realizado alguns estudos nas dependências do Laboratório de Quimiluminescência Orgânica – IQ/USP, sendo possível obter conhecimentos teóricos, técnico e prático sobre a manipulação e domínio da reação de quimiluminescência.

3.1.1 Reagente e suas manipulações em QL

O acetato de etila (EtOAc) (Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil) para uso experimental foi mantido sob agitação mecânica com NaOH (40 g por litro de EtOAc) a 0 °C durante 30 minutos e posteriormente filtrado e destilado (PE 74-7 °C). Adicionou-se P₂O₅ (pentóxido de fósforo) e destilou-se o solvente (ponto de ebulição 77 °C a 760 mmHg) em uma coluna Vigreux de 1,5 m. Em seguida, destilou-se mais uma vez de P₂O₅ e armazenou-se em um frasco seco. Desta maneira, EtOAc estava em perfeitas condições para ser utilizado. Este reagente foi utilizado como o solvente nas reações de quimiluminescência.

O sulfato de magnésio (MgSO₄) (Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil) foi previamente seco em forno a vácuo (180 °C a 1 mmHg) durante dois dias. O forno foi aberto sob ar seco e o MgSO₄ armazenado em um recipiente adequado, estando assim, em condições de uso.

A preparação inicial do Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) (Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil) foi realizada pela mistura de 20,0 ml de EtOAc e 1,0 ml de H₂O₂ (60%). Acrescenta-se

MgSO₄ em agitação até ocorrer a precipitação deste reagente. Assim, está realizado o estoque de peróxido de hidrogênio.

O dibutilftalato (DBF) (Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil) é outra classe de solvente nas reações de peróxi-oxalato, apresentando-se mais viscoso que o EtOAc. DBF foi destilado em uma temperatura de ebulição entre 170 – 175 °C em uma pressão menor de 1 mmHg.

O reagente oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila), o reagente imidazol e os ativadores (Sigma-Aldrich[®], São Paulo, Brasil) não sofreram o processo de destilação e nenhum outro procedimento. Os ACTs avaliados foram: 9,10-difenilantraceno (DPA); 9,10-bis(feniletinil)antraceno (BPEA); Rodamina e (4-(Dicyanomethylene)-2-methyl-6-(4-dimethylaminostyryl)-4H-pyran) (DCM).

3.1.2 Estabelecimento da reação de quimiluminescência

Diversas reações foram testadas para o estabelecimento da melhor proporção dos reagentes para a obtenção de maiores valores de intensidade de luz e tempo de meia-vida da reação química.

Todos os reagentes envolvidos na reação foram avaliados em diferentes concentrações para analisar as seguintes características: banda de emissão, intensidade máxima e o tempo de decaimento da luz emitida. Os estudos relacionados com a emissão da luz foram avaliados no espectrofotômetro (Cary, Varian[®], São Paulo, Brasil).

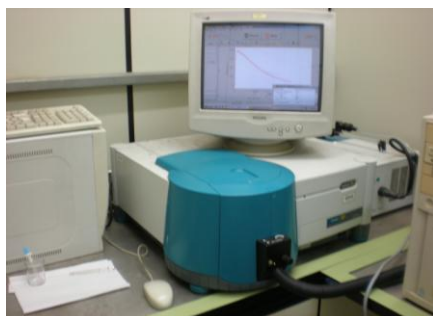


Figura 1 - Espectrofotômetro utilizado na avaliação da reação química

A utilização de uma reação de quimiluminescência industrializada que obtivesse parâmetros similares aos estabelecidos na reação química pesquisada no IQ/USP poderia auxiliar no procedimento experimental da etapa III. Este interesse é potencializado de acordo

com o objetivo geral desta dissertação: o uso de uma fonte de luz à base de QL aplicado à TFD; e não a elaboração e/ou estabelecimento de procedimentos químicos sobre o mecanismo de uma reação de quimiluminescência.

Deste modo, foi avaliada a reação de QL industrializada (Light Stick Ltd., Pequim, China). A QL industrializada é comercializada em 1 ml/recipiente e também é de fácil aquisição, seguro e aplicável aos interesses deste trabalho. A partir desta reação química, os parâmetros analisados foram os mesmos pesquisados na reação de quimiluminescência no IQ/USP. Para esta análise utilizou-se o espectrofotômetro (Cluster Ltd., Moscow, Rússia).

3.2 Planejamento da etapa II

Com o intuito de coletar as informações do FS e da fonte de luz, foi obtido o espectro de absorção do fotossensibilizador Photogem[®] no equipamento espectrofotômetro (Cary, Varian[®], São Paulo, Brasil) e as informações da fonte de luz, foram avaliadas por meio do espectro de emissão da QL, através do espectrofotômetro (Cluster Ltd., Moscow, Rússia).

De acordo com os dados iniciais do FS e da QL, e de acordo com o uso similar da teoria de Förster (35) foi realizada a normalização do espectro de absorção do FS pelo o seu pico máximo observado, e da mesma maneira, o espectro de emissão da QL foi normalizada pelo maior pico obtido.

Portanto, a partir deste momento foi possível estabelecer a correlação do FS e da fonte de luz em cada comprimento de onda avaliado, descrevendo o grau de correlação entre os espectros. O resultado denominado deste estudo descreve um valor adimensional que descreve, teoricamente, a razão entre as integrais do FS e da fonte de luz, sendo um parâmetro para avaliação indireta da efetividade fotodinâmica da interação destes dois fatores. Os dados foram avaliados nos softwares OriginLab[®] (Northamptonocal, Massachusetts, EUA) e Microsoft Excel[®] (Microsoft, EUA).

3.3 Desenho experimental da etapa III

3.3.1 Agente fotossensibilizador

O fotossensibilizador utilizado neste estudo foi o Photogem[®], classificado como um representante da primeira geração dos fotossensibilizadores. O Photogem[®] possui várias bandas de absorção, quando em solução em água destilada. A banda de Soret localizada na região ultravioleta (pico em 369 nm), e outras bandas menores (bandas Q) localizadas na região visível do espectro eletromagnético, centradas em 507, 540, 570 e 620 nm.

Esse agente fotossensível é produzido a partir da hematoporfirina, uma substância presente no sangue de animais e de humanos. O Photogem[®] é fabricado na Rússia – Moscou, aprovado pelo “Ministry of Public Health Service and Medical Industry of Russian Federation”. Além disso, a utilização desse agente é aprovada para uso em humanos pelo Comitê Estatal de Farmacologia da Federação Russa e, também, por órgãos brasileiros para uso em pesquisa clínica. Apresenta-se na forma de um pó violeta escuro, pode ser armazenado por até 2 anos em um local protegido da luz e em temperatura inferior a 5°C.

O Photogem[®] foi avaliado em quatro concentrações: 6; 25; 50 e 75 µg/ml. Para isso, alíquotas da solução estoque de Photogem[®] (1000 mg/l) foram diluídas em solução salina estéril previamente ao uso. Essas diluições correspondem ao dobro das concentrações avaliadas neste estudo, já que, quando estas soluções foram adicionadas às suspensões da bactéria a concentração do Photogem[®] foi reduzida pela metade, atingindo-se as concentrações finais relatadas anteriormente. Todo o procedimento experimental, entre a diluição do FS até o início do experimento *in vitro*, o fotossensibilizador foi protegido da exposição de luz.

3.3.2 Fonte de luz

A fonte de luz utilizada na iluminação das amostras se deu através da quimiluminescência. A reação de química utilizada foi caracterizada (Capítulo “Resultados e Discussões”) com um tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) de 30 minutos, com intensidade hábil de utilização até a sua segunda $T_{1/2}$ (totalizado 60 minutos). A intensidade irradiada por uma hora atinge intensidade média de $100 \mu\text{W}/\text{cm}^2$.

3.3.3 Preparo dos materiais microbiológicos

O microrganismo *S. aureus* (ATCC (American Type Culture Collection) 25923, Seattle, EUA) foi individualmente inoculado em meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB) e incubado em estufa bacteriológica para sua reativação. A cultura deste MO foi inicialmente descongelada e, a seguir, uma alíquota de $10 \mu\text{l}$ foi retirada do microtubo e inoculada em 5 ml de TSB contido em um tubo de ensaio, o qual foi incubado a 37°C durante 16 horas.

Após a incubação, o tubo de ensaio foi colocado em agitador de tubos e agitado vigorosamente por 30 segundos, para verificar o crescimento microbiano por meio da turvação do meio de cultura. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 2000 rpm, durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas em 5 ml de água destilada estéril. O tubo foi agitado novamente por 30 segundos e os mesmos passos de centrifugação foram repetidos.

As células foram, então, ressuspensas em solução salina estéril até que a concentração celular no interior do tubo de ensaio fosse equivalente a 10^6 células/ml averigado através de um espectrofotometro (BioPhotometer, Leight Lichtstrahlone, Alemanha). A análise foi feita no comprimento de onda em 600 nm.

O meio de cultura *Manitol Salt Agar* (Acumedia manufactures, Inc. Lasing, Michigan-USA) foi utilizado nas sementeiras das placas de Petri. Esse meio de cultura apresenta-se sólido após o preparo e possui propriedades específicas para a cultura de *S. aureus*, por exemplo, mantendo a cor (avermelhada) do meio quando não há presença de colônias do MO e quando ocorre a presença desta bactéria, o meio torna-se amarelado.

Para o preparo do meio de cultura, foi utilizada a proporção de 115 g do meio para 1 litro de água destilada e em seguida, a mistura foi colocada em um béquer e misturada. A seguir, o béquer foi levado ao “banho-maria” até que ocorresse a dissolução completa do pó. Uma alíquota de 20 ml da solução resultante foi pipetada e dispensada em tubos de ensaio, ainda na fase líquida.

A seguir, os tubos de ensaio foram devidamente identificados, datados, tampados com algodão e levados em autoclave vertical (AV Plus, Phoenix[®], São Paulo, Brasil) para esterilização a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os meios de cultura, ainda na fase líquida, foram vertidos em placas de Petri estéreis e descartáveis. Após a solidificação dos meios de cultura, as placas de Petri foram armazenadas em geladeira a 5°C para serem utilizadas nos procedimentos de semeadura dos microrganismos após o término do procedimento *in vitro*.

3.3.4 Procedimento *in vitro*

A susceptibilidade do *Staphylococcus aureus* à TFD associado com QL foi avaliada em quatro concentrações do agente Photogem[®] (6; 25; 50 e 75 µg/ml) e em três diferentes tempos de aplicação: 60, 120 e 240 minutos. Os grupos analisados na etapa III foram estabelecidos com o intuito de pesquisar todos os fatores envolvidos, ou seja, presença do FS, da fonte de luz e a ausência de um e/ou de ambos os fatores. Estes grupos foram divididos da seguinte maneira, como é apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Grupos analisados na etapa III.

Grupos	Fatores envolvidos	Descrição
I	FS- ; QL-	sem fotossensibilizador, sem luz
II	FS- ; QL+	aplicação apenas da luz
III	FS+ ; QL-	aplicação apenas do fotossensibilizador
IV	FS+ ; QL+	aplicação da terapia fotodinâmica

Todos os grupos obedeceram ao mesmo protocolo *in vitro*, ou seja, para cada placa de 96 orifícios foram utilizados 15 orifícios (distribuídos em uma matriz 5x3) devido aos grupos avaliados e a triplicata realizada. Aliquotas de 100 µl de *S. aureus* suspensos foram transferidas para cada um dos 15 orifícios.

Nos estudos dos grupos I e II, foram depositados 100 µl de solução salina estéril nos mesmos 15 orifícios que já havia MO. Nos estudos dos grupos III e IV foram adicionados 100 µl do fotossensibilizador (em suas devidas concentrações como já descrito anteriormente) nos mesmos 15 orifícios em que já havia sido alocada a bactéria avaliada.

Para todos os grupos analisados, foram utilizados o tempo de incubação do MO em contato com o FS (ou solução salina, para os grupos I e II) igual a dois minutos e após isso, início-se a contagem dos tempos do experimento (60; 120 e 240 minutos).

Na avaliação dos grupos em que não havia a presença da fonte de luz à base da QL (grupos I e III), posicionou-se a placa de 96 orifícios em local seguro de qualquer iluminação até o término dos tempos pré-estabelecidos.

No entanto, para os grupos II e IV, a fonte de luz à base de QL foi posicionada abaixo de cada placa de 96 orifícios (exatamente abaixo dos 15 orifícios utilizados). A reação química foi acondicionada em uma placa Petri estéril (com dimensões iguais a 5,0 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura), totalizando o volume de 30 ml de reação de QL. Os subgrupos foram iluminados por 60, 120 e 240 minutos, fornecendo doses de 0,5; 1,0 e 2,0 J/cm², respectivamente. A figura 2 apresenta o *designer* da iluminação das amostras.



Figura 2 - Fotos da iluminação nas amostras durante o experimento

Em todas as condições avaliadas (Grupos I, II, III e IV) foram realizadas diluições seriadas a partir das amostras contidas nos orifícios das placas. Para isso, uma alíquota de 100 μl foi removida de um dos 15 orifícios utilizados e transferida para um tubo de ensaio contendo 900 μl de solução salina estéril (todos os outros 14 orifícios seguem o mesmo procedimento). O tubo de ensaio contendo 900 μl de solução salina e 100 μl da amostra foi agitado vigorosamente (em agitador de tubos) e uma nova alíquota de 100 μl foi removida do mesmo e colocada em outro tubo de ensaio contendo 900 μl de solução salina. Esse procedimento foi realizado três vezes para cada amostra e, desta forma, as diluições seriadas foram obtidas na razão de 10^{-1} a 10^{-3} células/ml.

As três diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram utilizadas para a realização da semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura Manitol Salt Agar. Para este procedimento, os tubos de ensaio contendo as diluições seriadas foram individualmente agitados e a seguir, alíquotas de 25 μl de cada diluição seriada foram pipetadas em triplicata. Cada alíquota foi transferida para um dos quadrantes de três diferentes placas de Petri contendo o meio de cultura.

Adicionalmente, alíquotas de 25 μl foram removidas diretamente dos 15 orifícios e transferidas diretamente para o quadrante adequado da placa de Petri, sem a realização de diluição. Assim sendo, as concentrações de MO semeadas foram: 10^6 (alíquota removida diretamente do orifício sem sofrer diluições), 10^5 , 10^4 e 10^3 células/ml. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. Os procedimentos de semeadura foram realizados em triplicatas.

Cada grupo (I, II, III e IV) foi subdividido com o intuito de facilitar a apresentação posterior dos dados. Desta maneira, o grupo sem fotossensibilizador e sem QL foi avaliado nas condições descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Subgrupos analisados no grupo I

Grupo I	1.1	60 min
	1.2	120 min
	1.3	240 min

Assim como a tabela acima descreve, o MO foi posicionado adequadamente sem a presença de qualquer concentração de FS e protegido da luz durante os três diferentes tempos. O estudo do grupo I foi estabelecido com o objetivo de verificar a sobrevivência do MO nos tempos avaliados, perante dois principais fatores: i) falta de nutrientes do meio TSB; ii) hipotermia devido a temperatura ambiente durante o experimento. Assim, esse grupo gerou a validação de todos os outros grupos (grupo II, III e IV).

O grupo em que foi aplicada apenas a iluminação oriunda da reação de quimiluminescência foi avaliado nas condições descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Subgrupos analisados no grupo II

Grupo II	2.1	60 min
	2.2	120 min
	2.3	240 min

O estudo do grupo II foi realizado com o intuito de averiguar o fator único do efeito da quimiluminescência (como fonte de luz externa) sobre o crescimento do *S. aureus*.

O estudo da presença única do Photogem[®] aplicado sobre o MO foi examinado de acordo com a tabela a seguir

Tabela 4 - Subgrupos analisados no grupo III

Grupo III	3.1	6 µg/ml	60 min
		25 µg/ml	
		50 µg/ml	
		75 µg/ml	
	3.2	6 µg/ml	120 min
		25 µg/ml	
		50 µg/ml	
		75 µg/ml	
	3.3	6 µg/ml	240 min
		25 µg/ml	
		50 µg/ml	
		75 µg/ml	

De acordo com a tabela acima, o MO e o fotossensibilizador foram posicionados (descrito anteriormente) juntos na placa de 96 orifícios. A intenção de realizar esse grupo foi estabelecer a relação da citotoxicidade (no escuro) do MO devido ao FS, em suas diferentes concentrações. Durante os três tempos avaliados, as amostras testadas foram protegidas de qualquer iluminação externa.

Enfim, o grupo IV, presença do FS e da QL, foi avaliado com as seguintes relações:

Tabela 5 - Subgrupos analisados no grupo IV

Grupo IV	4.1	6 µg/ml	60 min
		25 µg/ml	
		50 µg/ml	
		75 µg/ml	
	4.2	6 µg/ml	120 min
		25 µg/ml	
		50 µg/ml	
		75 µg/ml	
	4.3	6 µg/ml	240 min
		25 µg/ml	
		50 µg/ml	
		75 µg/ml	

De acordo com a tabela acima, o grupo IV avaliou a viabilidade da terapia fotodinâmica com o Photogem[®] e a iluminação à base de quimiluminescência. A verificação da efetividade

do controle microbiano foi o objetivo deste grupo através das relações entre as quatro concentrações do FS e os três tempos de iluminação, consolidando o grupo IV com o grupo da terapia fotodinâmica.

3.4.5 Análise dos resultados

Após o procedimento de semeadura, as placas Petri foram acondicionadas em estufa (37 °C) por 48 horas. Em seguida, foi realizada a contagem do número de unidades formadora de colônias (UFC) que representam uma quantificação dos MOs sobreviventes em cada subgrupo testado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Etapa I

A revisão da literatura sobre reações de quimiluminescência demonstrou que existem muitas variações em suas características e propriedades, como por exemplo, uma reação gera uma intensidade de luz emitida alta, porém esse efeito ocorre durante poucos segundos e um único reagente diferente pode gerar uma longa emissão, porém uma baixa intensidade de luz. As referências encontradas na literatura sobre as características e parâmetros da reação química de QL são realizados por laboratórios de química orgânica, no qual o foco é a reação química, seus reagentes/produtos e não a quantificação da intensidade emitida e muito menos o tempo de meia-vida. Portanto, os dados apresentados da etapa I são qualitativos. Segundo Albertini et al (1998), as reações de quimiluminescência do tipo de peróxi-oxalato são descritas abaixo na tabela 6.

Tabela 6 - Análise de diferentes ativadores e suas características

Ativador	Cor da emissão	Intensidade	Duração
9,10-difenilantraceno (DPA)	Azul	Alta	Média
1,3-difenilisobenzofurano (DFB)	Verde	Alta	Curta
9,10-bis(feniletinil)antraceno (BPEA)	Verde	Alta	Longa
Rubreno	Amarela	Muito alta	Curta
Clorofila	Vermelha	Alta	Curta

*Tabela editada. Albertini (1998).

Avaliou-se que a reação de peróxi-oxalato é aquela que apresenta um dos maiores tempo e intensidade de emissão e agrega as melhores características aplicadas ao objetivo

deste trabalho. Portanto, o tipo de reação de QL estabelecida para uso experimental foi a reação do tipo peróxi-oxalato.

A terapia fotodinâmica apresenta bons resultados associada ao controle microbiano, como já dito anteriormente. O uso do Photogem[®] para controle do *Staphylococcus aureus* apresenta um efeito fotodinâmico efetivo por meio da utilização de fontes de luz tradicionais, como laser e LED e suas intensidade em aplicações tradicionais. Deste modo, a verificação da viabilidade da QL como fonte de luz em TFD foi avaliada através do fotossensibilizador Photogem[®] e MO *Staphylococcus aureus*.

A participação do **Laboratório de Quimiluminescência Orgânica (IQ/USP)** foi de extrema importância na pesquisa. Após o estabelecimento da reação do tipo peróxi-oxalato e do ativador BPEA como as melhores opções para o presente estudo, avaliações individuais sobre as concentrações dos reagentes envolvidos nesta reação de QL foram necessárias. A reação química ideal, para o uso investigado no presente estudo, deve possuir o maior tempo de meia-vida, a maior relação espectral entre o espectro de emissão da QL com o espectro de absorção do fotossensibilizador e o maior pico de intensidade emitida.

Alguns reagentes são imprescindíveis para que a reação química ocorra, como é o caso do oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e imidazol (IMI-H). Assim, estes reagentes não foram substituídos, apenas avaliados as concentrações e relações de melhor utilidade à pesquisa.

Os resultados deste estudo estão presentes no gráfico 1, onde a intensidade total de luz emitida é apresentada para cinco combinações distintas de IMI-H e H₂O₂.

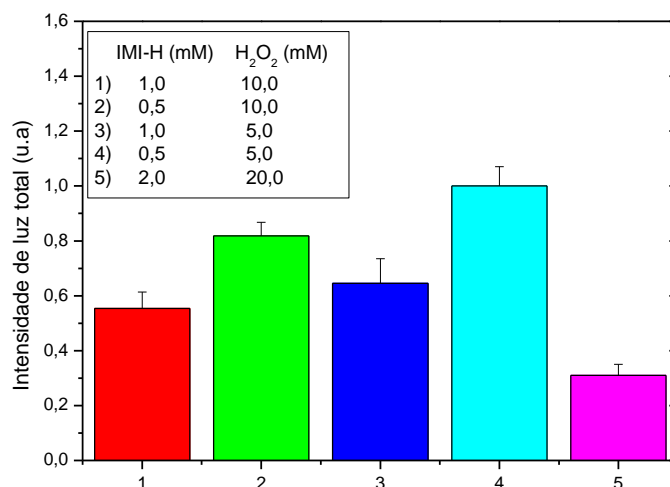


Gráfico 1 - Intensidade de luz emitida em função das concentrações do IMI-H e H₂O₂

A partir dos resultados apresentados, é possível determinar para essa reação que a melhor combinação, em termos de intensidade é a do IMI-H na concentração de 0,5 mM e o H_2O_2 na concentração de 5,0 mM.

A intensidade de luz dissociada do fator $T_{1/2}$ pode não representar qualquer estabelecimento entre as concentrações do IMI-H e do H_2O_2 . Assim, foi avaliado o tempo de meia-vida para estes dois fatores. O gráfico 2 apresenta os resultados referente ao tempo de meia-vida.

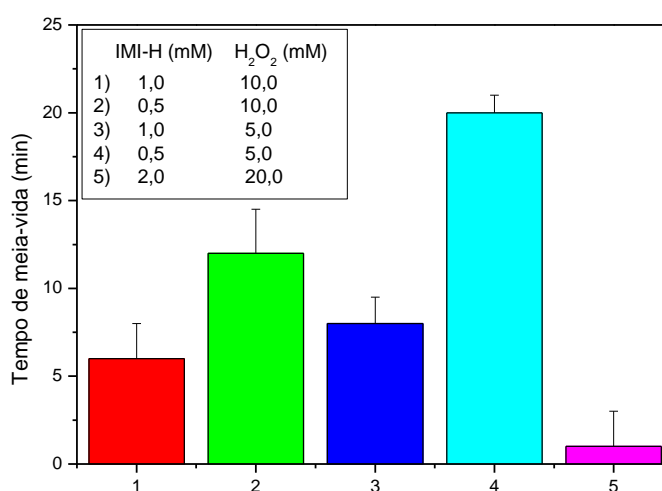


Gráfico 2 – Tempo de $T_{1/2}$ dos sistemas com diferentes concentrações de IMI-H e H_2O_2

A relação entre os gráficos 1 e 2 demonstra que a utilização do IMI-H (0,5 mM) e H_2O_2 (5,0 mM) é a melhor opção para a aplicação do presente estudo. Estabelecidas as concentrações do IMI-H e H_2O_2 , foi necessário verificar a relação do ACT com a intensidade de luz emitida, pois o ativador na reação de QL altera apenas duas características: intensidade (de acordo com a sua concentração) e a banda de emissão. Essa última característica é alterada apenas na troca do ACT e não em sua concentração.

A seguir, são apresentados os dados da concentração do ativador (no caso, utilizou-se o ativador DPA) e sua relação com a intensidade de luz emitida. O gráfico 3 relaciona dados teóricos com os dados experimentais.

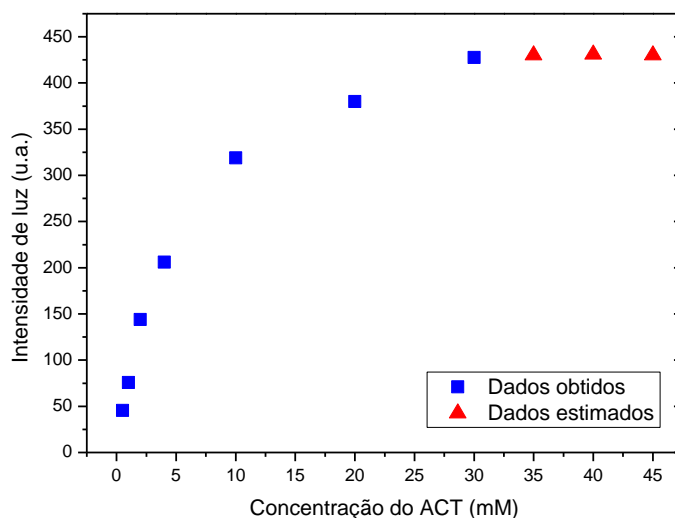


Gráfico 3 - Intensidade de luz de acordo com a concentração do ACT.

Os resultados obtidos sobre a concentração do ativador estão em concordância com a teoria da reação de quimiluminescência. Portanto, o uso do ACT na concentração saturada em solução é de grande interesse à pesquisa.

A função do reagente TCPO é de fundamental importância, pois o início da reação de QL ocorre apenas na presença deste reagente. Porém, a concentração do TCPO não influencia as propriedades avaliadas da reação química e assim, não houve necessidade de se realizar experimentos que avaliassem a intensidade e o $T_{1/2}$ de emissão de luz em relação da concentração do TCPO. Assim, foram estabelecidas as concentrações dos reagentes IMI-H, H_2O_2 e TCPO que seriam utilizadas nos próximos experimentos.

Na determinação de qual reação do tipo peróxi-oxalato deveria ser utilizada para a aplicação em TFD foi necessário avaliar diferentes solventes e diferentes ativadores. Os solventes interferem nas características da intensidade e $T_{1/2}$ da luz emitida. Enquanto, o ACT (utilizado em sua concentração máxima) altera apenas a região do espectro emitido.

Desta maneira, foram avaliados os solventes: acetato de etila (EtOAc) e dibutilftalato (DBF). E os ativadores avaliados foram: DPA, BPEA, Rodamina e DCM. O gráfico 4 apresenta as oito possíveis combinações entre os solventes e os ativadores no parâmetro intensidade de luz.

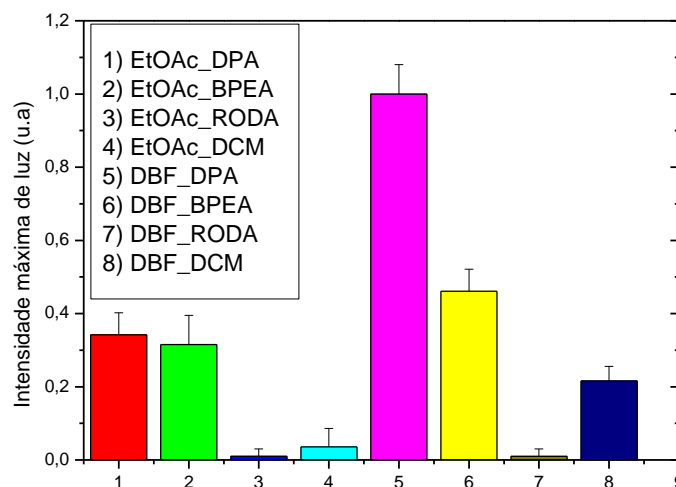


Gráfico 4 - Intensidade de luz pelos vários ACT em dois solventes diferentes

Os dados representados na figura 4 demonstraram uma substancial diferença entre os quatro ACT's à base de EtOAc e os mesmos ACT's à base de DBF, sendo as soluções manipuladas com o solvente DBF mais relevantes do que as soluções manipuladas com EtOAc.

A ordem entre as amostras de maior intensidade de luz à base de DBF é a mesma aos ativadores à base de EtOAc. Os corantes Rodamina e DCM apresentam, respectivamente, os picos mais baixos de luz emitida. Enquanto que os corantes DPA e BPEA são os corantes de maior eficiência considerando o parâmetro da intensidade de luz.

De acordo com o gráfico 4, a reação química à base de DBF+DPA indica ser uma potencial alternativa no uso da reação de QL aplicada em terapia fotodinâmica, no entanto, essa conclusão se torna verdadeira após outras duas análises: decaimento da intensidade emitida e a banda de emissão, apresentadas no gráfico 5 e tabela 7.

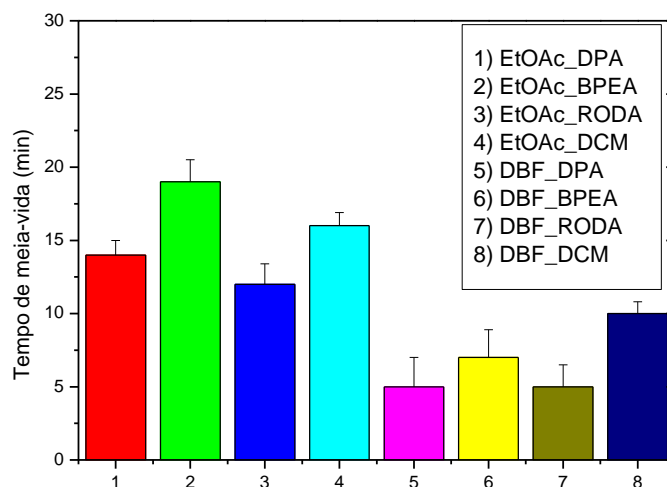


Gráfico 5 - $T_{1/2}$ dos ACTs em dois solventes diferentes

No gráfico 5 o comportamento do grupo EtOAc e do grupo DBF apresenta uma inversão perante as reações mais viáveis apresentadas na discussão do gráfico 4. Enquanto as reações relacionadas com DBF apresentaram as maiores intensidades de luz emitida, as reações relacionadas com EtOAc apresentaram os maiores $T_{1/2}$.

No intuito de facilitar a análise, escolhe-se uma reação com solvente de EtOAc (corante de BPEA) e uma reação com o solvente de DBF (corante DPA). Sobre o parâmetro da intensidade de luz emitida, a reação DBF+DPA é cerca de 2,5 vezes mais intensa que a reação EtOAc+BPEA. Sobre o parâmetro do $T_{1/2}$, a reação EtOAc+BPEA é 4 vezes maior ($T_{1/2} = 20$ minutos) do que a reação DBF+DPA ($T_{1/2} = 5$ minutos). Essa análise pode ser realizada, pois em ambos os experimentos foi utilizado os mesmos parâmetros no mesmo equipamento.

As reações de QL emitem uma faixa de luz relativamente larga, porém cada qual com um pico característico no λ emitido. A tabela a seguir, apresenta esses resultados.

Tabela 7 - Pico de emissão das oito reações de QL avaliadas

	EtOAc	DBF
	Comprimento de onda (nm)	Comprimento de onda (nm)
DPA	430	438
BPEA	500	508
RODAMINA	570	575
DCM	605	610

A utilização de diferentes solventes geram um deslocamento no pico do λ emitido, sendo um deslocamento de aproximadamente 7 nm para o vermelho nas reações com o DBF.

Como já discutido anteriormente neste trabalho, o sucesso da TFD é dependente da relação do FS e a fonte de luz aplicada. Um dos fatores principais desta relação é sobre o espectro de emissão da fonte de luz e do espectro de absorção do fotossensibilizador. A fonte de luz deve possuir picos (ou banda) de emissão compatíveis aos picos (ou banda) de absorção do FS. Quanto maior for essa relação, mais efetiva é a ativação do agente fotossensível.

Aplicações diferentes de TFD exigem características diferentes, como por exemplo, aplicação em câncer de pele é preciso utilizar fontes de luz com λ grande (na ordem de 650 nm) para ocorrer melhor penetração no tecido biológico. No entanto, estudos *in vitro* de TFD não necessitam que as fontes de luz possuam emissão nesta região, podendo utilizar λ menores (na região de 530 nm) por possuir uma maior relação com o FS, já que o fator penetração no meio não é considerado. O mesmo raciocínio de utilizar fonte de luz com λ menores nas aplicações superficiais *in vivo* é aceitável, como é o caso do controle microbiano de lesões infectadas.

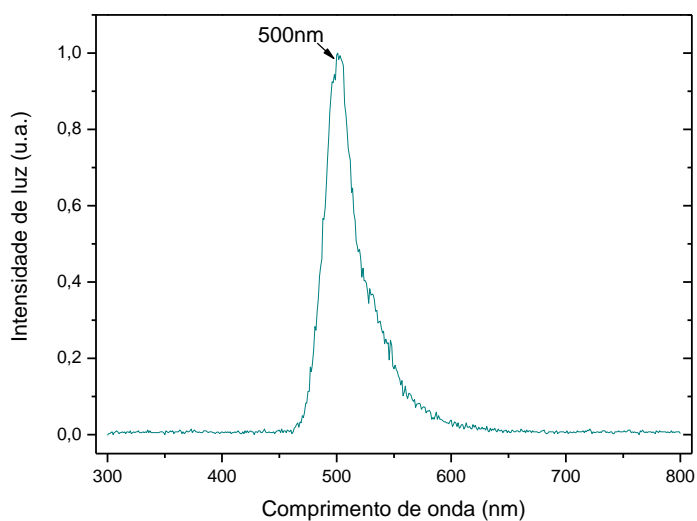
Outro parâmetro relevante é a luz emitida na reação de quimiluminescência que diminui no transcorrer do tempo (decaimento da luz emitida no tempo) e na possibilidade de ser aplicada em TFD é possível que seja necessário a reativação (ou a troca) da reação de QL. Devido a esse parâmetro, a reação química que possuir o maior $T_{1/2}$ agrega maior vantagem sobre as outras reações.

Com o intuito de estabelecer a melhor reação química aplicada como fonte de luz em TFD, a tabela 8 apresenta um resumo que relaciona todos os resultados apresentados levando em consideração três características (tempo de meia-vida; pico/banda de emissão e intensidade de luz emitida). Foram estabelecidas pontuações a cada um destes três fatores, de acordo com as necessidades do fotossensibilizador e da aplicação em TFD, já relatadas anteriormente. Entre as oito reações de QL avaliadas, aquela que obteve a maior pontuação, é a reação mais relevante ao interesse desta pesquisa.

Tabela 8 - Análise ponderada das reações de quimiluminescência avaliadas

Reação de QL	Fator	Tempo de meia-vida	Pico de emissão	Intensidade de luz emitida	Soma dos pontos
	Ponderação	10	8	6	
EtOAc+DPA		7	3	4	118
EtOAc+BPEA		10	9	4	196
EtOAc+ROD		6	10	2	152
EtOAc+DCM		8	8	3	162
DBF+DPA		3	3	10	114
DBF+BPEA		4	10	5	150
DBF+ROD		3	9	2	114
DBF+DCM		5	9	4	146

A análise da tabela 8 demonstra que a reação EtOAc+BPEA é a mais adequada à aplicação deste trabalho. Desta maneira, são apresentadas as características principais desta reação específica nos gráficos 6 e 7.

**Gráfico 6** - Espectro de emissão da amostra EtOAc+BPEA

O espectro de emissão da reação selecionada possui o pico de emissão em 500 nm, tendo uma largura da banda na ordem de 30 nm e sua distribuição é de perfil lorentziano.

O perfil de decaimento da intensidade de luz emitida é apresentado no gráfico 7.

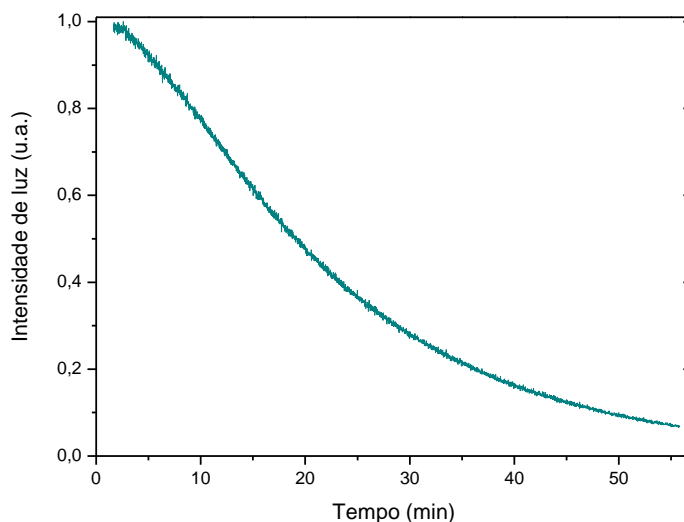


Gráfico 7 - Decaimento da luminosidade da reação EtOAc+BPEA

O tempo de meia-vida da reação estabelecida é de, aproximadamente, 20 minutos. Porém, a intensidade captada até os primeiros 60 minutos (terceiro $T_{1/2}$) é perceptível e de admissível aplicabilidade à técnica de TFD.

Uma vez estabelecidos os parâmetros necessários para utilizar a reação de QL em sua potencialidade máxima aplicada ao objetivo do trabalho, é aceitável que sejam buscadas outras maneiras de gerar essa reação química que tenha características similares à EtOAc+BPEA. Essa busca de outras reações de QL é devido ao complexo contexto (laboratorial e prático) de gerar inúmeras manipulações químicas nas dependências de um laboratório que não seja de química orgânica. Assim, a possibilidade de utilizar reações de quimiluminescência industrializadas é de grande valor.

Desta maneira, cinco tipos de reação de QL industrializada foram avaliadas, na figura 3. Devido ao grande número de dados coletados, a análise dos resultados se concentrou em uma amostra específica de acordo com a banda de emissão resultante. A reação industrializada mais examinada foi a segunda amostra (da direita para a esquerda) da figura 3.

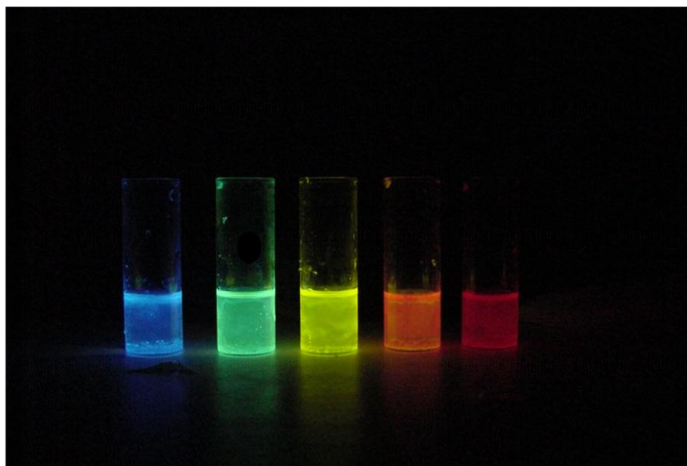


Figura 3 - Quimiluminescência industrializada com diferentes ativadores

É interessante ressaltar que a finalidade deste trabalho não foi especular se os reagentes envolvidos com a reação industrializada são os mesmos da reação laboratorial.

As características investigadas desta reação de QL industrializada são as mesmas que foram avaliadas da reação EtOAc+BPEA. O gráfico 8 apresenta o perfil do espectro de emissão.

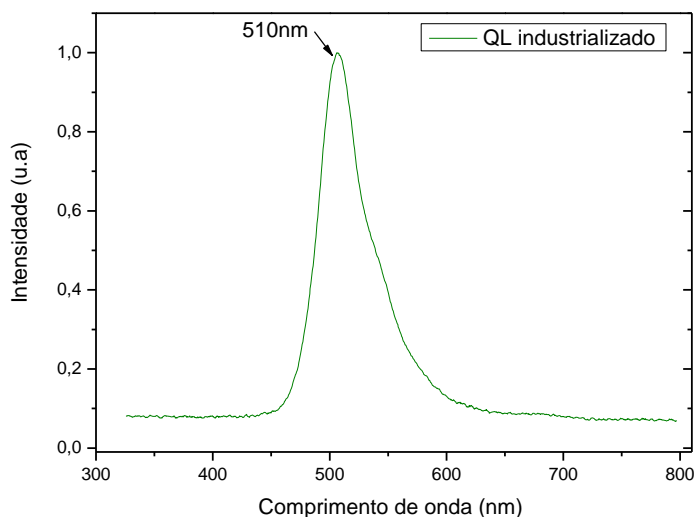


Gráfico 8 - Espectro de emissão da amostra de quimiluminescência industrializada

O espectro de emissão da reação industrializada possui o pico de emissão em 510 nm, tendo uma largura de banda na ordem de 50 nm e sua distribuição, também, apresenta o perfil lorentziano. Esse resultado possui características similares às obtidas na reação manipulada em laboratório. Com relação ao parâmetro “banda de emissão”, a reação

comercial apresenta uma vantagem significativa perante a outra reação, devido a proximidade dos picos de absorção do fotossensibilizador (507 nm) e o pico de emissão de luz (510 nm).

Sobre o parâmetro $T_{1/2}$, o gráfico 9 apresenta o perfil de decaimento da luz emitida no transcorrer do tempo, para o caso da reação industrializada.

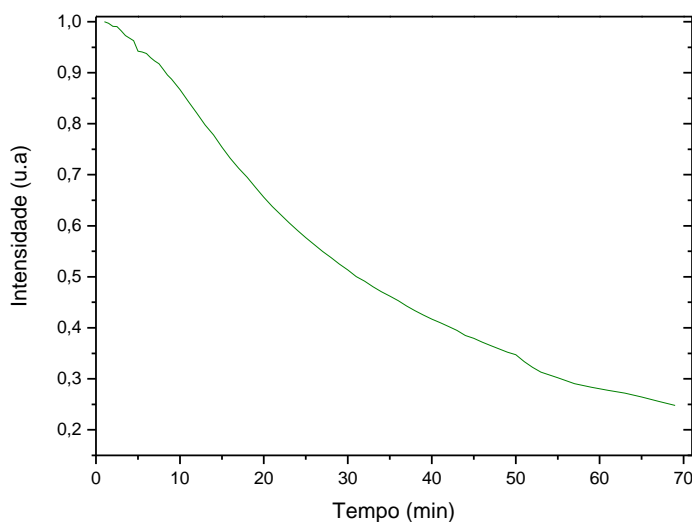


Gráfico 9 - Decaimento da intensidade luminosa perante o tempo

A reação comercial possui $T_{1/2} = 30$ minutos, possuindo uma similaridade entre as duas reações. A intensidade captada até os primeiros 60 minutos (segundo $T_{1/2}$) é perceptível e de admissível aplicabilidade à técnica de TFD. Com relação a necessidade da troca (ou reativação) da reação de QL, a reação industrializada apresenta um benefício expressivo perante a reação manuseada em laboratório ($T_{1/2} = 20$ minutos)

Portanto, a reação de quimiluminescência utilizada no estudo *in vitro* foi a reação industrializada, sendo substituída, quando necessária, após completar 60 minutos (após transcorrer duas $T_{1/2}$) de iluminação sobre as amostras.

4.2 Etapa II

O fotossensibilizador Photogem[®] foi diluído em solução e coletou-se o seu espectro de absorção, como é possível observar no gráfico 10.

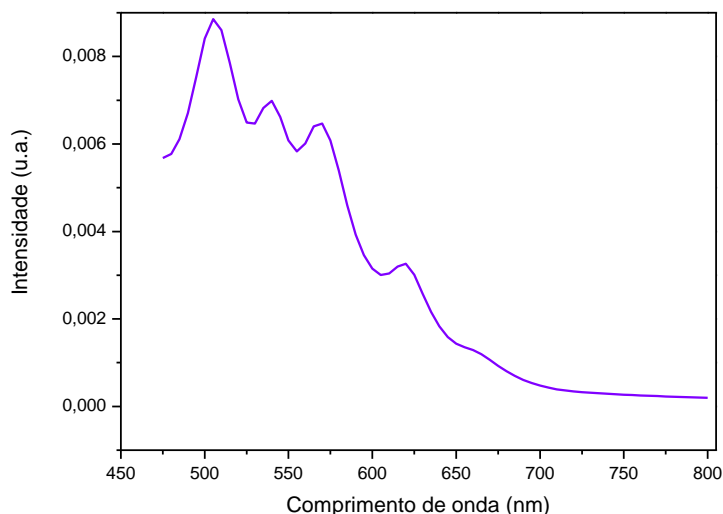


Gráfico 10 - Espectro de absorção na região do visível do Photogem[®]

O gráfico 10 apresenta os quatro picos de absorção do FS na região do espectro visível (Bandas Q). Os picos localizados a esquerda são os mais intensos e consequentemente são mais relevantes na ativação do Photogem[®]. Através de uma análise em que desconsidere a intensidade da fonte de luz, uma banda de emissão próxima ao primeiro pico da Banda Q ($\lambda=507$ nm) seria mais eficiente na ativação do FS.

De acordo com o objetivo da etapa II, para se realizar um estudo independente da intensidade da fonte de luz e também da informação intrínseca da absorção, ou seja, uma análise unicamente espectral, cada espectro apresentado foi normalizado pelo seu pico máximo.

O final desta avaliação foi avaliado, segundo o modelo similar à Teoria de Förster, o valor adimensional, denominado η_λ , que relaciona o FS com a QL. Porém, se faz necessário uma comparação com fatores usualmente conhecidos na prática da TFD. Desta maneira, foram coletados os dados de dois tipos de LED: i) banda de emissão próxima ao verde e ii) banda de emissão próxima ao vermelho. Os gráficos 11 e 12 são as representações do LED verde e LED vermelho, respectivamente.

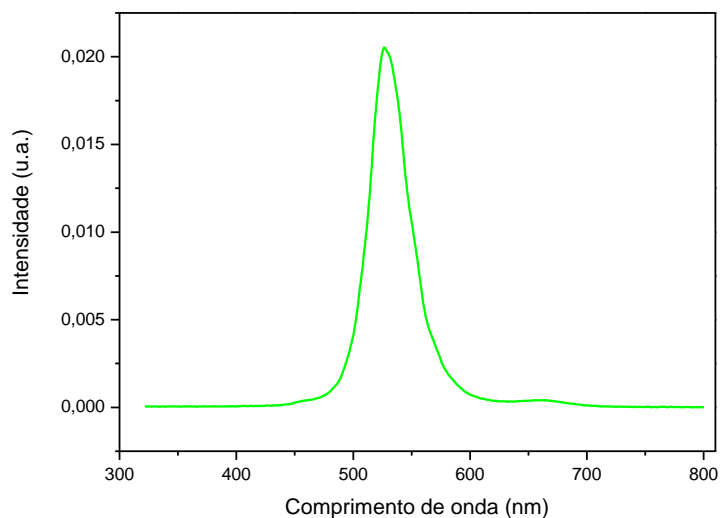


Gráfico 11 - Espectro de emissão do LED verde

O espectro de emissão do LED verde possui o pico de emissão em 527 nm, tendo uma largura de banda na ordem de 40 nm

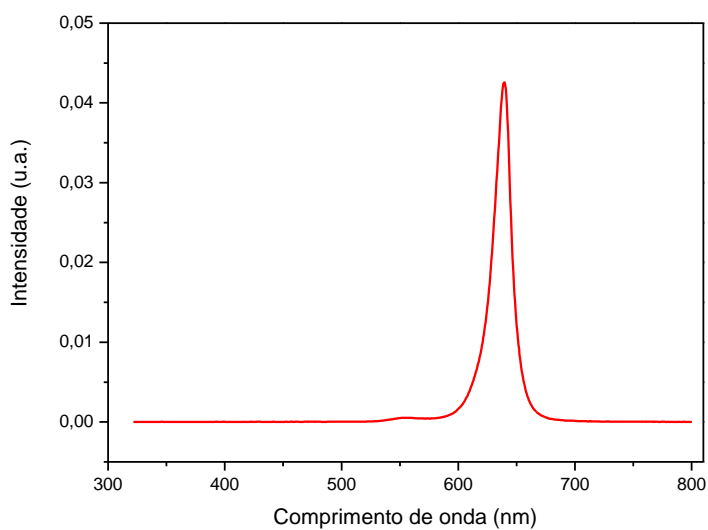


Gráfico 12 - Espectro de emissão do LED vermelho

O espectro de emissão do LED vermelho possui o pico de emissão em 640 nm, tendo uma largura de banda na ordem de 16 nm.

Todos os espectros foram normalizados pelo pico máximo (em cada caso) e desta maneira obteve-se o gráfico 13.

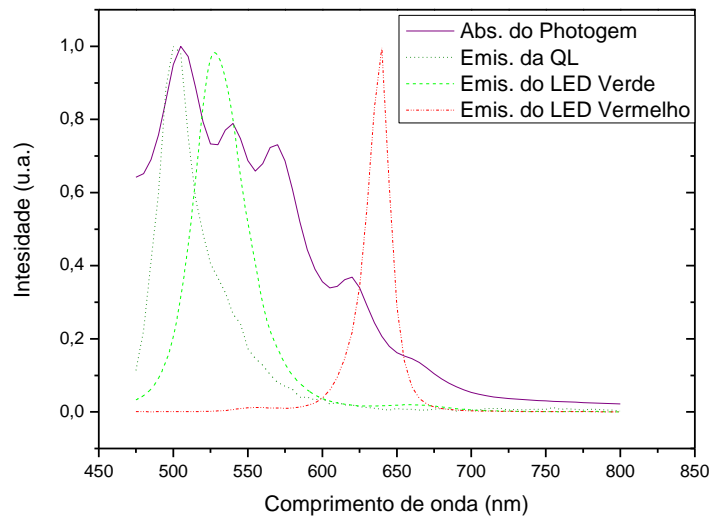


Gráfico 13 - Espectros normalizados pelo pico

Assim, foi possível estabelecer a correlação do FS e da fonte de luz em cada comprimento de onda avaliado, ou seja, a relação espectral do espectro de emissão da QL (e também pelos LED verde e LED vermelho) e do espectro de absorção do FS, descrevendo o grau de correlação entre os espectros. Essa correlação pode ser verificada pela equação 1.

$$\eta_{\lambda} = \frac{\int_{475}^{600} E(\lambda) A(\lambda) d\lambda}{\int_{475}^{600} A(\lambda) A(\lambda) d\lambda} \quad (1)$$

onde $E(\lambda)$ é o espectro de emissão da fonte de luz; $A(\lambda)$ é o espectro de absorção do fotossensibilizador. Esses símbolos foram adotados em todo o texto.

O parâmetro η_{λ} descreve um valor adimensional, ou seja, razão entre as integrais da relação entre o comprimento de onda emitido da QL e a absorção pelo FS. A mesma análise

foi realizada para o LED verde e LED vermelho. Este valor adimensional foi nomeado, neste trabalho, como **IAEs** (Índice de Aproveitamento Espectral).

Ainda sobre o estudo do índice de aproveitamento, foi verificado o aspecto energético na entrega da luz e assim, a equação 1 foi modificada e demonstrada na equação 2.

$$\eta_e(\lambda) = \frac{1}{\lambda} \frac{\int_{475}^{600} E(\lambda) A(\lambda) d\lambda}{\int_{475}^{600} A(\lambda) A(\lambda) d\lambda} \quad (2)$$

Desta maneira, o $\eta_e(\lambda)$ é um valor adimensional que relaciona a eficiência da transferência de energia do espectro de emissão das fontes de luz e a absorção do FS, denominada neste estudo como **IAEn** (Índice de Aproveitamento Energético).

Em termos gerais, os valores possíveis desta análise variam entre: $0 \leq \eta \leq 1$. Quando $\eta = 0$ a fonte de luz aplicada não apresenta nenhuma relação com o espectro de absorção do FS; enquanto isso, se $\eta = 1$ é o caso de maior correlação da fonte de luz e do fotossensibilizador, por exemplo, no caso de espectros sobrepostos. Portanto, o índice η_λ revela o quanto uma fonte de luz é relevante na ativação do agente fotossensível diante do comprimento de onda e $\eta_e(\lambda)$ revela o quanto uma fonte de luz é relevante na ativação do agente fotossensível perante o fator energético. A tabela 9 apresenta os valores obtidos nessa análise.

Tabela 9 - Valores dos índices de η_λ e $\eta_e(\lambda)$.

	FS*QL	FS*LED _{verde}	FS*LED _{vermelho}
η_λ	0,487	0,489	0,082
$\eta_e(\lambda)$	0,506	0,491	0,069

De acordo com a tabela 9 foi possível verificar que a melhor fonte de luz hipoteticamente utilizada seria aquela que possuísse o espectro de emissão idêntico ao espectro de absorção do FS, para $\eta_\lambda = \eta_e(\lambda) = 1$.

Os espectros de emissão do LED verde e da QL são muito semelhantes e por meio do **IAEs** a quantificação desta correlação demonstra que QL + Photogem[®] é 0,58% menos eficiente que o LED verde + Photogem[®]. No entanto, a correlação espectral da QL é 83% mais efetiva do que LED vermelho.

Perante a análise do **IAEn** ocorre uma inversão entre a QL e LED verde. Como o pico máximo de emissão da QL é $\lambda = 510$ nm enquanto para o LED verde é $\lambda = 527$ nm, há uma transferência energética mais efetiva à fonte de QL, e através do estudo matemático, a quimiluminescência é 2,95% mais relevante na ativação do FS do que o LED verde. A comparação do LED vermelho com a QL é uma afinidade de 86,24% maior da fonte de luz portátil do que à LED.

Em concordância aos dados apresentados, é possível verificar que perante uma análise espectral e energética, a quimiluminescência possui uma grande correlação com o fotossensibilizador em questão, quando comparado com o LED vermelho. Contudo, a quimiluminescência e o LED verde possui aplicabilidade à TFD muito similar entre si, sendo a QL menos de 0,6% eficiente sobre o parâmetro de comprimento de onda e mais relevante em, aproximadamente, 3% sobre o parâmetro energético. Portanto, é possível estabelecer que a quimiluminescência é uma potencial fonte de luz aplicada a técnica de terapia fotodinâmica (por meio do Photogem[®]) *in vitro*.

4.3 Etapa III

A etapa III é responsável pelo encerramento da pesquisa e também a validação do objetivo geral do trabalho, pois uma vez estabelecido o fotossensibilizador, a fonte de luz, a correlação espectral desses dois fatores e o MO, era necessário um desenho experimental que vinculasse tais parâmetros aos testes para verificação da eficiência fotodinâmica na sobrevivência do *S. aureus*.

O Grupo I (FS-QL-) teve como objetivo específico verificar se o MO iria sobreviver aos longos tempos propostos de experimentos, principalmente no subgrupo 1.3. A temperatura ideal de sobrevivência do *S. aureus* é de aproximadamente 37 °C e os experimentos ocorreram em temperatura ambiente. Outra preocupação relevante nesta etapa era a possibilidade de redução bacteriana devido à falta de nutrientes durante o experimento. Os resultados do grupo I são apresentados no gráfico 14 através de unidades formadoras de colônia (UFC), onde “100% UFC” significa zero de redução bacteriana e “0% UFC” significa uma total redução do MO.

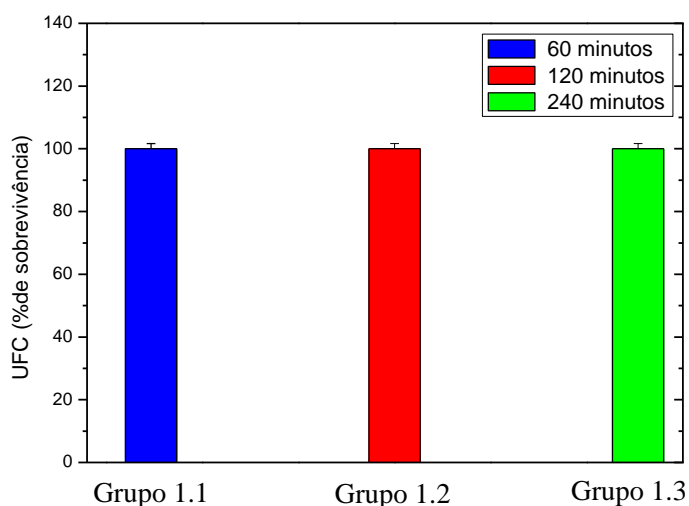


Gráfico 14 - UFC dos grupos 1.1, 1.2 e 1.3

A análise dos dados demonstra que a sobrevivência dos microrganismos ocorreu ainda que o experimento fora realizado em temperatura ambiente e o tempo total não ocasionou a morte dos MOs. Outra conclusão dos resultados do gráfico 14 é que o meio de cultura TSB é

funcional na distribuição de nutrientes durante todo o procedimento. Estes resultados certificam o procedimento adotado.

A finalidade de realizar estudos com a presença única da fonte de luz sobre o MO (grupo II) foi avaliar se há interferência da QL, ou seja, se ocorreria a aceleração da reprodução da bactéria ou acarretaria em redução microbiana. O gráfico 15 representa os dados deste grupo.

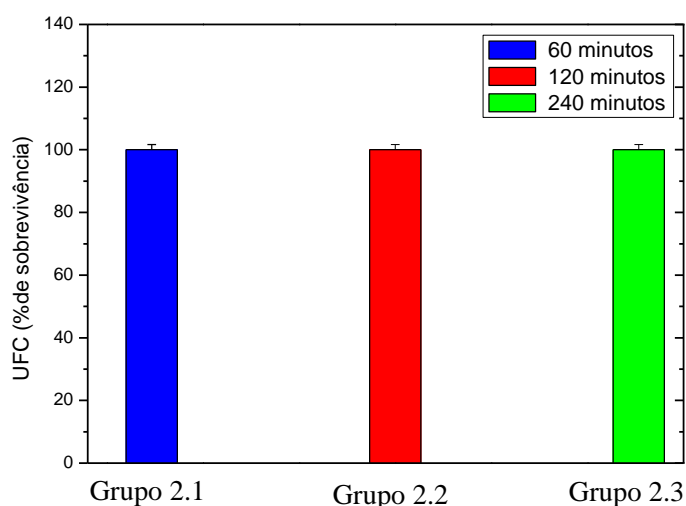


Gráfico 15 - UFC dos grupos 2.1, 2.2, e 2.3

Os dados do grupo II demonstram que a ação única da luz aplicada da QL não gera redução microbiana e não apresenta aumento significativo no número de UFC das amostras avaliadas. Portanto, apenas a aplicação da fonte de luz, nas condições avaliadas, não interferiu nas amostras de *S. aureus*.

Da mesma maneira que foi analisada a aplicação única da luz sobre as amostras, no grupo III foi avaliada a redução bacteriana na presença do FS (0, 6, 25, 50 and 75 µg/ml) nas amostras do MO na ausência de luz, ou seja, foi avaliada a citotoxicidade do Photogem® no escuro. Os dados deste grupo se encontram no gráfico 16.

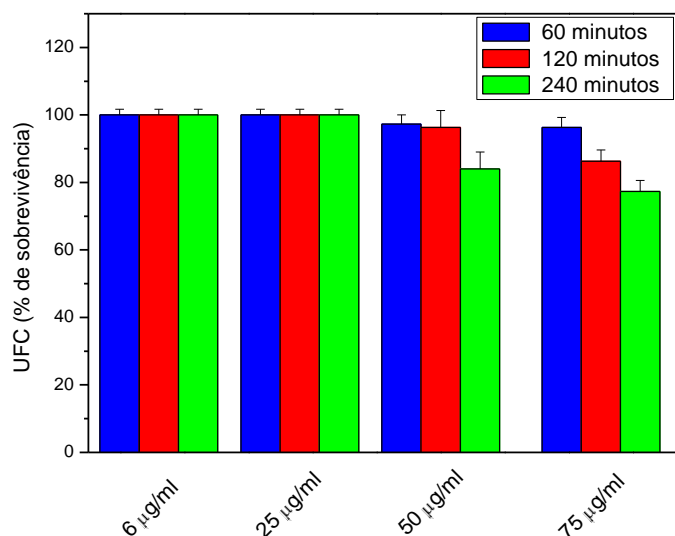


Gráfico 16 - UFC para o grupo III nos tempos avaliados

As colunas em azul estão relacionadas com o subgrupo 3.1, vermelha e verde, relacionadas com os subgrupos 3.2 e 3.3, respectivamente. Os resultados obtidos no grupo III evidenciam que os efeitos da toxicidade no escuro está relacionada com a concentração do FS e aos tempos avaliados, atingindo valores máximos de 20% de redução, no qual tais valores são considerados pouco significativos considerando um estudo de controle microbiano. A redução de UFC do *S. aureus* ocorre em concentrações maiores do que 25 µg/ml, pois até esta concentração de Photogem® não ocorreu redução microbiana nos três tempos avaliados.

Porém, na concentração de 50 µg/ml os resultados demonstram uma pequena redução microbiana. Nos experimentos de 60 e 120 minutos, a variabilidade dos resultados demonstra a redução do MO menor que 2%, sendo um efeito considerado como não significativo. No entanto, a redução bacteriana, observada nos experimentos de 240 minutos, foi próxima a 15%.

Os resultados avaliados na concentração de 75 µg/ml demonstram uma redução maior a partir de 120 minutos de contato do MO com o FS. O maior decréscimo foi observado no tempo de 240 minutos, com valores próximos a 22% na quantidade de UFC contadas no final do experimento.

Estabelecido que a bactéria sobrevive ao experimento nas condições propostas (grupo I); que a bactéria não é influenciada pela fonte de luz (grupo II) e que a bactéria se comporta,

dentro das variações aceitáveis, resistente às concentrações utilizadas de fotossensibilizador (grupo III). Assim, a resposta fotodinâmica (grupo IV) foi avaliada.

O grupo IV avaliou a redução bacteriana em três subgrupos, 4.1, 4.2 e 4.3, nas doses de luz igual a 0,5, 1,0 e 2,0 J/cm², respectivamente. Em cada subgrupo, utilizaram-se as quatro concentrações estabelecidas, além da avaliação na concentração igual a 0 µg/ml. Os resultados são apresentados no gráfico 17.

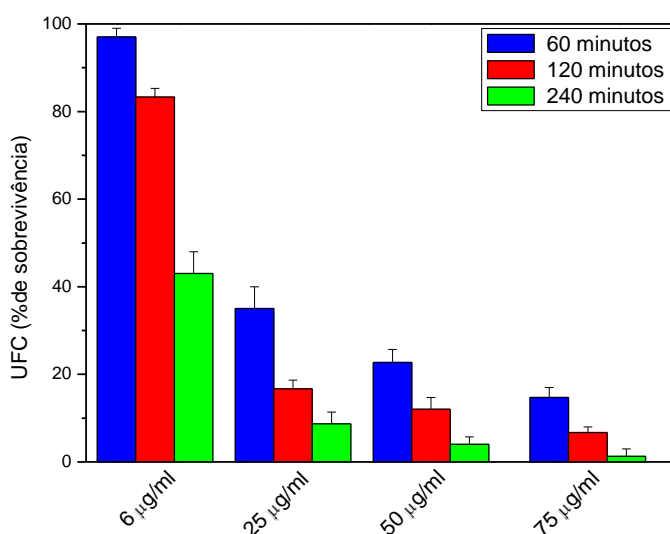


Gráfico 17 - UFC para o grupo IV

Os resultados do grupo IV demonstraram valores relevantes de redução bacteriana. A associação de 6 µg/ml e 60 minutos de terapia promoveu uma pequena diminuição de MO sobreviventes, cerca de 3% em comparação ao grupo controle. Ainda na concentração de 6 µg/ml houve uma redução microbiana de aproximadamente 16% em 120 minutos de iluminação e redução próxima a 57% para iluminação de 240 minutos.

Na dose de 0,5 J/cm² na concentração de 25 µg/ml obteve-se uma redução do MO maior quando comparada a dose de 2 J/cm² vinculado com a concentração de 6 µg/ml. Como era esperada, a maior redução bacteriana na concentração de 25 µg/ml foi na dose de 2 J/cm², igual a 91% e este comportamento foi observado em todos os outros subgrupos, ou seja, o fator de redução microbiana é dose-dependente.

A partir da concentração de 50 µg/ml até 75 µg/ml todas as reduções microbianas foram superiores a 75%. As taxas de redução foram próximas na dose de 2 J/cm² para as

concentrações de 50 e 75 µg/ml, 96% e 98%, respectivamente. Essa tendência é observada em todo o grupo IV como pode ser verificado na tabela 10.

Tabela 10 - A diferença de UFC para os diferentes subgrupos avaliados

Concentração do FS	Tempos de iluminação e a redução	Diferença percentual entre 1 e 2 horas	Diferença percentual entre 1 e 4 horas	Diferença percentual entre 2 e 4 horas
6 µg/ml	1 hora (3%); 2 horas (16%); 4 horas (57%)	13	54	41
25 µg/ml	1 hora (65%); 2 horas (83%); 4 horas (91%)	18	26	8
50 µg/ml	1 hora (77%); 2 horas (88%); 4 horas (96%)	11	19	8
75 µg/ml	1 hora (85%); 2 horas (93%); 4 horas (98%)	8	13	5

Esses resultados demonstram que a redução microbiana não é linearmente proporcional ao aumento da concentração do agente fotossensível. Os dados também superiores a 60 minutos, para as concentrações acima de 25 µg/ml não apresentaram grande aumento na redução microbiana. Porém, essa análise pode ser feita apenas para as concentrações de FS testadas, uma vez que apenas a presença de altas concentrações de FS podem ser citotóxica mesmo sem aplicação de fonte de luz.

Ainda sobre o gráfico 16, é possível determinar protocolos de aplicação de TFD com fonte de luz à base de QL relacionando as variáveis: FS e tempo de iluminação. Isso é possível devido aos resultados similares obtidos em diferentes situações, como é possível observar na redução bacteriana com 75 µg/ml (em 60 minutos) e na situação de 25 µg/ml de fotossensibilizador aplicado por 120 minutos. A mesma relação pode ser feita no efeito obtido com 75 µg/ml na amostra iluminada por 120 minutos causando uma redução análoga ao grupo com 25 µg/ml irradiado por 240 minutos.

Essa análise permite estabelecer que a terapia fotodinâmica vinculada com a fonte de luz à base de QL no controle microbiano além de ser dose-dependente é, também, concentração-dependente. O procedimento aplicado no controle microbiano pode ser estabelecido de diferentes maneiras: i) baixas concentrações de FS e tempos prolongados de iluminação ou ii) altas concentrações de FS e tempos curtos de irradiação. De acordo com os resultados obtidos, é possível que a combinação dos fatores avaliados (FS e fonte de luz) tende a equalizar o efeito fotodinâmico nas condições investigadas.

Apreciação dos resultados vinculando os quatro grupos avaliados permite estabelecer relações pertinentes ao trabalho. O gráfico 18 apresenta todos os resultados obtidos em 60 minutos de experimento (grupo I; II; III e IV).

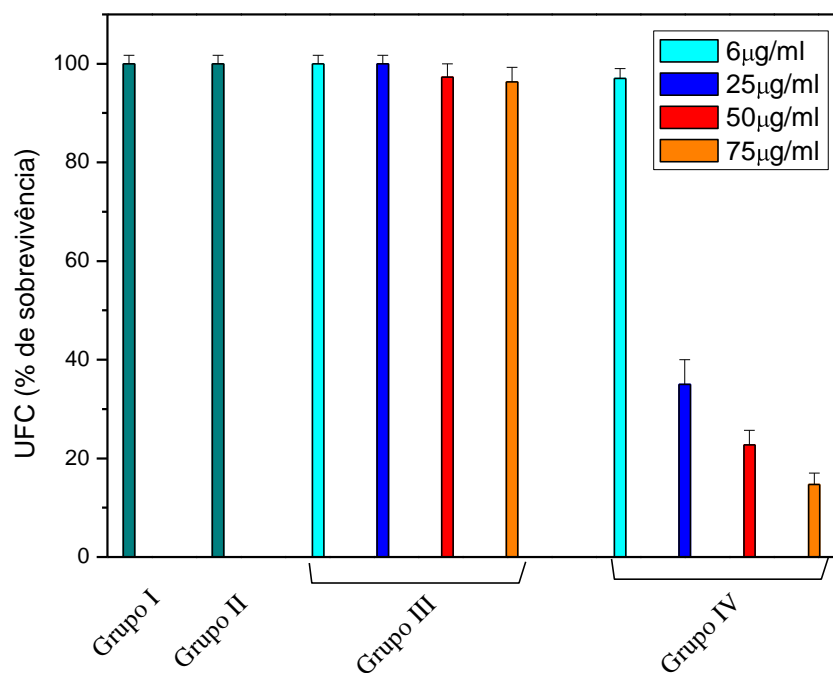


Gráfico 18 - Resultados dos grupos I, II, III e IV em 60 minutos avaliados

Em 60 minutos de experimento, a redução de colônias de *S. aureus* foi observada apenas a partir da concentração de 25 µg/ml no grupo IV e mesmo assim, houve resultados maiores que 80% de redução com 75 µg/ml.

A redução bacteriana entre os grupos I, II, III e 6 µg/ml do grupo IV não possui diferença significativa. Referente ao grupo IV, entre 25 µg/ml e 50 µg/ml há uma diferença de 7%; e entre 50 µg/ml e 75 µg/ml há uma diferença de 2,5%, na redução de UFC observada.

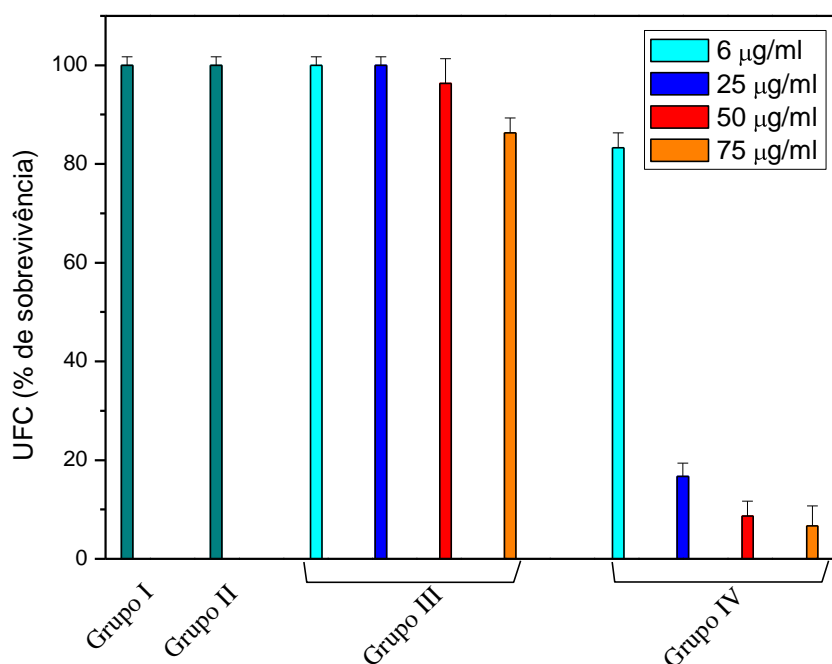


Gráfico 19 - Resultados dos grupos I, II, III e IV em 120 minutos avaliados

O gráfico 19 representa os resultados de 120 minutos de experimento e assim observou-se que a redução de UFC no grupo III na concentração 75 µg/ml é similar aos valores de 6 µg/ml no grupo IV, próximo de 15%. No Grupo IV, enquanto que 6 µg/ml resultou em apenas 15% de redução, uma concentração 3 vezes maior (25 µg/ml) resultou em mais de 80% na redução bacteriana.

A redução bacteriana entre os grupos I, II, e até 50 µg/ml do grupo III não possui diferença significativa. Referente ao grupo III, entre 50 µg/ml e 75 µg/ml há uma diferença de 25%. Referente ao grupo IV a maior diferença significativa observada é de 3,8 % entre 25 µg/ml e 75 µg/ml, excluindo-se o subgrupo de 6 µg/ml.

Os resultados dos quatro grupos avaliados em 240 minutos de experimento são apresentados no gráfico 20.

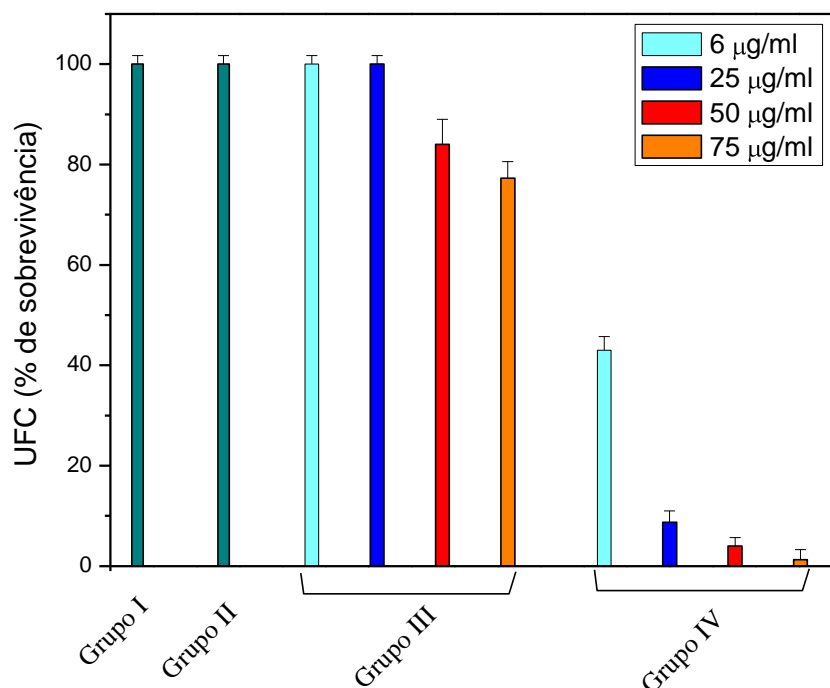


Gráfico 20 - Resultados dos grupos I, II, III e IV em 240 minutos avaliados

Após 4 horas de experimento, houve uma redução superior a 20% apenas na presença do FS (75 µg/ml). Porém, na menor concentração do agente fotossensível do grupo IV atingiu uma redução de UFC próxima a 60%. Todas as outras concentrações pesquisadas apresentaram controle microbiano superior a 90%.

O gráfico 20 possibilita verificar que até concentrações de 25 µg/ml sem a presença de luz, não há decréscimo nas colônias de MO viáveis após 240 minutos de contato com o fotossensibilizador.

A concentração de 6 µg/ml, no grupo TFD, se torna relevante apenas a partir de 240 minutos de iluminação. No entanto, isso não é observado na concentração de 25 µg/ml que desde 60 minutos de aplicação já alcançava valores de decréscimo de UFC superiores a 60%.

A redução bacteriana entre os grupos I, II, e até 25 µg/ml do grupo III não possui diferença significativa. Referente ao grupo III existe diferença entre 25 µg/ml e 50 µg/ml, como é possível observar no gráfico 20. Porém, ainda no grupo III, entre 50 µg/ml e 75 µg/ml

não há diferença significativa. Referente ao grupo IV a maior diferença significativa observada é de 3 % entre 25 µg/ml e 75 µg/ml, excluindo-se o subgrupo 6 µg/ml.

Para o MO investigado neste estudo, os índices de redução microbiana obtidos são similares aos resultados apresentados pelos trabalhos que realizaram TFD convencional, ou seja, alta intensidade aplicada e pouco tempo de iluminação de acordo com a literatura (2, 5, 32). A união dos últimos três gráficos é apresentada no gráfico 21 (em log UFC/ml).

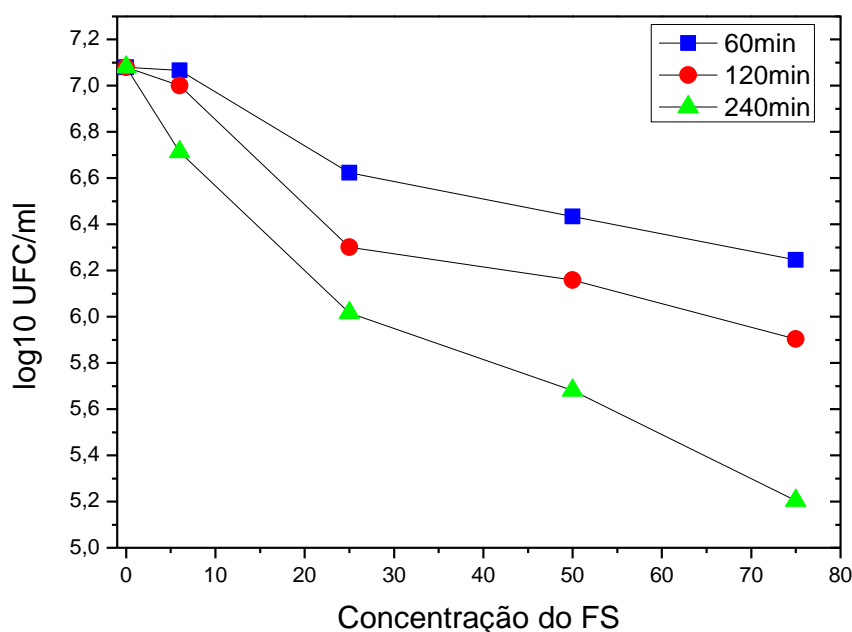


Gráfico 21 - Resultados dos grupos I, II, III e IV nos três tempos avaliados

O gráfico 21 mostra que os resultados realizados em 60 minutos não geraram redução logarítmica de uma ordem. No entanto, os dois outros tempos avaliados geraram mais de uma ordem logarítmica de redução microbiana, tornando-se factível estabelecer a quimiluminescência como uma fonte de luz viável na aplicação de TFD *in vitro*.

5 FUTURAS DIREÇÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, é possível elencar algumas possíveis aplicações em duas grandes áreas: i) reações de quimiluminescência laboratorial; ii) dispositivos e formas de aplicações da QL em terapia fotodinâmica para redução microbiana.

De acordo com as reações avaliadas na etapa I deste trabalho, é razoável estabelecer que a partir dos variados reagentes utilizados obteve os melhores resultados possíveis.

Porém, em futuros trabalhos, pode-se pensar na possibilidade do estabelecimento de outras reações de QL para outros FS, além de outros produtos químicos na tentativa de atingir melhores resultados referentes ao tempo de meia-vida, intensidade e espectro de emissão da fonte de luz.

Dentre os novos reagentes avaliados, o mais relevante seria o ativador, pois uma das principais características que ele agrega é o perfil do espectro emitido. Diferentes ativadores, não testados neste estudo, podem resultar em bandas de emissão relevantes para a aplicação da QL em terapia fotodinâmica.

O trabalho possível de ser realizado, e de grande valor à TFD, é realizar misturas de dois, ou mais, ativadores na reação com o intuito de correlacionar o espectro de emissão da fonte de luz com o espectro de absorção do fotossensibilizador utilizado. Estes espectros de emissão obtidos, podem ser avaliados por meio da técnica utilizada neste trabalho, os modelos de **IAEs** e **IAEn**.

Vale ressaltar que a utilização de outros ativadores, provavelmente, exija outros solventes e, obviamente, diferentes pontos-ótimos das concentrações de todos os agentes envolvidos da reação química.

Muitas pesquisas, no âmbito da química orgânica, podem ser realizadas ao mesmo tempo das futuras direções que a QL aplicada em várias vertentes da terapia fotodinâmica, *in vitro* como *in vivo*. Ainda no estudo do controle microbiano com a bactéria *S. aureus*, é plausível avaliar a viabilidade de aplicação de uma única reação de quimiluminescência (sem ocorrer troca e/ou reativações).

É aceitável que o início das pesquisas e aplicações *in vivo* seja a realização de estudos em modelo animal de tecidos infectados com a finalidade de avaliar o efeito fotodinâmico nos tecidos fotossensibilizados, infecções/queimaduras infectadas e a influência da fonte de luz (de baixa intensidade e tempo prolongado de aplicação) na cicatrização.

A quimiluminescência como fonte de luz em terapia fotodinâmica agrega valor à técnica em muitas vertentes. Primeiramente, independência da energia elétrica e mobilidade ao paciente que não necessita, obrigatoriamente, permanecer em hospitais/clínicas durante a aplicação e em segundo lugar (e não menos importante) a possibilidade de dispositivos anatômicos e altamente customizados a cada aplicação/paciente devido a característica intrínseca da QL, ou seja, o estado líquido dos reagentes envolvidos da reação química.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a possibilidade do uso da quimiluminescência como uma fonte de luz externa ao processo fotodinâmico em controle microbiano *in vitro*. Nesse estudo, foi possível verificar que, dentre os reagentes químicos avaliados, a quimiluminescência de maior viabilidade em laboratório possui uma reação, de características similares, disponível comercialmente. Essa reação de QL foi avaliada empregando um modelo matemático, similar à teoria de Förster, que investigou a relação do espectro de emissão da fonte de luz com o espectro de absorção do fotossensibilizador sobre os parâmetros energéticos e comprimento de onda e atingiu resultados que demonstravam alta possibilidade de sucesso na aplicação *in vitro*. Ainda sobre o modelo matemático, os resultados obtidos da QL foram relacionados com fonte de luz baseada à LED (pico de emissão em $\lambda = 527$ nm e outro com $\lambda = 640$ nm) e demonstrou semelhanças entre a QL e LED_{verde} e vantagens significativas entre a QL e LED_{vermelho}. No estudo *in vitro*, observou-se que a quimiluminescência aplicada em amostras de *Staphylococcus aureus* fotossensibilizadas por Photogem[®] demonstrou redução microbiana em níveis aceitáveis a partir de 25 µg/ml de FS em 60 minutos de iluminação e 6 µg/ml de FS e 120 minutos de irradiação. Atingiram-se valores superiores a 98% de redução bacteriana nas amostras com 75 µg/ml e 240 minutos de terapia. Os dados e as análises apresentadas demonstram que a irradiação por meio da fonte de luz baseada em quimiluminescência promove redução microbiana similar aos resultados verificados na literatura que utilizam *lasers*, LED ou lâmpadas consagrando-se a quimiluminescência como uma viável fonte de luz aplicada em terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

1. OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I. The role apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.1, p.1-21, 2002. DOI: 10.1039/b108586g.
2. BAGNATO, V.S.. **Novas técnicas ópticas para área da saúde**. São Paulo: Livraria da Física, 2008.
3. JORI, G. et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.38, p.468-481, 2006. DOI: 10.1002/lsm.20361.
4. AGUINALDO, S. G. S. **Mecanismo da terapia fotodinâmica em presença de peróxido de hidrogênio**. 2007. 80f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
5. 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.
6. FERREIRA, J.; KURACHI, C.; MORIYAMA, L. T.; MENEZES, P. F. C.; PERUSSI, J. R.; SIBATA, C.; ZUCOLOTO, S.; SILVA, O. C.; BAGNATO, V. S. Correlation between the photostability and photodynamic efficacy for different photosensitizers. **Laser Physics Letters**, v. 3, n.2, p.91-95, 2006.
7. BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers Medicine Science**, v. 17, n. 3, p. 173-186, 2002.
8. MOSELEY, H. et al. Ambulatory photodynamic therapy: a new concept in delivering photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v.154, p.747-750, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2006.07145.x.

9. RAUHUT, M. M.; BOLLYKY, L. J.; ROBERTS, B. G.; LOY, M.; WHITMAN, R. H.; IANNOTTA, A. V.; SEMSEL, A. M.; CLARKE, R. A. Chemiluminescence from reactions of electronegatively substituted aryl oxalates with hydrogen peroxide and fluorescent compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v.6, p.6515-6522, 1967.
10. SCHUSTER, G. B. Chemiluminescence of organic peroxides, conversion of ground-state reactants to excited-state products by the chemically initiated electron-exchange luminescence mechanism. **Accounts of Chemical Research**, v.12, p.366-373, 1979.
11. ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M. A. G.; BASTOS, E. L.; RÖPKE, S.; SAKAI, P. N.; SANCHES, A. M. M.; STEVANI, C. V.; UMEZU, I. S.; JOANA, Y.; BAADER, W. J. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. **Química Nova**, v.21, n.6, p.772-779, 1998.
12. STEVANI, C. V.; E BAADER, W.J. O sistema quimiluminescente peróxi-oxalato. **Química Nova**, v.22, n.5, p. 715-723, 1999.
13. ATTILI, S.K.; LESAR, A.; MCNEILL, A.; CAMACHO-LOPEZ, M.; MOSELEY, H.; IBBOTSON, S.; SAMUEL, I.D.W.; FERGUSON, J. An open pilot study of ambulatory photodynamic therapy using a wearable low-irradiance organic light-emitting diode light source in the treatment of nonmelanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, v.161, p.170-173, 2009.
14. SESHADRI, M.; BELLNIER, D.A.; VAUGHAN, L.A.; SPENYAK, J. A.; MAZURCHUK, R.; FOSTER, T. H.; HENDERSON, B. W. Light delivery over extended time periods enhances the effectiveness of photodynamic. **Clinical Cancer Research**, v.14, n.9, p.2797-2805, 2008.
15. BISLAND, S.K.; GOEBEL, E.A.; HASSANALI, N.S.; JOHNSON, C.; WILSON, B.C. Increased expression of mitochondrial benzodiazepine receptors following low-level light treatment facilitates enhanced protoporphyrin IX production in glioma-derived cells in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.39, p.678-684, 2007. DOI: 10.1002/lsm.20544.
16. TSUTSUI, H.; MACROBERT, A.J.; CURNOW, A.; ROGOWSKA, A.; BUINACCORSI, G.; KATO, H. BOWN, S.G. Optimisation of illumination for photodynamic therapy with

mTHPC on normal colon and a transplantable tumour in rats. **Lasers Medicine Sciences**, v.17, p.101-109, 2002.

17. BABILAS, P. et al. In vitro and in vivo comparison of two different light sources for topical photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v.154, p.712-718, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2006.07143.x.

18. WILSON, M.; BURNS, T.; PRATTEN, 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.

19. LAMBRECHTS, S.A.; DEMIDOVA, T.N.; AALDERS, M.C.; HASAN, T.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for Staphylococcus aureus infected burn wounds in mice. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.4, n.7, p.503-509, 2005.

20. MILLSON, C.E.; WILSON, M.; MACROBERT, A.J.; BEDWELL, J.; BOWN, S.G. The killing of Helicobacter pylori by low-power laser light in the presence of a photosensitizer. **Journal of Medical Microbiology**, v.44, p.245-252, 1996.

21. ZEINA, B.; GREENMAN, J.; PURCELL, W.M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v.144, p.274-278, 2001.

22. WAINWRIGHT, M. et al. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus. **FEMS Microbiology Letters**, v.160, p.177-181, 1998.

23. GRINHOLC, M.; SZRAMKA, B.; KURLENDA, J.; GRACZYK, A.; BIELAWSKI, K.P. Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus is strain-dependent. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.90, p. 57–63, 2008.

24. HAMBLIN, M.R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, p.436-450, 2004. DOI: 10.1039/b311900a.

25. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.42, p.13-28, 1998.
26. DAI, T.; HUANG, Y.; MICHAEL, R.; HAMBLIN, M.R. Photodynamic therapy for localized infections – state of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.6, p.170-188, 2009. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2009.10.008.
27. VERMA, S. et al. Antimicrobial photodynamic efficacy of side-chain functionalized Benzo[a]phenothiazinium dyes. **Photochemistry and Photobiology**, v.85, p.111–118, 2009.
28. TEGOS, G.P. et al. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorine(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.4, p.1402-1410, 2006.
29. JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art an perspective. **Journal of Enviromental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.25, n.1, p.505-519, 2006.
30. FEDERICO, M.L. et al. Photoinativation of bacterial strains involved in periodontal diases sensitized by prophycene-polylysine conjugates. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.1, p.468-470, 2002. DOI: 10.1039/b200977c.
31. VENEZIO, F.R. et al. Bactericidal effects of photoradiation therapy with haematoporphyrin derivative. **The Journal of Infectious Diseases**, v.151, n.1, p.166-169, 1985.
32. GOIS, M.M.; KURACHI, C.; SANTANA, E.J.B.; MIMA, E.G.O.; SPOLIDÓRIO, D.M.; PELINO, J.E.; BAGNATO, V.S. Susceptibility of Staphylococcus aureus to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. **Lasers Medicine Sciences**, 2009. In press. DOI: 10.1007/s10103-009-0705-0.

33. O'RIODAN, K.; AKILOV, O.E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 247-262, 2005. DOI: 10.1016/s1572-1000(05)00099-2
34. PARJAM, S.Z. et al. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. **BMC Microbiology**, v.9, n.27, p.1-8, 2009.
35. LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum, 1999.

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](#)