

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

JULIANE NADAL DIAS SWIECH

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FOTODINÂMICAS DOS COMPOSTOS
[Fe(TPPS₄)] E [H₂(TMPyP)] PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO FÁRMACO EM
TERAPIA FOTODINÂMICA

PONTA GROSSA

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JULIANE NADAL DIAS SWIECH

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FOTODINÂMICAS DOS COMPOSTOS
[Fe(TPPS₄)] E [H₂(TMPyP)] PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO FÁRMACO EM
TERAPIA FOTODINÂMICA

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Christiane Philippini Ferreira Borges

PONTA GROSSA
2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/ UEPG

S976e Swiech, Juliane Nadal Dias
Estudo das propriedades fotodinâmicas dos compostos [Fe(TPPS₄)]
e [H₂(TMPyP)] para potencial aplicação como fármaco em terapia
fotodinâmica / Juliane Nadal Dias Swiech. Ponta Grossa, 2010.
110f.
Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade
Estadual de Ponta Grossa .
Orientadora: Profa. Dra. Christiane Philippini Ferreira Borges

1. Atividade Fotodinâmica. 2. Análise Espectroscópica .
3. Fe(TPPS₄). 4. [H₂(TMPyP)]. 5. Micro-organismos. I. Borges,
Christiane Philippini Ferreira. II. T.

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANE NADAL DIAS SWIECH

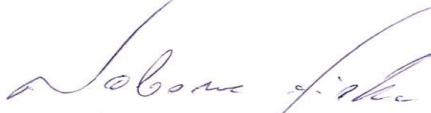
“ESTUDO DAS PROPRIEDADES FOTODINÂMICAS DOS COMPOSTOS
Fe(TPPS4) E H2(TMPyP) PARA POTENCIAL APLICAÇÃO COMO FÁRMACO
EM TERAPIA FOTODINÂMICA.”

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

Orientador:


Profª.Drª. Christiane P. F. Borges
UEPG/PR


Profª.Drª. Jacqueline Aparecida Marques
UEPG/PR


Prof.Dr. Noboru Hioka
UEM/PR

Ponta Grossa, 3 de Setembro de 2010

*Aos meus pais, Orlando e Linda,
exemplos de amor, honestidade e dedicação,
responsáveis por todo o incentivo ao estudo,
sempre investindo e acreditando em mim.*

*Ao meu marido Marcelo,
grande incentivador do meu sonho,
e que esteve sempre presente
com paciência, apoio, e companheirismo.*

*Aos meus filhos Guilherme e Eduardo,
pelo sacrifício da ausência da mãe,
pela colaboração e compreensão,
vocês são a razão pela qual este trabalho acontece.*

É por amor que dedico este trabalho a vocês.

AGRADEÇO

A Deus, pela vida, pela força e por sempre ter motivos para agradecer.

A minha orientadora, Dr.^a Christiane P. F. Borges, pela sua amizade, exemplo, compreensão, paciência e dedicação. “Gigantes são aqueles dos quais, nos ombros me elevei”. Serei para sempre grata.

A minha família que sempre esteve presente me apoiando, e credibilizando os estudos da irmã, neta, nora, cunhada e tia. Enfim, agradeço a toda família.

Às amigas Ariana Rodrigues Antonangelo, Jeanine Domareski Silva, Marilei Casturina Mendes e Rosana Balzer, pela colaboração nas discussões sobre o tema e pelo apoio nas etapas de realização dos experimentos.

À Professora Dr.^a Elisabete Brasil, pela ajuda e disponibilização do laboratório.

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

À CAPES/PROAP e Fundação Araucária, pelo financiamento para equipamentos e reagentes utilizados.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento minimamente invasiva que depende de dois componentes: fotossensibilizador (FS) e luz. Consiste na administração de um fármaco que, ao atingir o seu sítio de ação, é irradiado por luz, cujo comprimento de onda é absorvido, e catalisa a produção de radicais de oxigênio, e de oxigênio singlete, que desencadeiam a morte celular do tecido atingido, por necrose ou apoptose. Por ser promissora no tratamento em infecções bacterianas e em cânceres (principalmente em câncer de pele do tipo não melanoma), muitos estudos buscam novos compostos fotossensibilizadores que sejam eficazes e apresentem poucos efeitos colaterais. O objetivo desse trabalho foi investigar a eficiência fotodinâmica dos compostos cloreto de [5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinato ferro(III)], [Fe(TPPS₄)]Cl, e *p*-toluenosulfonato de 5, 10, 15, 20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina, [H₂(TMPyP)], através de ensaios espectroscópicos e citotóxicos utilizando sistema de LED para irradiação, visando posterior utilização em Terapia Fotodinâmica. Utilizou-se o método do ácido úrico para determinação da atividade fotodinâmica, a análise do comportamento espectroscópico a partir de alterações do pH do meio, na ausência e presença de CTAB, interpretações de reações de fotobranqueamento, e avaliou-se a atividade fotodinâmica através de ensaios *in vitro* com micro-organismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) e *Artêmia salina*. Os resultados apresentados neste trabalho com a porfirina [H₂(TMPyP)] utilizando-se LED na irradiação, demonstraram que o sistema porfirina/LED tem potencial para ser utilizado em TFD, uma vez que apresentou atividade fotodinâmica satisfatória, e uma inibição significativa nas UFCs dos micro-organismos estudados, principalmente quando se fez uso de LED vermelho. A metaloporfirina [Fe(TPPS₄)]Cl apresentou menores valores de atividade fotodinâmica no teste de AU e nos testes com micro-organismos, nas condições experimentais utilizadas, quando comparada com [H₂(TMPyP)].

Palavras-chave: Atividade Fotodinâmica. Análise Espectroscópica. [Fe(TPPS₄)]Cl. [H₂(TMPyP)]. Micro-organismos.

ABSTRAT

Photodynamic therapy (PDT) is a kind of treatment minimally invasive which depends on two components: photosensitizer and light. It consists of the administration of a drug which after reaching its action site is activated by light, whose wavelength is absorbed and catalyses the production of free radicals oxygen, and singlet oxygen, which trigger the cellular death of the unhealthy tissue, either by necrosis or apoptosis. As this technique appears as very promising in the treatment of bacteria infections and cancers (mainly skin cancer of the non-melanoma), several studies seek new photosensitizers compounds which are efficient and present little collateral effect. The aim of this study was to investigate the photodynamic efficiency of [5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatophenyl) porphyrinato Iron (III)], chloride, [Fe(TPPS₄)]Cl, and 5, 10, 15, 20-tetrakis(*N*-methyl-4-pyridyl) porphyrin *p*-toluenesulfonate, [H₂(TMPyP)], compounds, through spectroscopic and cytotoxic analysis, using LED irradiation system, for later use in photodynamic therapy. The uric acid method was employed in order to determine the photodynamic activity, analyse the spectroscopic behavior regarding alterations in the environment pH, with and without CTAB and interpret photobleaching reactions. Toxicity was evaluated through *in vitro* experiments with microorganisms (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) and *Artêmia salina*. Results presented in this work with [H₂(TMPyP)] porphyrin, using LED irradiation, demonstrated that the porphyrin:LED system can be used in PDT, once it presented satisfactory photodynamic activity, and significant inhibition of CFUs (Colony forming units), regarding the micro organisms under study, mainly when the red LED was used. Metalporphyrin [Fe(TPPS₄)]Cl presented lower photodynamic activity values in both AU and microorganisms tests under the experimental conditions employed when compared to [H₂(TMPyP)].

Key-words: Photodynamic activity. Spectroscopic Analysis. [Fe(TPPS₄)]Cl. [H₂(TMPyP)]. Microorganisms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura no anel porfirínico com numeração de carbonos e nitrogênios.	16
Figura 2-Representação de exemplos de estruturas das porfirinas de (a) 1ª geração (b) 2ª geração e (c) 3ª geração (ALBERTI, 2009).	17
Figura 3- Espectro de absorção UV-Vis da porfirina [H ₂ (TMPyP)], (a) banda <i>Soret</i> (b) bandas Q.	18
Figura 4- Estrutura do Complexo ferro porfirina - grupo heme presente na hemoglobina e na mioglobina	20
Figura 5- Espectro de absorção UV-Vis da porfirina [Zn(TPPS ₄)], (a) banda de <i>Soret</i> (b) bandas Q. ..	22
Figura 6- Interação entre as moléculas dos fotossensibilizadores para formar agregados.	24
Figura 7- Diagrama de níveis de energia dos orbitais moleculares do O ₂ no seu estado fundamental (ATKINS,JONES, 2006).	27
Figura 8- Representação dos orbitais moleculares π^*_x e π^*_y relativos às formas $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$ do oxigênio singlete.	29
Figura 9- Mecanismos (Tipo I e II) de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio no estado fundamental (3O_2).	31
Figura 10- Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração de luz de diferentes comprimentos de onda.	35
Figura 11- Fotobranqueamento de um composto porfirínico metalado, na presença de oxigênio singlete (RIBEIRO, JORGE, 2004).	36
Figura 12- Representação esquemática das camadas da pele.....	38
Figura 13- Modelo proposto por Nicholson para membrana biológica (SILVERTHORN, 2010).	41
Figura 14- Estrutura de uma mitocôndria.....	42
Figura 15- Mecanismo de ação da TFD na eliminação de células cancerosas (SILVA, SANTOS, RICCI JR, 2009, adaptado).	44
Figura 16- Representação do arranjo de moléculas anfifílicas em água: a) na interface água-ar; b) no arranjo micelar (PREVIDELLO et al., 2006, adaptado).	47
Figura 17- Foto-oxidação do ácido úrico via 1O_2 (MAESTRIN et al., 2004).	48
Figura 18- Ciclo de vida da <i>Artémia salina</i> (esquerda) e sua forma adulta (direita).....	51
Figura 19- Estrutura esquemática da parede celular de bactérias Gram-positivas.	52
Figura 20-Estrutura esquemática da parede celular de bactérias Gram-negativas.	52
Figura 21- Estrutura da cloreto de [5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinato de ferro(III)] [Fe(TPPS ₄)]Cl.	57
Figura 22- Estrutura da p-toluenosulfonato de 5, 10, 15, 20-tetrakis(<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina [H ₂ (TMPyP)].	58
Figura 23- Ilustração da fonte de luz à base de LED alaranjado (a), vermelho (b) e verde (c).....	59
Figura 24- Fórmula estrutural do CTAB	61
Figura 25- Sistema de LED, utilizado para iluminação das soluções de porfirina.	62
Figura 26-Fórmula molecular do ácido úrico.....	63
Figura 27- Recipiente utilizado para eclosão dos ovos de <i>Artémia salina</i>	64
Figura 28- Espectro de absorbância na região de 300 a 700 nm em solução aquosa contendo 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de [Fe(TPPS ₄)]Cl em pH 6,5.	66
Figura 29- Variação da absorbância em 396 nm, com a concentração de [Fe(TPPS ₄)]Cl em água. ..	67
Figura 30- Espectro de absorção na região de 300 a 700 nm em solução aquosa contendo 1,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de [H ₂ (TMPyP)] (MENDES, 2008).	69
Figura 31- Espectro de absorção de [Fe(TPPS ₄)]Cl 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em água na faixa de pH entre 7,0 e 1,0.....	70
Figura 32- Espectros de absorção de [Fe(TPPS ₄)]Cl 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em água na faixa de pH entre 7,0 e 1,0 e posteriormente entre 1,0 e 10,0.	71
Figura 33- Espectros de absorção de [Fe(TPPS ₄)]Cl 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em água na faixa de pH entre 6,0 e 12,5.....	72

Figura 34- Espectros de absorção de [Fe(TPPS ₄)]Cl 5,0 µmol.L ⁻¹ em água, na faixa de pH entre 5,8 e 12,1.....	72
Figura 35- Espectros de absorção de [Fe(TPPS ₄)]Cl 4,3 µmol.L ⁻¹ em presença de micelas de CTAB, na faixa de pH entre 4,9 e 11,5.....	74
Figura 36- Espectros de absorção de [Fe(TPPS ₄)]Cl a 1,7 µmol. L ⁻¹ em diferentes proporções de água/etanol.....	76
Figura 37- Espectro de emissão para LED vermelho utilizado.....	78
Figura 38- Espectro de emissão para LED alaranjado utilizado.....	78
Figura 39- Espectro de emissão para LED verde utilizado.....	79
Figura 40- Espectros de absorção de solução contendo [Fe(TPPS ₄)]Cl 5,0 µmol.L ⁻¹ em água, durante 60 minutos de iluminação com LED alaranjado. As setas verde, amarela e vermelha, indicando o λ _{máx} de emissão de cada sistema de LED utilizado.	80
Figura 41- Espectros de absorção de solução contendo 1,78 µmol.L ⁻¹ da porfirina [H ₂ (TMPyP)] durante 60 minutos de iluminação com LED verde. As setas verde, amarela e vermelha, indicando o λ _{máx} de emissão de cada sistema de LED utilizado.	81
Figura 42- Espectros de absorção de 200 a 700 nm, contendo solução de ácido úrico 1,0x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ , e solução de [Fe(TPPS ₄)]Cl 1,0 µmol.L ⁻¹ , iluminado com LED verde.....	82
Figura 43- Espectros de absorção de 200 a 700 nm, de solução contendo ácido úrico 1,0x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ , e solução de [H ₂ (TMPyP)] em 1,0 µmol.L ⁻¹ , iluminado com LED verde.	83
Figura 44- Percentual de mortalidade de [Fe(TPPS ₄)]Cl frente a <i>Artêmia salina</i> com iluminação (LED verde, alaranjado e vermelho), e sem iluminação.	85
Figura 45- Efeito da porfirina [Fe(TPPS ₄)]Cl na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ frente <i>Escherichia coli</i> , sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.....	89
Figura 46- Efeito da porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ frente <i>Escherichia coli</i> , sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.....	89
Figura 47- Unidades formadoras de colônias de <i>Escherichia coli</i> (a) na ausência de luz e de porfirina (L-P-); (b) na presença da porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ , iluminada com LED vermelho 30 minutos (L+P+).	90
Figura 48- Efeito de [Fe(TPPS ₄)]Cl na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ frente <i>Staphylococcus aureus</i> , sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.....	93
Figura 49- Efeito da porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ frente <i>Staphylococcus aureus</i> , sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.....	93
Figura 50- Unidades formadoras de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i> em presença de porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ (a) Controle ausência de luz (L-P+) (b). iluminada com LED vermelho durante 30 minutos (L+P+).	94
Figura 51- Efeito de [Fe(TPPS ₄)]Cl na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ frente <i>Candida albicans</i> , sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.....	97
Figura 52- Efeito da porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ frente <i>Candida albicans</i> , sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.....	97
Figura 53- Unidades formadoras de colônias de <i>Candida albicans</i> (a) Controle ausência de luz e de porfirina (L-P-) (b).em presença de porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L ⁻¹ iluminada com LED vermelho durante 30 minutos (L+P+).	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do O ₂ (MACHADO, 2000).....	28
Tabela 2- Valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) para as bandas de absorção de [Fe(TPPS ₄)]Cl em água e etanol.....	68
Tabela 3- Valores médios de algumas grandezas, obtidas através dos espectros do teste do AU para os compostos [Fe(TPPS ₄)]Cl e [H ₂ (TMPyP)].	84
Tabela 4- Efeito dos diferentes grupos experimentais em <i>Escherichia coli</i> (UFC.mL ⁻¹ x10 ²), para o composto [Fe(TPPS ₄)]Cl na concentração 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.....	87
Tabela 5- Efeito dos diferentes grupos experimentais em <i>Escherichia coli</i> (UFC.mL ⁻¹ x10 ²), para a porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.....	88
Tabela 6- Efeito dos diferentes grupos experimentais em <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC.mL ⁻¹ x 10 ²), para a porfirina [Fe(TPPS ₄)]Cl na concentração 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.....	92
Tabela 7- Efeito dos diferentes grupos experimentais em <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC.mL ⁻¹ x 10 ²), para a porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.....	92
Tabela 8- Efeito dos diferentes grupos experimentais em <i>Candida albicans</i> (UFC.mL ⁻¹ x 10 ²), para a porfirina [Fe(TPPS ₄)]Cl na concentração 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.....	95
Tabela 9- Efeito dos diferentes grupos experimentais em <i>Candida albicans</i> (UFC.mL ⁻¹ x 10 ²), para a porfirina [H ₂ (TMPyP)] na concentração 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.....	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

AF	atividade fotodinâmica
AU	ácido úrico
cmc	concentração micelar crítica
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
ϵ	coeficiente de absorvidade molar
EROs	espécies reativas de oxigênio
[Fe(TPPS ₄)]Cl	Cloreto de [5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinato de ferro(III)]
FS	fotossensibilizador
HPS	<i>N</i> -hexadecil - <i>N,N</i> , dimetil- 3- amônio-1- propanosulfonato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
[H ₂ (TMPyP)]	<i>p</i> -toluenosulfonato de 5, 10, 15, 20-tetrakis(<i>N</i> -metil-4-piridil)porfirina
IC	conversão interna
IUPAC	do termo: <i>international union of pure and applied chemistry</i>
LED	Diodo emissor de luz , do termo: <i>light emitting diodes</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
O ₂ ^{-•}	ânion-radical superóxido
¹ O ₂	oxigênio singlete
[•] OH	radical hidroxila
P _{abs}	potência absorvida
PDT	terapia fotodinâmica, do termo: <i>photodynamic therapy</i>
pH	potencial hidrogeniônico
pK _d	pK de dimerização
S ₁	estado singlete
S ₀	estado singlete fundamental
TAS	teste toxicidade sobre <i>Artêmia salina</i>
TFD	terapia fotodinâmica
T _n	estado excitado triplete superior
TSA	tripticase soy agar

UEM	Universidade Estadual de Maringá
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFC	unidades formadoras de colônias
UV-Vis	ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	PORFIRINAS	15
1.1.1	Coeficiente de absorvidade molar.....	19
1.2	METALOPORFIRINAS.....	20
1.3	AGREGAÇÃO	23
1.4	FLUORESCÊNCIA.....	26
1.5	MECANISMO DE AÇÃO DO FS NA TERAPIA FOTODINÂMICA	26
1.6	ABSORÇÃO DE LUZ PELO FOTOSSENSIBILIZADOR.....	34
1.7	FARMACOCINÉTICA.....	37
1.8	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DE UM FS.....	45
1.8.1	Toxicidade	45
1.8.2	Hidrofilicidade e hidrofobicidade.....	45
1.8.3	Alto rendimento quântico de oxigênio singlete	48
1.9	ESTUDOS IN VITRO.....	50
1.9.1	<i>Artêmia salina</i>	50
1.9.2	Micro-organismos	51
2	OBJETIVOS	56
2.1	OBJETIVO GERAL.....	56
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1	MATERIAIS.....	57
3.2	MÉTODOS	60
3.2.1	Determinação do coeficiente de absorção de porfirinas	60
3.2.2	Determinação da capacidade de agregação	60
3.2.3	Análise da estabilidade do fs frente à alteração do pH do meio na ausência e presença de micelas.....	61
3.2.4	Reações de fotobranqueamento.....	62
3.2.5	Análise da produção de oxigênio singlete, utilizando o teste do ácido úrico.....	63
3.2.6	Teste de toxicidade sobre a <i>Artêmia salina</i> (TAS).....	63
3.2.7	Teste de toxicidades sobre micro-organismos: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida albicans</i>	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1	DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO DE PORFIRINAS ..	66
4.2	ANÁLISE DA ESTABILIDADE DO FS FRENTE À ALTERAÇÃO DO PH DO MEIO NA AUSÊNCIA DE MICELAS.....	69

4.2.1	Análise da estabilidade do fs frente à alteração do ph do meio na presença de micelas de ctab	73
4.3	DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE AGREGAÇÃO	75
4.4	REAÇÕES DE FOTOBANQUEAMENTO	77
4.5	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE UTILIZANDO TESTE DO ÁCIDO ÚRICO	81
4.6	TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A <i>ARTÊMIA SALINA</i> (TAS)	84
4.7	TESTE DE TOXICIDADE SOBRE MICRO-ORGANISMOS: <i>ESCHERICHIA COLI</i> , <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> E <i>CANDIDA ALBICANS</i>	86
4.7.1	<i>Escherichia coli</i>	87
4.7.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	91
4.7.3	<i>Candida albicans</i>	95
5	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	100

1 INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento minimamente invasiva que depende de dois componentes: fotossensibilizador (FS) e luz. A TFD é atualmente utilizada no tratamento de diversas doenças como a degeneração macular da retina, cânceres (principalmente em câncer de pele do tipo não melanoma), doença arterial coronariana, leishmaniose, oncomicoses, queratose actínia, icterícia, verrugas virais, acne, fotorejuvenescimento, tratamentos odontológicos, tratamentos antibacterianos e outros.

A Terapia Fotodinâmica consiste na administração de elementos fotossensíveis ao organismo, que são carregados até locais com bastante irrigação sanguínea, como os tumores ou processos inflamatórios, onde se mantêm. O local doente é então irradiado por luz, a radiação é absorvida pelo fármaco, e catalisa a produção de radicais de oxigênio, e de uma forma reativa do oxigênio, conhecido como oxigênio singlete, que desencadeiam a morte celular do tecido atingido, por necrose ou apoptose.

O tratamento com TFD não foca somente o tumor ou região doente, mas também o campo no qual se desenvolveu. A terapia torna-se seletiva pela incidência de luz, sendo assim, destrói somente as células irradiadas preservando o tecido saudável, além disso, um dos principais benefícios do procedimento é que várias lesões podem ser tratadas ao mesmo tempo.

A intensidade e o poder de penetração da luz devem ser satisfatórios, assim como deve ser garantido que o FS atinja o tecido doente, atravessando barreiras como a circulação e membranas celulares, além do fato de garantia de ação em pH adequado e uma distribuição uniforme no tecido doente, pois caso se acumule na superfície do mesmo, o próprio fotossensibilizador impedirá a incidência de luz nas camadas mais profundas. Alguns pigmentos biológicos presentes normalmente em tecidos, como a hemoglobina e a melanina, também absorvem luz e podem interferir no processo fotodinâmico. Órgãos altamente pigmentados e vísceras maciças (fígado, baço, rins e medula óssea) impedem a penetração da luz para o tratamento, o que os torna resistentes à TFD (PELEGRINO et al., 2005).

Estudos mostram que derivados porfirínicos vêm apresentando condições para esse uso, uma vez que se acumulam seletivamente nas células cancerosas, são ativadas por luz na faixa de radiação visível, e também por apresentarem alto poder de reação e rendimento quântico de geração de oxigênio singlete. Algumas substâncias já apresentam comprovada ação como agentes fotossensibilizadores e possuem apresentações comerciais, outras estão em estágio de aprovação pelos órgãos competentes (SIMPLICIO, MAIONCHI, HIOKA, 2002; CALVAZARA-PINTON, VENTURINI, SALA, 2007a; PERUSSI, 2007).

Sendo assim, o desafio está em estudar novos compostos fotossensibilizadores, que possam ser ativados por luz de comprimentos de onda em que se permitam a penetração no tecido biológico, com maior seletividade e potencialmente eficazes para o tratamento de diversas doenças.

1.1 PORFIRINAS

A palavra “porfirina” tem suas origens na Grécia antiga. Naquela época, a palavra grega *porphura* era usada para descrever a cor púrpura. Isso imediatamente nos diz algo acerca de uma das características mais importantes das porfirinas: sua cor púrpura intensa. As mesmas dispõem em sua estrutura básica quatro anéis pirrólicos conectados por pontes de metino numa configuração cíclica, como mostrado na Figura 1, podendo apresentar cadeias laterais diferenciadas.

A estrutura de macrociclos das porfirinas foi proposta pela primeira vez por Kuster em 1912 e, posteriormente, por Hans Fischer, considerado pai da química moderna das porfirinas.

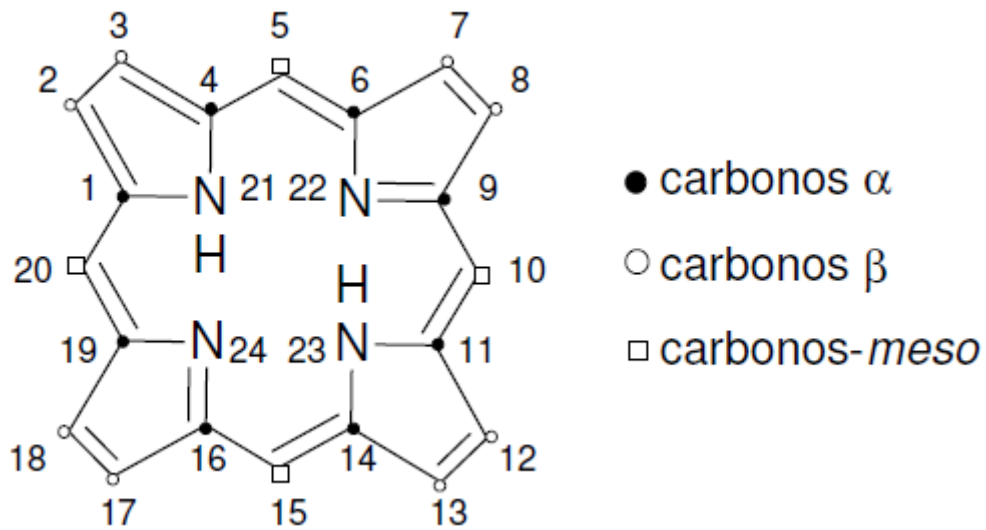


Figura 1- Estrutura no anel porfirínico com numeração de carbonos e nitrogênios.

As posições 5, 10, 15 e 20, (Figura 1) correspondem aos carbonos metínicos, sendo também denominadas de posições *meso* (meio entre dois anéis pirrólicos). As posições 2 e 3; 7 e 8; 12 e 13; 17 e 18 correspondem aos carbonos pirrólicos não diretamente ligados às posições *meso*, são denominadas de posições β , e as posições 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 correspondem aos carbonos pirrólicos diretamente ligados às posições *meso*, sendo denominados de carbonos α . O prefixo “tetrakis” é utilizado quando as porfirinas possuem quatro substituintes iguais nas posições *meso* do anel (5, 10, 15, e 20), e se estes substituintes forem aromáticos eles podem possuir heteroátomos como substituintes nas posições *orto*, *meta* e *para* (MILGROM, 1997).

Porfirinas, que apresentam átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios nas posições 21 e 23, conforme Figura 1, chamam-se bases livres. As porfirinas que apresentam a substituição destes hidrogênios por um metal coordenado pelos quatro nitrogênios são chamadas metaloporfirinas. A adição de prótons aos nitrogênios das posições 22 e 24 de porfirinas bases livres, da origem a forma diácida, e a remoção dos hidrogênios das posições 21 e 23 da origem a forma dibásica. Distorções do macrociclo podem ocorrer em reações de protonações ou desprotonações dos nitrogênios centrais combinados com volumosos substituintes. (MILGROM, 1997).

A porfirina contendo como substituintes o grupo fenila nas posições *meso* do anel (5, 10, 15 e 20), é um exemplo da classe das porfirinas denominadas por Dolphin como de 1ª geração (Figura 2a). Esta porfirina foi assim denominada por apresentar baixa atividade catalítica em reações de oxidação, já que os grupos fenílicos promovem fraca ativação eletrônica do anel e não parecem estabilizar a espécie catalítica ativa admitida para a catálise de oxidação envolvendo estes compostos, uma espécie de alta valência, que para porfirinas de ferro é denominada de ferril porfirina π -cátion (ALBERTI, 2009).

As porfirinas são denominadas de 2ª geração, quando os grupos fenílicos nas posições *meso* do anel porfirínico, possuem como substituintes halogênios ou outros grupos que causam efeito indutivo retirador eletrônico (Figura 2b). Estes grupos promovem uma melhor ativação do anel e evitam ataques eletrofílicos ao mesmo, além de estabilizar a espécie catalítica ativa. Porfirinas do tipo protoporfirinas ou porfirinas de 3ª geração (Figura 2c) correspondem as que apresentam grupamentos eletronegativos ou volumosos nas posições β -pirrólicas (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18). Em geral, espera-se que estas porfirinas apresentem grande atividade catalítica devido à possível distorção no anel promovida pela presença de grupos nestas posições. Além disso, ainda pode haver a formação e ativação da espécie catalítica ativa devido à eletronegatividade ou efeito retirador eletrônico causado por grupos substituintes, tais como halogênios ou outras espécies (ALBERTI, 2009).

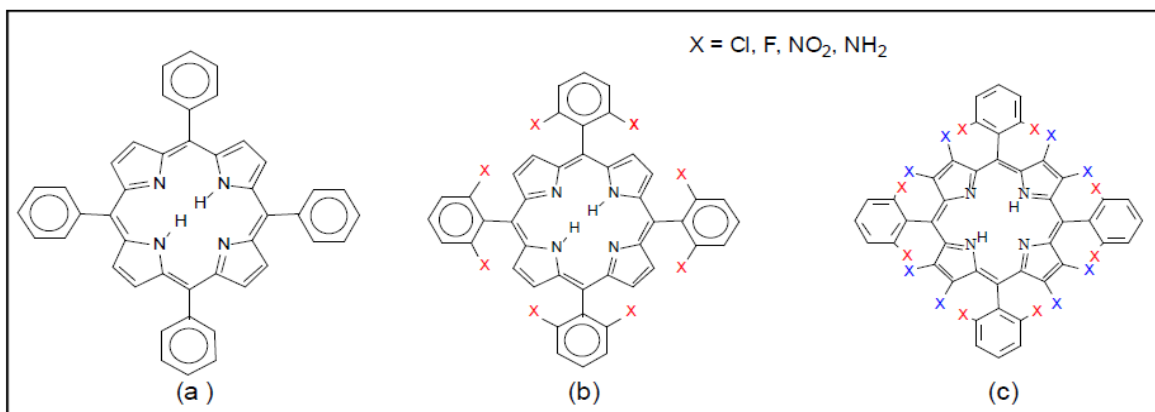


Figura 2-Representação de exemplos de estruturas das porfirinas de (a) 1ª geração (b) 2ª geração e (c) 3ª geração (ALBERTI, 2009).

As porfirinas oferecem vantagens experimentais sobre outros sistemas doadores, dentre elas o desenvolvimento de vários métodos de síntese, elevados valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e rendimentos quânticos de emissão fluorescente significativos (NERI et al., 2002).

As porfirinas não coordenadas aos metais (bases livres) possuem espectro com uma banda extremamente intensa, com coeficiente de absorvidade molar da ordem de $10^5 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ na região de 400 nm (banda *Soret*) (Figura 3 a), e mais quatro bandas no visível na região de 500 a 700 nm (bandas Q) (Figura 3 b). As cinco bandas têm origem em transições $\pi \rightarrow \pi^*$. Em meio fortemente ácido pode ocorrer a protonação das porfirinas, o que pode ocasionar significativa alteração das suas propriedades espectroscópicas; podem ainda ser carregadas positiva (catiônicas) ou negativamente (aniônicas) de acordo com as cargas presentes nos substituintes situados no anel porfirínico (GOUTERMANN, 1961).

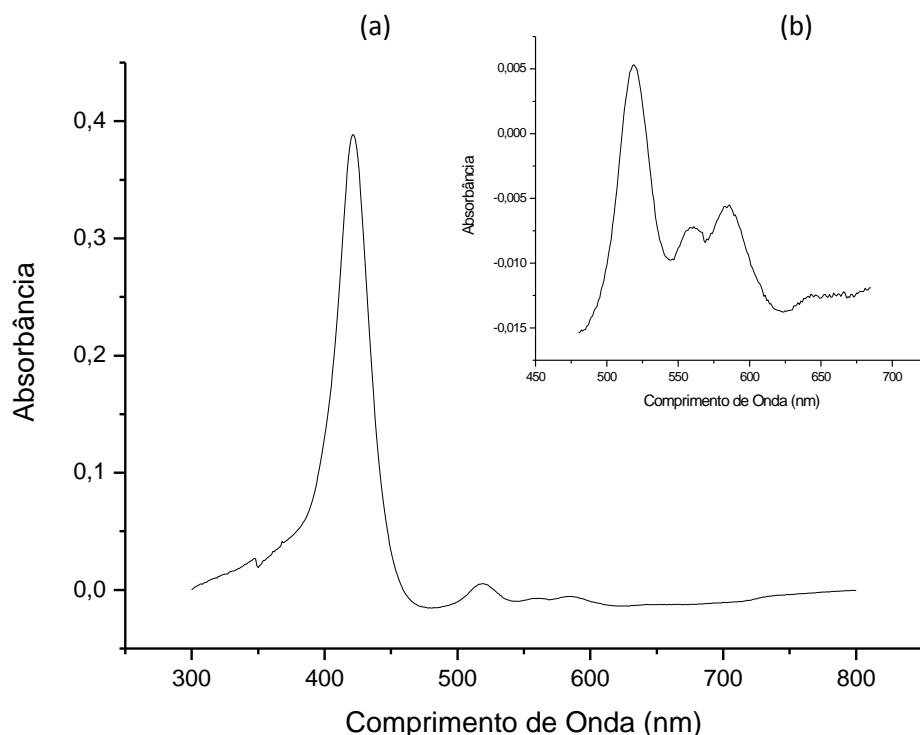


Figura 3- Espectro de absorção UV-Vis da porfirina [H₂(TMPyP)], (a) banda *Soret* (b) bandas Q.

As variações na conformação destes compostos causam alterações nas propriedades químicas e físicas, como: potencial de redução, atividade catalítica, solubilidade, e estabilidade dos estados excitados. As variações dos substitutos periféricos do anel da porfirina causam mudanças de menor importância na intensidade e no comprimento de onda dessas absorções (GOUTERMANN, 1961).

1.1.1 COEFICIENTE DE ABSORTIVIDADE MOLAR

As porfirinas apresentam uma forte deslocalização de elétrons π , a qual é responsável pelo caráter aromático do núcleo porfirínico, resultando numa pequena diferença de energia entre o HOMO (orbital preenchido de maior energia) e o LUMO (orbital vazio de menor energia) e, conseqüentemente, no aumento das intensidades das bandas de absorção do visível e do ultravioleta. As bandas do visível, em geral, são oriundas de transições do tipo π - π^* (RIBEIRO, JORGE, 2004). A simetria, plano e elevado grau de conjugação do núcleo tetrapirrólico são responsáveis por características de absorção essenciais para a distinção e estimativa dos vários tipos de porfirina.

O coeficiente de absortividade molar refere-se ao máximo de absorção de uma banda que aparece num espectro eletrônico. Mas, à temperatura ambiente não ocorrem apenas transições eletrônicas, diversas transições vibracionais contribuem para a formação da banda de absorção. Portanto, o coeficiente de absortividade molar é uma quantidade adiabática, resultado do Princípio de Franck – Condon, que diz: *“Uma transição eletrônica é tão rápida, comparada com o movimento nuclear, que o núcleo ainda terá aproximadamente a mesma posição e momento que tinha antes e imediatamente após a transição”* (SETUBAL, 2007).

A medida do quão fortemente uma espécie química absorve luz num dado comprimento de onda é dada pelo coeficiente de absortividade molar (ϵ). Ao se investigar a eficiência fotodinâmica de porfirinas, através de ensaios espectroscópicos, pode-se determinar o coeficiente de absortividade molar (ϵ), através da Lei de Lambert–Beer (Equação 1), trata-se de uma constante de

proporcionalidade que relaciona a absorvância observada (A), em um comprimento de onda específico (λ) com a concentração em quantidade de matéria da amostra $[c]$ e o comprimento (b) (em centímetros) do caminho do feixe de luz através da célula da amostra.

$$A = \epsilon .b.c \text{ (Equação 1)}$$

1.2 METALOPORFIRINAS

As porfirinas têm a propriedade de se combinarem prontamente com metais, através de ligações iônicas e coordenadas, com os quatro átomos de nitrogênio centrais, formando quelatos ou complexos muito estáveis, as metaloporfirinas (Figura 4). É sob essa forma que os pigmentos pirrólicos exercem as suas funções mais importantes nos organismos vivos.

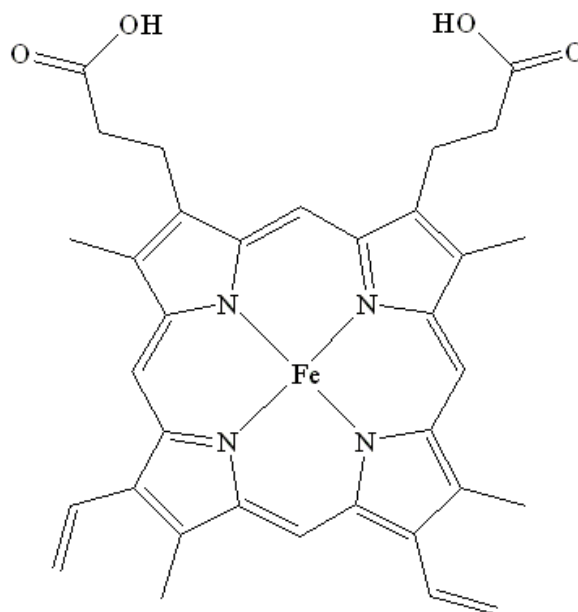


Figura 4- Estrutura do Complexo ferro porfirina - grupo heme presente na hemoglobina e na mioglobina

Durante o processo de metalação, ocorre uma mudança significativa na simetria do anel da porfirina. O tamanho do cátion influencia a conformação do anel e, conseqüentemente a estabilidade do complexo (GOUTERMANN, 1961). Este tipo de modificação do anel porfirínico, leva a alterações do comportamento da porfirina em níveis eletrônicos e estéricos, alterações essas que por sua vez, são fortemente dependentes do próprio metal introduzido. A porfirina metalada perde a planaridade e passa a ter uma conformação em forma de cela ou cesta, em onda ou em cúpula (PEREIRA, 2004).

A capacidade de uma porfirina distorcer-se mais ou menos, está estritamente relacionada ao arranjo das insaturações desse anel, podendo afetar profundamente a simetria do grupo metalado e, conseqüentemente, suas propriedades físico-químicas. Porém, é interessante salientar que esses estados distorcidos e planares podem se apresentar interconversíveis, ou seja, podem constituir um equilíbrio químico (MOREIRA, RIBELATTO, IMASATO, 2004).

Tratando-se de TFD, e do fato de que as porfirinas são os fotossensibilizadores, é importante comparar as porfirinas endógenas e os hemes sintéticos, onde frequentemente estes apresentam diferentes propriedades, como, por exemplo, a rápida rotação dos ligantes axiais em soluções homogêneas, quando, evidentemente, não são inseridos nos complexos impedimentos estéricos que impeçam essa movimentação. Quando a rotação é livre, os complexos se diferenciam das porfirinas em vários aspectos e, notadamente, quanto às propriedades magnéticas (MOREIRA, RIBELATTO, IMASATO, 2004).

Nas reações de catálise utilizando metaloporfirinas, há a formação do complexo metálico de alta valência (suposta espécie catalítica ativa), através da reação desses compostos com um doador de oxigênio, que é dependente da natureza do oxidante bem como da estrutura da metaloporfirina. Os compostos porfirínicos, principalmente de manganês (II) e (III) e ferro (III), são estudados como catalisadores em sistemas homogêneos (reagentes e catalisador contidos na mesma fase) e heterogêneos (catalisador e reagentes em fases distintas), para oxidação de substratos orgânicos, bem como em reações eletroquímicas (HALMA et al., 2008).

As metaloporfirinas apresentam um espectro com bandas diferenciadas, visto que a inserção de íons metálicos pouco eletronegativos resulta em deslocamentos batocrômicos da banda *Soret* (Figura 5 a). Com a metalação altera-se a simetria molecular, ocorrendo uma nova distribuição nos orbitais eletrônicos que origina outras transições eletrônicas, formando duas novas bandas Q.(Figura 5 b) (GOUTERMANN, 1961).

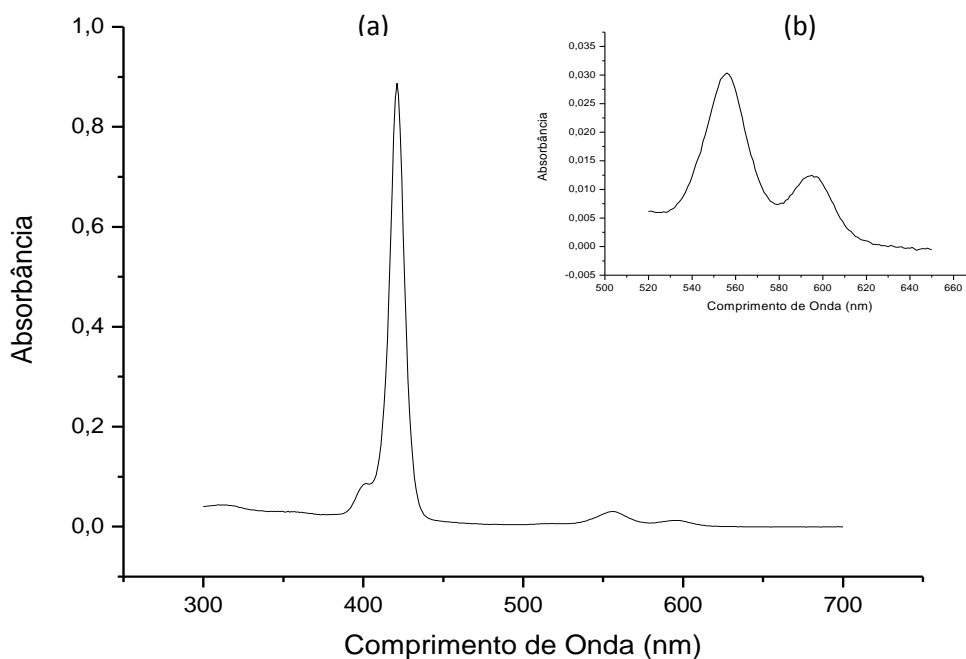


Figura 5- Espectro de absorção UV-Vis da porfirina [Zn(TPPS₄)], (a) banda de Soret (b) bandas Q.

As porfirinas têm um extenso sistema de elétrons π deslocalizados, que podem ser modificados através de diferentes substitutos periféricos, variando com o metal central ou por expansão do tamanho do macrociclo. O íon metálico aceita o par de elétrons dos átomos de N do anel pirrol, enquanto os elétrons dos íons metálicos são doados para a molécula de porfirina, formando ligações π deslocalizadas, que permitem facilitar o fluxo de elétrons dentro do sistema. Quando

o íon metálico se coordena com o N átomos, a simetria da molécula aumenta e o número das bandas Q, diminui (ZHENG et al., 2007).

As conformações do anel são fundamentais para a interpretação dos deslocamentos das bandas dos espectros de absorção na região do ultravioleta-visível de sistemas porfirínicos. Como as chamadas bandas B (*Soret*) e Q são transições $\pi \rightarrow \pi^*$, logo, transições do anel porfirínico são, portanto, sensíveis às mudanças conformacionais do anel. Está bem estabelecido que quanto mais distorcido o anel, maior o deslocamento para o vermelho (GOUTERMANN, 1961).

As porfirinas em geral possuem uma alta hidrofobicidade, sobretudo na forma desmetalada, aspecto interessante à TFD, pois a menor compatibilidade com a água implica, em geral, em maior afinidade por tecidos celulares. Por outro lado, essa propriedade faz com que haja grande tendência a esses compostos se autoagregarem em solução aquosa. Outra situação que pode levar à formação de agregados é o aumento da concentração do FS (MOREIRA, RIBELATTO, IMASATO, 2004).

1.3 AGREGAÇÃO

Um agregado pode ser considerado um aglomerado de partículas ou moléculas, que se juntam sem ligações químicas. Ele é caracterizado pela sua estrutura espacial (posição relativa de partículas dentro do agregado) e pelo número de agregação n (número médio de partículas dentro do agregado) .

A autoagregação de porfirinas gera espécies pequenas (dímeros e trímeros) (Figura 6) e agregados grandes (poliméricos). Esse estado afeta fortemente suas propriedades espectrais e energéticas, reduzindo o tempo de vida dos estados excitados, conseqüentemente, o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete e, portanto, comprometendo a eficácia em TFD (BORISSEVITCH, GANDINI, 1998).

Os mecanismos que regem o fenômeno de autoagregação de porfirinas ainda não estão totalmente estabelecidos. Entretanto, é conhecido que forças de natureza eletrostática, forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, interação π - π , e efeito hidrofóbico contribuem para a formação desses agregados. A natureza dos substituintes das porfirinas, temperatura, pH e presença de surfactantes também podem influenciar na formação de autoagregados (GANDINI, YUSHMANOV, TABAK, 2001).

Esta propriedade é conferida essencialmente pela sua nuvem de elétrons π deslocalizados ao longo do anel central de que resultam interações do tipo Van der Waals, ou seja, pela sua natureza, se traduzem em energias de ligação baixas mas que devido à pequena distância que colocam as moléculas resultam muitas vezes em acoplamentos eletrônicos π - π^* . A energia da interação depende da orientação relativa dos momentos dipolares de transição das moléculas do agregado (PEREIRA, 2004).

É de salientar que muitos dos agregados observados derivam da formação prévia de formas protonadas das porfirinas. De fato, a repulsão resultante da forte densidade eletrônica do anel central é fortemente atenuada se for colocada carga positiva no centro desse mesmo anel que, assim, favorece a aproximação entre os monômeros ao aumentar a atração eletrostática entre partes da molécula com diferentes cargas efetivas (PEREIRA, 2004).

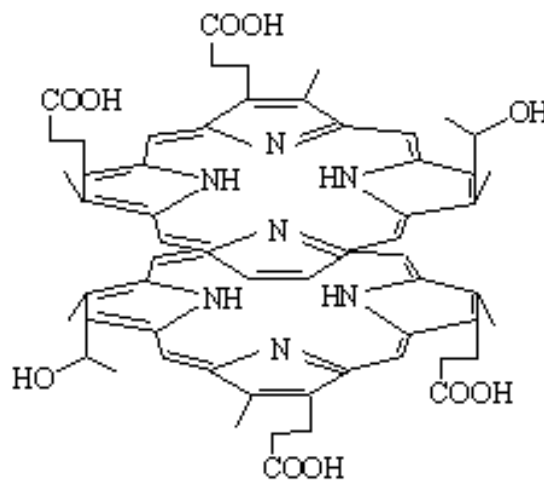


Figura 6- Interação entre as moléculas dos fotossensibilizadores para formar agregados.

Entre os agregados podemos distinguir duas importantes classes em arranjos completamente ordenados, sendo conhecidos como agregados J e H. O agregado J é um arranjo de moléculas dispostas lado a lado, enquanto no agregado H, as moléculas estão dispostas face a face. A estabilidade do agregado depende da área de contato entre os monômeros. Por isso, os agregados H, onde há uma maior área de contato, deveriam ser mais estáveis. Contudo, vários fatores podem atrapalhar a formação de agregados do tipo H, favorecendo a formação de agregados do tipo J (KELBAUSKAS et al., 2003).

As propriedades espectrais típicas intrínsecas dos agregados dos FS com respeito aos monômeros são: deslocamento e alargamento da banda *Soret* e da última banda Q para o vermelho, no caso de formação de agregado J e deslocamento em torno de 10 nm da banda *Soret* e das bandas Q para o azul, no caso de agregado H; tempo relativamente curto do estado singlete (S_1); baixo rendimento quântico de fluorescência e também uma insignificante geração de oxigênio singlete (KELBAUSKAS et al., 2003).

A formação de agregados provoca a diminuição do tempo de vida do fotossensibilizador no estado triplete em razão do aumento dos decaimentos não-radiativos por conversão interna, tornando mais difícil a transferência de energia do fotossensibilizador do estado triplete excitado para o 3O_2 , o que diminui a eficiência do fotossensibilizador. A agregação das porfirinas está associada à resistência do meio aquoso em abrir cavidades para as moléculas hidrofóbicas, resultando na justaposição das superfícies hidrofóbicas para minimizar a área exposta ao meio aquoso (RIBEIRO et al., 2007).

Uma das principais maneiras de aferir a presença de espécies agregadas numa amostra de porfirina passa pela análise espectroscópica das mesmas, através de testes de conformidade à Lei de Lambert-Beer. Desvios negativos a essa lei evidenciam uma provável presença de agregados. Os seus espectros de absorção também evidenciam diferenças, principalmente do comprimento de onda dos máximos de absorção, bem como, do próprio coeficiente de absorvidade molar (PEREIRA, 2004).

O efeito da agregação sobre as propriedades fotofísicas de um fármaco, particularmente a fluorescência, a energia dos estados excitados gerados, a capacidade de transferência de energia e elétrons, são de fundamental importância na avaliação do potencial fotodinâmico desses compostos nas reações foto-oxidativas (SOARES, 2006).

1.4 FLUORESCÊNCIA

As soluções de porfirinas e seus sais, quando irradiados com luz ultravioleta (~400 nm), evidenciam lindas fluorescências, vermelha ou alaranjada, detectáveis pelo olho até concentrações de 10^{-8} mol.L⁻¹ e, fotoeletricamente, abaixo de 10^{-10} mol.L⁻¹ (SILVA, 1970).

A intensidade da fluorescência para determinadas porfirinas depende de vários fatores: natureza do solvente, temperatura, pH do meio e concentração dos eletrólitos. A excitação de fluorescência das porfirinas e seus sais correspondem, no respectivo comprimento de onda, à situação das bandas de absorção, nas regiões visível e ultravioleta, dos pigmentos tetrapirrólicos (GOUTERMANN, 1961).

A fluorescência também é influenciada pela natureza do metal das metaloporfirinas, enquanto os complexos metálicos de Cd, Pb, Zn, Mg fluorescem quando dissolvidos em alguns solventes, os de Co, Ni, Fe e Cu são desprovidos dessa característica. Explica-se, assim, que a hemoglobina, a mioglobina e os seus derivados não possuam a fluorescência, que surge logo após a libertação do Fe do grupo prostético (SILVA, 1970).

1.5 MECANISMO DE AÇÃO DO FS NA TERAPIA FOTODINÂMICA

O mecanismo de ação da TFD está relacionado à capacidade do FS absorver radiação na faixa visível do espectro eletromagnético. A irradiação do

tecido doente provoca a excitação do FS a um estado eletrônico de maior energia, o qual pode retornar ao estado fundamental via processos radiativos (como fluorescência ou fosforescência) ou não-radiativos (como conversão interna, cruzamento intersistema ou relaxações vibracionais). É o cruzamento intersistema que, na presença de oxigênio, e do estado tripleto excitado gerado, acaba por induzir a produção de espécies reativas de oxigênio ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, H_2O_2) definidas como EROs, que atacam centros específicos dentro dos sistemas celulares, desencadeando a morte de tais tecidos por apoptose ou necrose celular (PELEGRINO et al., 2005).

A apoptose é a morte celular programada, é o suicídio celular por um mecanismo de autodestruição interno, consistindo em uma sequência geneticamente programada de eventos bioquímicos. Ela é, portanto, diferente da necrose, que é uma desintegração desorganizada de células danificadas, resultando em produtos que desencadeiam a resposta inflamatória (RANG, DALE, 2007).

A molécula de oxigênio no estado fundamental tem um papel importante nos processos fotoquímicos devido ao seu elevado potencial químico e a suas características reativas únicas (SETÚBAL, 2007). O diagrama de orbitais moleculares dessa molécula em seu estado fundamental $^3\Sigma_g^-$ está mostrado na Figura 7.

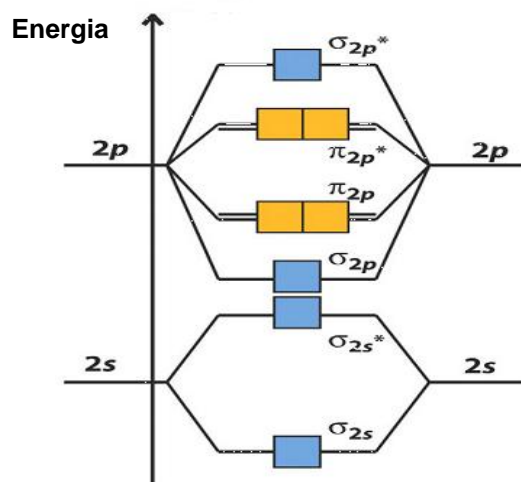
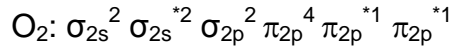


Figura 7- Diagrama de níveis de energia dos orbitais moleculares do O_2 no seu estado fundamental (ATKINS,JONES, 2006).

A configuração de estado fundamental do oxigênio é



Essa configuração dá origem a três estados $^3\Sigma_g^-$, $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$.

Oxigênio singlete é como são conhecidos os dois estados eletronicamente excitados imediatamente superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$). A configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados π^* (orbitais diferentes com a mesma energia) ocupados por dois elétrons, sendo que cada elétron ocupa um orbital π_x^* e π_y^* , numa configuração com os spins paralelos. Esta característica conferiria ao oxigênio uma alta reatividade. Entretanto, sua redução direta por reativos com dois elétrons com spins antiparalelos é proibida pela regra de conservação de spin, tornando-o “relativamente inerte”.

Os elétrons que ocupam os orbitais π^* tendem a possuir o mesmo spin de forma a produzir multiplicidade máxima e assim um estado de mais baixa energia. Essa é a razão pela qual o estado fundamental do oxigênio molecular é um triplete. A Tabela 1 apresenta as formas de ocupação nesses orbitais moleculares antiligantes, para o oxigênio no estado fundamental, assim como para os estados excitados imediatamente superiores (MACHADO, 2000).

Tabela 1- Ocupação dos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do O_2 (MACHADO, 2000).

Estado	Orbital molecular antiligante	Energia*, kJ.mol ⁻¹
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* [\uparrow] \pi_y^*$	0
$^1\Delta_x$	$[\uparrow\downarrow] \pi_x^* [] \pi_y^*$	92,4
$^1\Delta_y$	$[] \pi_x^* [\uparrow\downarrow] \pi_y^*$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* [\downarrow] \pi_y^*$	159,6

* Relativa ao estado fundamental

Desses estados, os que possuem energia intermediária (${}^1\Delta_x$ e ${}^1\Delta_y$; $92,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$) são os responsáveis pela reatividade química do oxigênio singlete. A simetria dessas moléculas, diferente do estado fundamental, lhes garante um considerável tempo de vida, quando comparado com a forma de mais alta energia (${}^1\Sigma_g$; $159,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$), que possui a mesma simetria do estado fundamental. Os estados ${}^1\Delta_x$ e ${}^1\Delta_y$ são degenerados e possuem uma distribuição eletrônica na qual os elétrons que ocupam um dos orbitais antiligantes π^* se encontram em um dos planos mutuamente perpendiculares.

Por serem degenerados, os estados ${}^1\Delta_x$ e ${}^1\Delta_y$ são, por conveniência, representados como sendo o estado ${}^1\Delta_g$. O orbital molecular vazio no estado ${}^1\Delta_g$ (Figura 8) garante ao oxigênio singlete essa espécie de caráter eletrofílico, o que favorece sua participação mais efetiva em reações químicas, principalmente no caso em que os substratos possuem sítios ricos em elétrons (MACHADO, 2000).

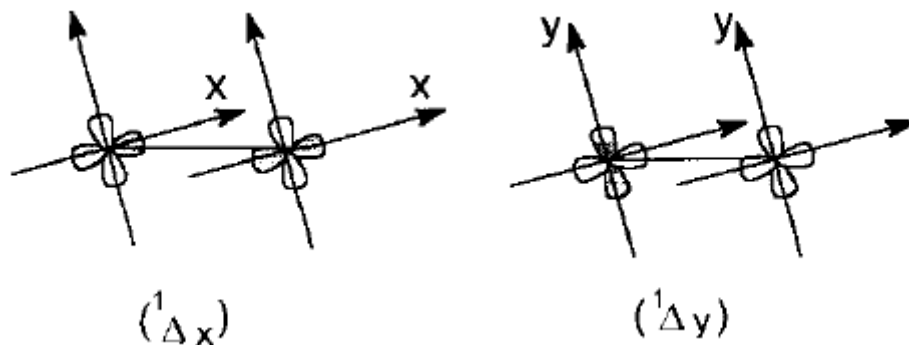


Figura 8- Representação dos orbitais moleculares π^*_x e π^*_y relativos às formas ${}^1\Delta_x$ e ${}^1\Delta_y$ do oxigênio singlete.

A transferência de energia é o processo que ocorre quando uma espécie química, molécula, átomo ou íon, (doador) que tenha sido levada a um estado excitado, transfere esta energia de excitação (ou parte dela) para outra espécie química (receptor) que, por sua vez, pode emitir esta energia radiativamente. A transferência de energia do doador para o receptor pode ocorrer de duas formas: i) transferência radiativa envolvendo a emissão de um fóton do doador e a

subsequente reabsorção pelo receptor e ii) transferência não-radiativa causada pela interação entre os centros doadores e receptores. Essas interações podem ocorrer por transferência de elétrons a curta distância (6 a 15 Å) ou por interação dipolo-dipolo a longa distância (20 a 60 Å) (NERI et al., 2002).

O cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica, pois consiste numa transição proibida por spin, em que o fotossensibilizador no estado eletrônico singlete excitado (S^1) sofre uma transição para o estado triplete excitado (T^1) (Figura 9). A substância fotossensível no estado triplete excitado apresenta um tempo de vida maior do que no estado singlete excitado, em razão da transição $T^1 \rightarrow S^0$ ser proibida por spin (SHARMAN, ALLEN, VANLIER, 2000). Dessa forma, o fotossensibilizador no estado T^1 pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, ou biomoléculas localizadas próximas à região irradiada, gerando espécies reativas que danificam o tecido irradiado (OLEINICK, MORRIS, BELICHENKO, 2002; VAN NOSTRUM, 2004).

O mecanismo de ação consiste no resultado da reação envolvida, que decorre primariamente da excitação eletrônica do FS pela luz, seguida por dois mecanismos principais de reação, a partir do seu estado excitado:

- Transferência de elétron (mecanismo Tipo I) entre o fotossensibilizador no estado triplete excitado e componentes do sistema, gerando íons-radicais que tendem a reagir com o oxigênio no estado fundamental, resultando em produtos oxidados.
- Transferência de energia (mecanismo Tipo II) do fotossensibilizador no estado triplete, com a geração de oxigênio singlete, um agente altamente citotóxico.

O processo envolvido em ambos os mecanismos está apresentado no Diagrama de Jablonski da Figura 9.

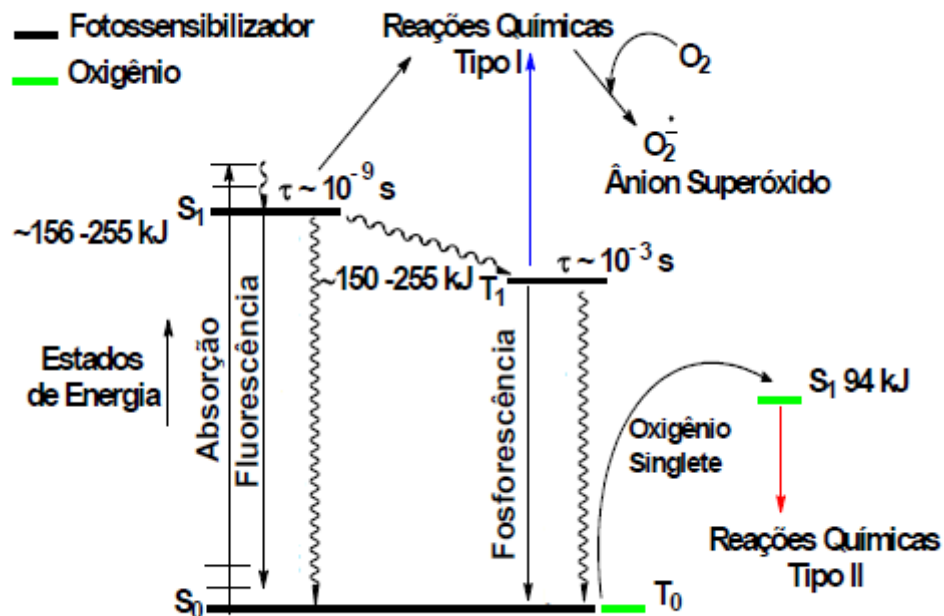
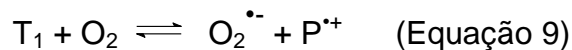
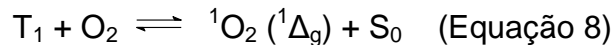
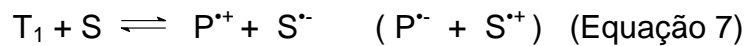
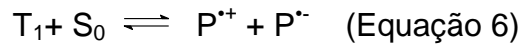
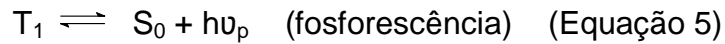
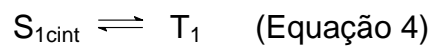
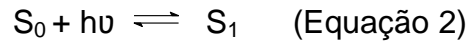


Figura 9- Mecanismos (Tipo I e II) de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela combinação de luz, fotossensibilizador (FS) e oxigênio no estado fundamental (3O_2).

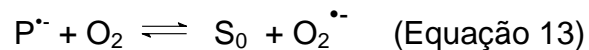
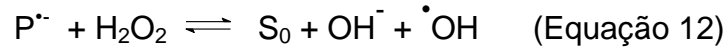
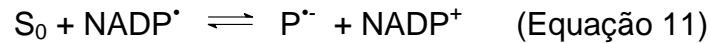
Nas oxidações biológicas, o FS no estado fundamental (S_0) absorve fótons de luz, é excitado passando para o estado singleto excitado (S_1) (Equação 2), do qual fluoresce retornando ao estado fundamental (Equação 3). O FS excitado inverte seu *spin* espontaneamente ao passar do estado singleto excitado, para o estado tripleto excitado (T_1), através do cruzamento intersistemas (Equação 4). Uma vez formada, a molécula no estado T_1 reage através de:

- Decaimento radiativo para o estado fundamental com emissão de fosforescência (Equação 5).
- Reação anaeróbica com outro sensibilizador no estado fundamental (Equação 6).
- Reação anaeróbica do Tipo I com substratos orgânicos (S) com formação de radicais aniônicos ou estados catiônicos do sensibilizador e do substrato (Equação 7).

- Reação do Tipo II, com oxigênio molecular para formar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) através de transferência de energia (Equação 8) ou ânion-radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ através de transferências de elétrons (Equação 9).



A produção conjunta de espécies reativas de oxigênio (oxigênio singlete e ânion-radical superóxido), com concomitante alteração na homeostase intracelular de íons como sódio, potássio e cálcio, deve, sem dúvida, induzir uma resposta mais agressiva do sistema biológico, facilitando o processo apoptótico (HOPPER, 2000). No entanto, o papel do $\text{O}_2^{\bullet-}$ no efeito fotodinâmico não é claro. O ânion-radical superóxido e o seu produto de dismutação, H_2O_2 podem participar do ciclo de Haber-Weiss e produzir radicais hidroxila (Equação 10), os quais contribuem para o estresse oxidativo. Porfirinas podem sofrer redução por NADP^{\bullet} durante oxidações enzimáticas catalisadas por NADPH e formar um ânion-radical de porfirina (Equação 11), que pode substituir o ânion-radical superóxido em reações Fenton (Equação 12) ou produzir $\text{O}_2^{\bullet-}$ através da redução de oxigênio molecular (Equação 13) (MUSSI, 2003).



Uma das principais fontes intracelulares de radicais de oxigênio é a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (DEVLIN, 2003). Ácidos nucleicos, enzimas, carboidratos, ácidos graxos polinsaturados, membranas celulares, mitocôndrias, lisossomos e núcleos são os maiores alvos biológicos dos radicais produzidos e do oxigênio singlete (MUSSI, 2003). No entanto, dos vinte aminoácidos naturais apenas cinco (cisteína, histidina, tirosina, triptofano e metionina) são altamente suscetíveis a oxidações via mecanismo de Tipo I e, por isso, o mecanismo via oxigênio singlete é frequentemente mais eficiente que processos radicalares. O oxigênio singlete possui ainda alta difusibilidade e maiores constantes de velocidade de reação com substratos corporais, facilitando sua ação (SETÚBAL, 2007; MENDES, 2008).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação de radicais de oxigênio, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das mesmas. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (FERREIRA, MATSUBARA, 1997).

1.6 ABSORÇÃO DE LUZ PELO FOTOSSENSIBILIZADOR

Lâmpadas convencionais, diodos emissores de luz (LED) e *lasers* têm sido usados como fonte de irradiação na TFD. As lâmpadas foram as primeiras fontes de iluminação em TFD. Elas produzem luz não-coerente com o componente térmico nocivo que pode ser eliminado por filtros. A vantagem das lâmpadas está relacionada com o baixo custo do sistema de iluminação, entretanto, a luz emitida apresenta vários comprimentos de onda. O *laser* foi escolhido como fonte de iluminação porque produz luz coerente e monocromática que permite o cálculo da dose de luz, importante para a definição dos protocolos experimentais da TFD. Além disso, os *lasers* podem ser utilizados com fibras ópticas que facilitam o direcionamento da luz para os locais de iluminação. A desvantagem dos *lasers* é o alto custo do equipamento (SILVA, SANTOS, RICCI Jr., 2009).

O LED é uma categoria de fonte de luz fria que emite radiação numa faixa mais ampla do espectro, porém, com um comprimento de onda predominante, apresenta emissão de luz não-coerente e com certo espalhamento. Por apresentar um custo mais baixo e uma tecnologia mais simples, comparado ao *laser*, tem-se apresentado como um facilitador para a adesão à TFD (CASTRO-E-SILVA et al., 2007; BONACIN et al., 2009).

Quanto às características fotofísicas favoráveis para TFD, um fator importante é o comprimento de onda da luz necessária à fotoexcitação do composto, que deve coincidir com o comprimento de absorção máxima do fotossensibilizador. Na região do visível (400 a 740 nm), quanto maior o comprimento de onda (λ) da luz incidente, maior é o seu grau de penetração no tecido (Figura 10). Radiação de comprimento de onda menor sofre maior espalhamento e a presença de cromóforos endógenos nos tecidos, que absorvem em comprimentos de onda menores, principalmente a hemoglobina, faz com que a penetração de luz seja menor. A água absorve a radiação sem excitação eletrônica, em comprimentos de onda maiores que 800 nm ocasionando apenas aquecimento do tecido e provocando alterações indesejadas, o que também limita o seu uso (BONACIN et al., 2009).

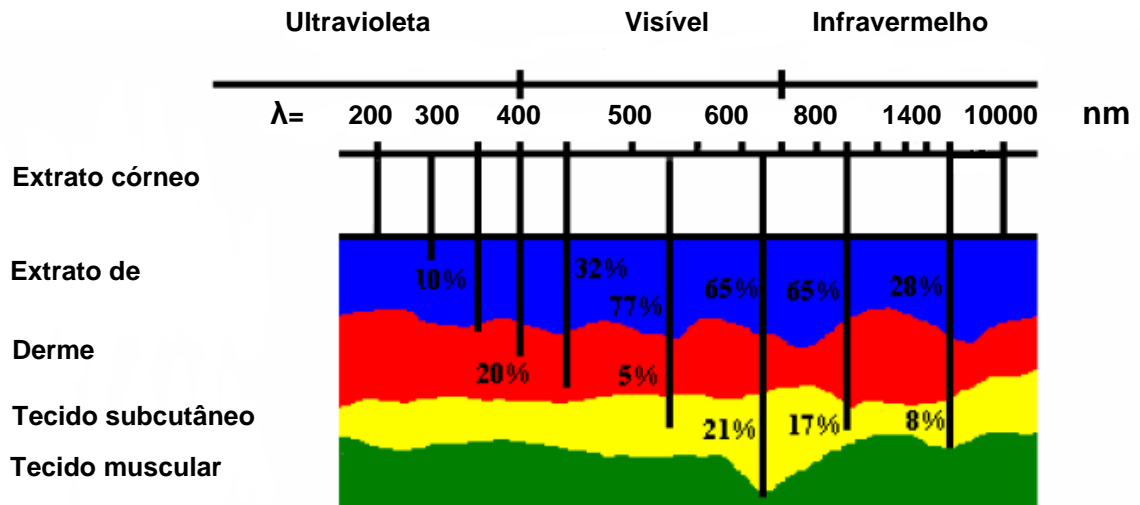


Figura 10- Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração de luz de diferentes comprimentos de onda.

A determinação do fármaco fotossensível depende de que, quando ativado por luz, cujo comprimento de onda é definido conforme espectros de absorção, se incorporem seletivamente junto às células cancerígenas ou danificadas, e que reajam, produzindo toxicidade fotodinâmica irreversível à mesma.

A substância cromófora pode também sofrer reações químicas induzidas pela luz, transformando-se em espécies com outras características fotofísicas e menos interessantes à TFD, sendo que o produto dessa reação pode não apresentar o mesmo efeito fotodinâmico, com conseqüente ineficácia no tratamento, devendo ser evitadas ao máximo. Essas reações são caracterizadas como reações de fotobranqueamento.

O oxigênio singlete, por ser uma espécie extremamente reativa, pode, por si, levar a degradação dos compostos fotossensibilizadores (os seus próprios precursores iniciais), caracterizando um tipo especial de fotobranqueamento (reação de oxidação com quebra do anel na posição meso). Em resumo, ao receber luz, o fármaco gera $^1\text{O}_2$ (Equação 14), que, por sua vez, pode reagir com as próprias moléculas do substrato que o produziu, resultando em modificações químicas (Equação 15) (RIBEIRO, JORGE, 2004).

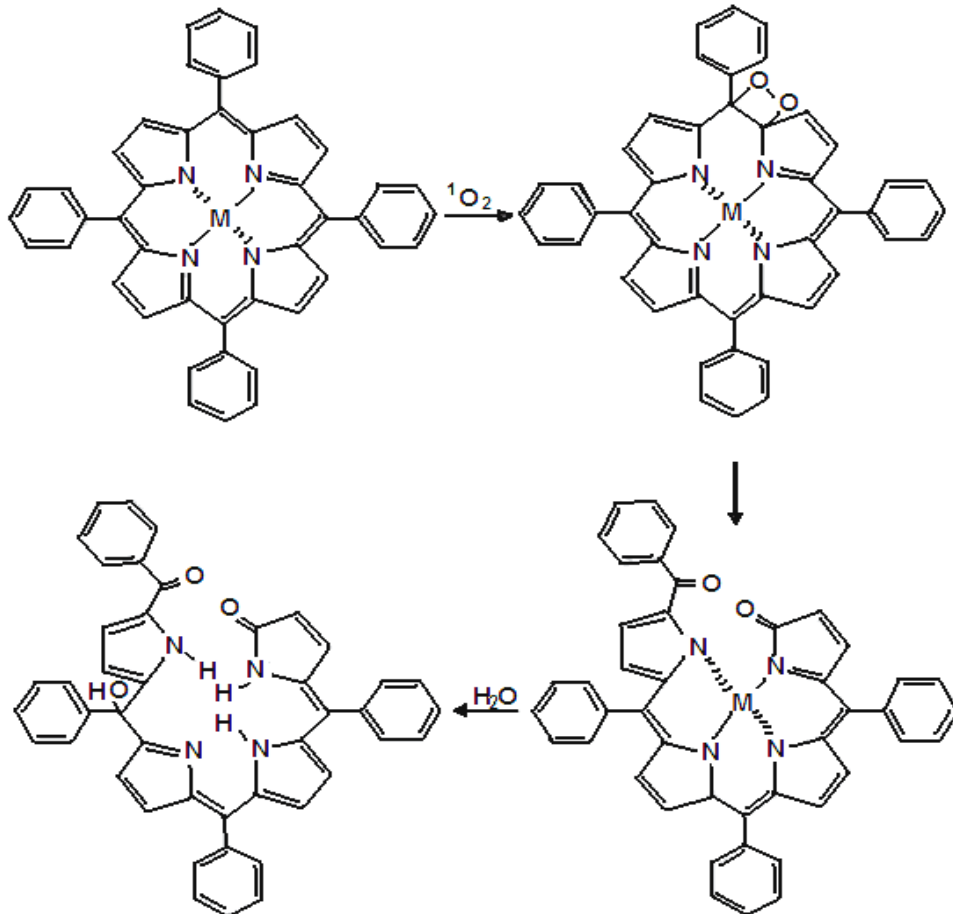
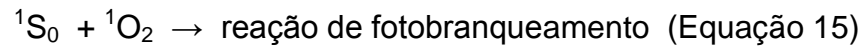
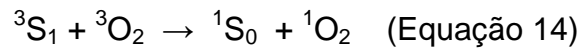


Figura 11- Fotobranqueamento de um composto porfirínico metalado, na presença de oxigênio singlete (RIBEIRO, JORGE, 2004).

Por comprometer a formação de espécies reativas capazes de matar o tecido alvo, o fotobranqueamento implica a necessidade de administração de doses elevadas do FS para compensar a perda ocasionada no processo de fotodegradação (Figura 11). Mas, se a velocidade desse fotobranqueamento for lenta, e não prejudicar o tratamento, ele passa a ser interessante, uma vez que serve para eliminar o FS após a terapia. Isso é importante, já que diminui o tempo

em que o paciente tem que ficar ao abrigo da luz solar para evitar fotossensibilidade da pele. Desse modo, a fotodegradação dos fotossensibilizadores está relacionada com a cinética de eliminação do FS do organismo (RONCHI et al., 2007).

1.7 FARMACOCINÉTICA

Em terapia fotodinâmica, deve-se ter em mente, contudo, que muitos outros fatores importantes devem ser considerados na atividade do FS *in vivo* como, por exemplo, estereoquímica, difusão, solubilidade, metabolismo, permeabilidade das membranas celulares e interações enzimáticas.

As porfirinas têm sido administradas ao organismo por via tópica (através da pele) ou por meio de uma injeção endovenosa, sendo aguardado o tempo para atingir seletivamente o tecido alvo com máximo acúmulo, dependendo da patologia a ser tratada. O uso da injeção endovenosa permite um efeito rápido e um grau de controle máximo sobre os níveis circulantes do fármaco na corrente sanguínea, pois, por não passar pelo trato gastrointestinal, não sofre a biotransformação de primeira passagem pelo fígado, chegando de maneira íntegra e rápida ao seu local de ação.

No caso do uso tópico, precisa-se levar em conta que a pele é um órgão que reveste e confere proteção ao organismo. Apresenta-se dividida em três camadas, demonstradas na Figura 12: a epiderme, que constitui a primeira barreira de proteção e que se divide em outras quatro camadas (córnea, granulosa, espinhosa e camada basal); a derme que é vascularizada, resistente e elástica, possuindo fibras, nervos, substâncias intercelulares e anexos da pele; e a hipoderme que se apresenta mais profunda e que contém o tecido adiposo subcutâneo (DEVLIN, 2003, SILVA, 2006).

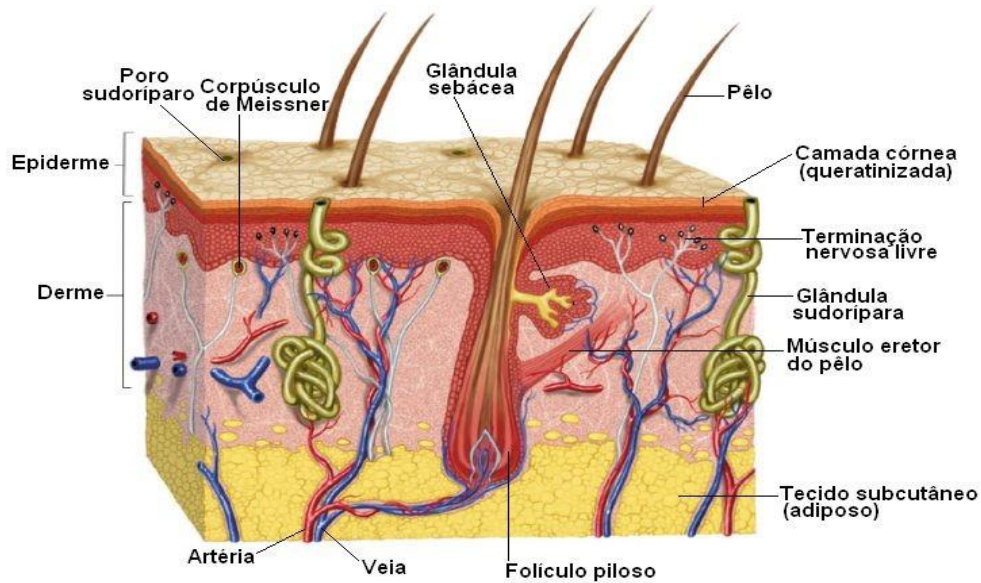


Figura 12- Representação esquemática das camadas da pele

Para ser ativa, a medicação tópica deve ser absorvida. O transporte percutâneo do ingrediente ativo é facilitado se o FS possuir baixa massa molecular e se for lipossolúvel. O fármaco pode, eventualmente, atingir a circulação sistêmica, após atravessar a epiderme e alcançar os vasos sanguíneos da derme (SILVA, 2006).

Para melhorar a absorção de FS pode-se fazer uso de alguns recursos como:

- Alterar a formulação da droga, acrescentando um intensificador de penetração ou por embalagem, em um sistema de entrega da droga, por exemplo, os lipossomas.
- Aplicação de uma corrente elétrica;
- Modulação da via biosintética pela adição de quelantes de ferro;
- Aumento da lipofilicidade por sua própria esterificação (PIERRE, LOPEZ, BENTLEY, 2009).

A dose do FS (mg do fármaco/ kg de massa corporal), janela de tempo para o tratamento (horas ou dias após a injeção do fotossensibilizador) e densidade de

energia irradiada (fluência) dependem do equilíbrio entre a concentração do FS, no tecido doente (mg / g de tecido) e, em tecidos normais, no momento da irradiação de luz. As escolhas desses parâmetros têm sido tipicamente baseadas na farmacocinética de fármacos e testes pré-clínicos feitos em animais (SIBATA et al., 2000). Fármacos altamente hidrofílicos requerem uma maior dose ao serem administrados, devido à fraca capacidade dessas moléculas para se difundirem através de membranas biológicas, como o extrato córneo. Por consequência, é provável que efeitos colaterais e reações adversas ocorram em proporções maiores.

É importante salientar que, quando administrado ao organismo seja por via tópica ou endovenosa, o fármaco, neste caso a porfirina, entrará em contato com diversos sistemas biológicos, incluindo além da pele e sangue, outros tecidos pelos quais será absorvido, sendo influenciado por diversos fatores físico-químicos, tais como pH, força iônica e, especialmente, a interação com sistemas microheterogêneos, o que podem modificar a interação eletrostática porfirínica e influenciar nas características de agregação.

A biodistribuição do FS é um fator ainda a ser estudado. A albumina tem uma concentração plasmática típica de 35 - 45 g.L⁻¹ e sua principal função fisiológica é manter a pressão osmótica. Essa proteína é caracterizada por sua habilidade de se ligar a uma ampla variedade de moléculas, sendo que um dos fatores mais importantes que afetam a distribuição e a concentração ativa de muitas drogas no organismo é a afinidade pela albumina, podendo contribuir para solubilizar e transportar substâncias que, de outra forma, poderiam agregar-se e ser pobremente distribuídas. Drogas com uma grande afinidade por essa proteína requerem grandes doses para atingir uma concentração efetiva *in vivo*, sendo lentamente distribuídas aos sítios de ação e podendo não ser eficientemente eliminadas.

Os derivados porfirínicos hidrofóbicos exibem alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais são encontradas em altas concentrações em tecidos neoplásicos, em comparação com os tecidos saudáveis. Sendo assim, uma das hipóteses para explicar o acúmulo preferencial dessas substâncias no tecido doente, sugere-se que esses compostos porfirínicos atinjam os tecidos doentes através da corrente sanguínea, junto às lipoproteínas, acumulando-se nessas células e possibilitando uma ação localizada da TFD (SIMPLÍCIO, MAIONCHI, HIOKA, 2002).

A absorção e distribuição do FS devem apresentar maior disseminação por tecidos mais vascularizados, o que é uma característica de processos inflamatórios e tumorais. A distribuição do fármaco, ou seja, a sua passagem do plasma para o interstício depende do fluxo sanguíneo, da permeabilidade capilar, do grau de ligação às proteínas plasmáticas e tissulares e de sua hidrofobicidade.

Órgãos como fígado e rim também apresentam alta taxa de receptores para LDL, portanto, um ponto crucial na TFD é o balanço entre a distribuição da droga e o tempo de espera para o início da irradiação, de tal modo que a concentração da droga e o grau de profundidade no tecido doente sejam adequados. O ajuste do tempo de circulação no fluido sanguíneo pode ser realizado através de componentes da formulação, aumentando a eficiência terapêutica através de uma biodistribuição da droga em favor de tecidos patogênicos e evitando a toxicidade em tecidos sadios (SIMPLÍCIO, MAIONCHI, HIOKA, 2002).

Os compostos porfirínicos podem apresentar hidrofobicidade, principalmente na forma desmetalada. Os estados hidrofóbicos e hidrofílicos do fotossensibilizador interferem diretamente na agregação e, conseqüentemente, na precipitação do mesmo. O fármaco, ao chegar ao seu sítio de ação, precisa atravessar a membrana celular (Figura 13), que é lipoproteica e apresenta-se desfavorável à passagem de agentes hidrossolúveis, portanto, é preciso fazer uso de um agente surfactante para amenizar essas características e facilitar o transporte através da mesma.

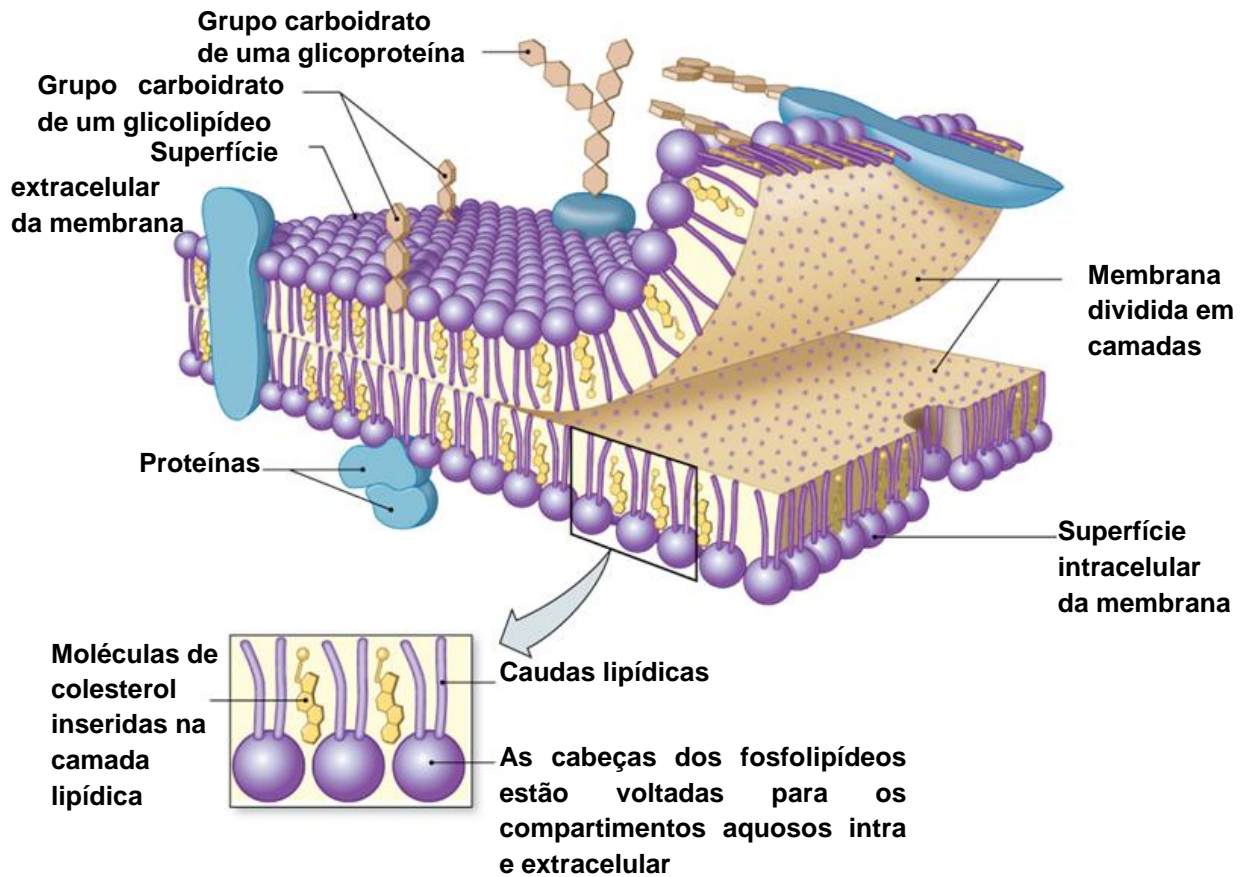


Figura 13- Modelo proposto por Nicholson para membrana biológica (SILVERTHORN, 2010).

Um fármaco atravessa a membrana celular mais facilmente se ele não for ionizável. A concentração efetiva da forma permeável de cada fármaco através da membrana celular é determinada pelas concentrações relativas entre as formas ionizadas e não-ionizadas. Essa relação é determinada pelo pH e representada pelo pK_a no meio.

Outro fator que pode contribuir para a maior retenção das porfirinas no tecido doente são os baixos valores de pH do fluido intersticial nesse tecido. O pH de tecidos inflamados e tumorais é frequentemente menor que o de tecidos normais, devido à grande produção de ácido láctico ocasionada pela microvasculatura alterada. Assim, enquanto o pH em tecidos normais está entre 7,2 e 7,4, o pH de tecidos doentes varia entre 6,0 e 7,0. Com o aumento da acidez, a ionização de espécies de porfirina com valores de pK_a levemente ácidos é afetada, elas se tornam

mais hidrossolúveis, podendo assim, ser retidas de forma seletiva (LEHNINGER, NELSON, COX, 2005).

Estudos mostraram que a ação fotodinâmica induz mudanças diretas na membrana celular que levam a um desequilíbrio na homeostase iônica celular (íons sódio, potássio e cálcio), o que certamente acarreta dano ao transporte de proteínas da membrana plasmática e, em última análise, a um estresse osmótico irreversível (PELEGRINO et al., 2005).

Estudos realizados após três horas de exposição à luz demonstraram redução na atividade da enzima citocromo c oxidase, o que indica que, após a absorção do FS pela membrana celular, ocorra a absorção mitocondrial. Ao se medir a integridade da membrana, concluiu-se que as suas alterações não foram o suficiente para interferir no gradiente de concentração e que as enzimas mitocondriais envolvidas nos processos de fosforilação oxidativa contribuem para a citotoxicidade da TFD. É muito provável que porfirinas hidrofóbicas fiquem presas a membrana interna da mitocôndria, enquanto as porfirinas hidrofílicas apresentem-se dispersas junto à sua matriz (Figura 14) (HILF, 2007).

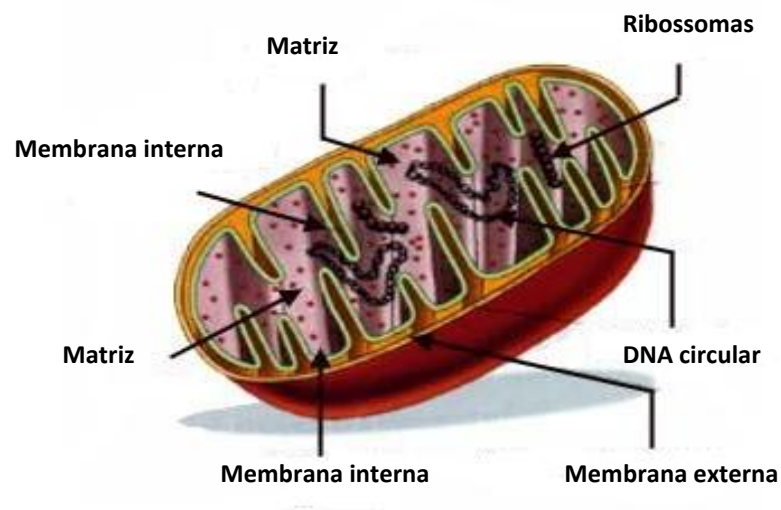


Figura 14- Estrutura de uma mitocôndria.

Tanto o citocromo c como a proteína Smac Diablo (proteínas pró-apoptóticas) são liberados no citosol após um estresse oxidativo. Tais proteínas ativam um grupo de outras proteínas conhecidas como caspases que, por sua vez, induzem a fragmentação do DNA da célula cancerígena, provocando sua morte. Além disso, as espécies reativas de oxigênio, oriundas da TFD, podem inativar proteínas como a Bcl-2, que, em geral, protegem as células cancerígenas da apoptose (RIBEIRO et al., 2005).

No tratamento com TFD, a formação de EROs mitocondrial após a iluminação causa permeabilização da membrana, despolarização, inchaço, e liberação de citocromo c, fator de indução de apoptose (RIBEIRO, JORGE, SILVA, 2004). Portanto, a lesão primária pode ser apenas o primeiro passo em uma cascata de reações causando danos a várias estruturas celulares e, finalmente, morte celular. Por último, a liberação de histamina, prostaglandina D2, o fator de ativação de plaquetas pelos mastócitos e a liberação do fator de necrose tumoral por macrófagos podem contribuir significativamente para os efeitos da TFD (CALZAVARA-PINTON, VENTURINI, SALA, 2007a).

Apenas a região fotolisada fica necrosada, porém o efeito é propagado, acreditando-se que a morte do tecido decorre, principalmente, pelo comprometimento do sistema vascular (Figura 15), ou seja, do sistema de irrigação tumoral (que transporta os nutrientes necessários ao crescimento rápido do tumor) (SIMPLÍCIO, MAIONCHI, HIOKA, 2002).

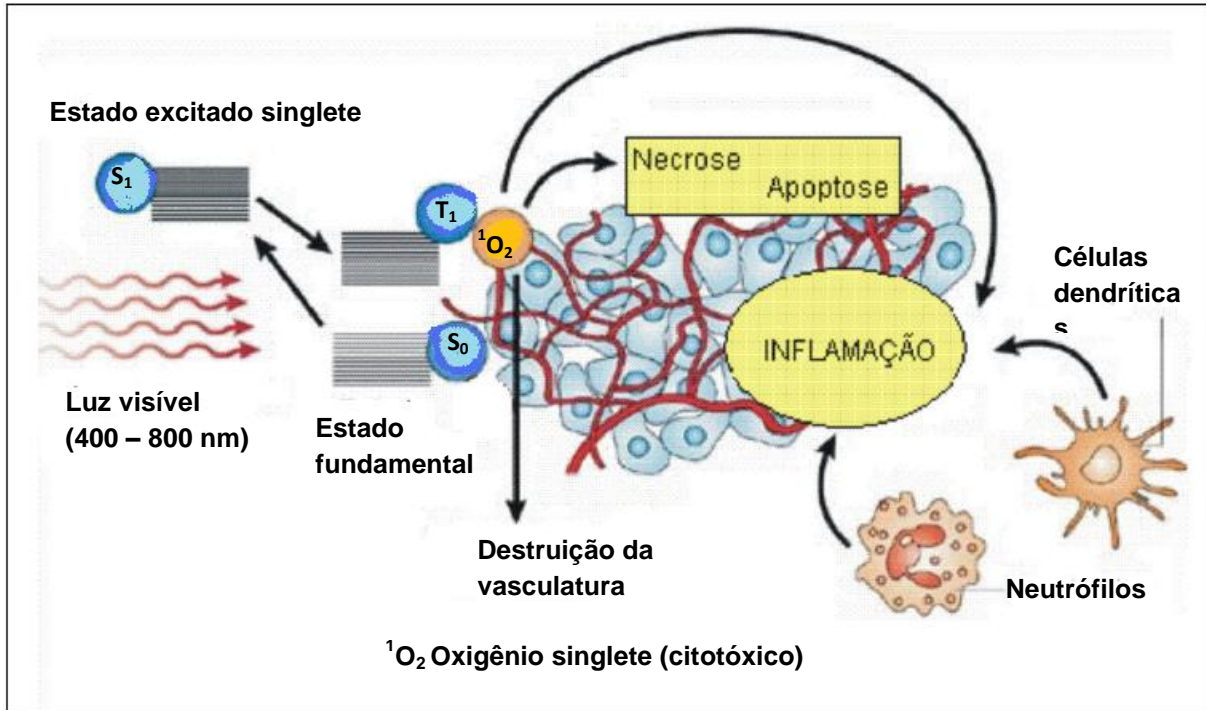


Figura 15- Mecanismo de ação da TFD na eliminação de células cancerosas (SILVA, SANTOS, RICCI JR, 2009, adaptado).

O FS administrado ao organismo percorre todo o corpo, e acaba sendo absorvido tanto por células saudáveis, quanto pelos tecidos modificados. As células saudáveis, no entanto, eliminam o FS num período de 24 a 36 horas, enquanto as células doentes, por apresentarem um metabolismo diferenciado, retêm a droga por um período mais prolongado, cerca de 72 horas (KELBAUSKAS et al., 2003). Esse fato propicia a racionalização do processo de iluminação e dos efeitos desejáveis da TFD. Também, o emprego de lipoproteínas e, mais recentemente, de anticorpos específicos, associados ao FS, tem resultado em uma alta seletividade do tratamento, com preservação cada vez maior das células saudáveis (MACHADO, 2000).

Após ser irradiada por luz, a regressão da doença tratada através de TFD envolve, geralmente, as seguintes etapas: necrose massiva do tecido doente, formação de uma ferida na região irradiada após a fototerapia, desaparecimento da ferida e completa regressão da doença a uma forma não-palpável, seguida de cicatrização da pele e crescimento dos pêlos. O tempo relativo a cada um desses

resultados depende do FS administrado, das características do tratamento e da doença (SILVA, SANTOS, RICCI JR., 2009).

1.8 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESPECTROSCÓPICAS DE UM FS

Na TFD, para que um FS venha a apresentar suas funções no organismo com eficácia, além dos testes farmacocinéticos, é importante considerar as características físico-químicas e espectroscópicas do composto. A seguir, serão apresentadas algumas dessas características e a influência das mesmas na terapia fotodinâmica.

1.8.1 TOXICIDADE

Uma das características necessárias no tratamento com TFD é que os fármacos possuam toxicidade baixa no escuro e tendência elevada a acumular-se no tecido doente, evitando assim, que a vizinhança acidentalmente iluminada seja danificada (SIMPLÍCIO, MAIONCHI, HIOKA, 2002).

1.8.2 HIDROFILICIDADE E HIDROFOBICIDADE

Os FS geralmente apresentam-se na forma sólida, no entanto, é necessário um meio líquido para a administração parenteral ou uma emulsão para aplicação tópica. Nesse caso, é preciso cuidado na escolha do solvente, pois ao serem introduzidas em um meio incompatível com sua polaridade, as moléculas de FS tendem a sofrer agregação (MUSSI, 2003).

Os principais determinantes para a eficácia fotodinâmica encontram-se nas propriedades de solubilidade do sensibilizador em relação à natureza hidrofílica ou

hidrofóbica das biomoléculas-alvo, com sensibilizadores hidrofóbicos sendo mais fototóxicos às estruturas lipofílicas, como as membranas de eritrócitos, membrana mitocondrial e enzimas. Porfirinas hidrofóbicas apresentam maior aproximação com as moléculas-alvo da membrana plasmática e encontram-se, portanto, em melhor posição para executar reações fotodinâmicas de forma eficaz, produzindo danos de membrana e eventualmente morte celular.

O caráter hidrofílico/hidrofóbico de um FS influi diretamente na distribuição do FS e sua captação celular em processos metabólicos, o que difere em comparação com a forma monomérica e agregada. Ao mesmo tempo, a agregação pode levar à precipitação do fármaco com perdas de materiais, ou mesmo obstrução de artérias no corpo humano (BATISTA, CARVALHO, MAGALHÃES, 2007).

A agregação reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete; desse modo, é necessário que o princípio fotoativo apresente-se solubilizado e na forma monomérica. A agregação pode ser evitada através de baixas concentrações de solventes orgânicos, uso de surfactantes, proteínas do sangue ou a incorporação do fotossensibilizador às micelas (ANDRADE, COSTA, 2002).

As micelas constituem agregados coloidais estáveis termodinamicamente e, espontaneamente, formadas por anfífilos, que são substâncias que contêm tanto uma parte aquossolúvel (hidrofílica) como uma parte aquoinsolúvel (hidrofóbica, geralmente lipossolúvel); através de repulsões eletrostáticas. O estudo das propriedades espectroscópicas das porfirinas nas micelas, e, em especial, do grau de associação e localização pode dar subsídios importantes para a compreensão da interação das porfirinas com a membrana biológica e da relação dessa interação com a ação farmacológica. O uso de micelas não se restringe à solubilização de princípios bioativos em meio aquoso. Uma vez injetadas na corrente sanguínea, carregam os fármacos até as células-alvo em um recipiente biocompatível, sendo liberados junto a tumores sem os efeitos tóxicos que causam a morte de células saudáveis.

O mecanismo de formação de micelas é um processo espontâneo e altamente cooperativo que ocorre como resposta às interações desfavoráveis entre

o tensoativo e a água. Em concentrações baixas em água, as moléculas de anfifílicas mantêm-se na forma de monômeros, usualmente estabelecendo-se na interface ar-água (superfície), Figura 16 (A). Todavia, ao se elevar a concentração, atingindo uma pequena faixa limite, conhecida como concentração micelar crítica (c.m.c.), as micelas formam-se espontaneamente, Figura 16 (B) (PREVIDELLO et al., 2006).

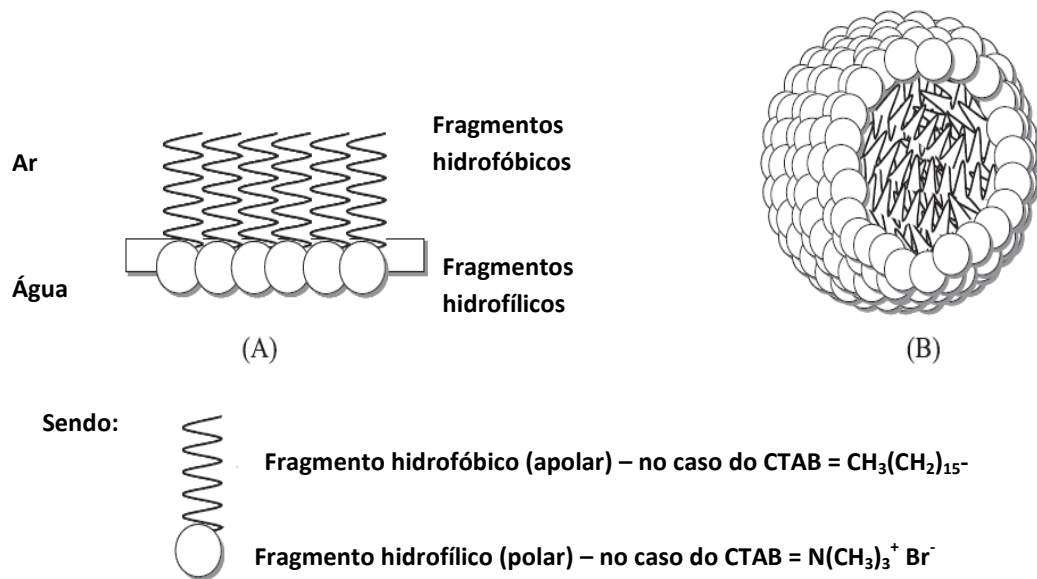


Figura 16- Representação do arranjo de moléculas anfifílicas em água: a) na interface água-ar; b) no arranjo micelar (PREVIDELLO et al., 2006, adaptado).

A inclusão de íons ou moléculas neutras em micelas pode provocar alterações das propriedades ácido-base das espécies inclusas. Essas modificações são causadas pela estabilização preferencial de espécies ácidas ou básicas com deslocamentos no equilíbrio, decorrentes da inclusão e do ambiente químico micro-local (pH interfacial, na superfície da micela) (PREVIDELLO et al., 2006). Estes fatores podem ser observados através de análises espectroscópicas da porfirina, com a variação do pH, em presença e ausência de agentes surfactantes.

1.8.3 ALTO RENDIMENTO QUÂNTICO DE OXIGÊNIO SINGLETE

A eficácia do processo fotodinâmico depende de uma série de fatores intrínsecos do fotossensibilizador e das condições em que este se encontra no organismo. Esse mecanismo depende: (1) do *rendimento quântico* de formação do estado tripleto do FS (Φ_T) (2) do *tempo de vida* do estado tripleto do FS (τ_{T1}) e (3) do *tempo de vida* de 1O_2 (τ_{O_2}). Ocorre que, para certos tipos de fotossensibilizadores, apesar de possuírem Φ_T muito elevado, a probabilidade de essas moléculas retornarem ao estado fundamental sem que ocorra a reação ou transferência de energia para a molécula de O_2 também é elevada. Esse fato pode reduzir o τ_{T1} e, conseqüentemente, a produção de 1O_2 suficiente para induzir a morte da célula doente. Além disso, o 1O_2 também tem tempo de vida limitado, podendo retornar para seu estado fundamental por reações monomoleculares (radiativas e não radiativas) antes de encontrar seu alvo e dar início às reações em cadeia (BORISSEVITCH, SCHABERLE, KUZMIN, 2003).

O ácido úrico (AU) é conhecido por reagir com o 1O_2 e tem provado ser um bom oxidante para reações com ácido hipocloroso, oxigênio singlete (Figura 17) e radicais hidroxilas. O emprego do AU tem sido utilizado em diversos trabalhos (MAESTRIN et al., 2004; PELLOSI et al., 2008; MENDES, 2008), para avaliar a atividade fotodinâmica de agentes fotossensibilizadores empregados em TFD. Nesse método, é calculado o coeficiente de atividade fotodinâmica, levando-se em conta o decréscimo da absorvância da banda centrada em 293 nm do espectro de absorção óptica do AU na presença de um FS ativado pela luz (SILVA, 2007).

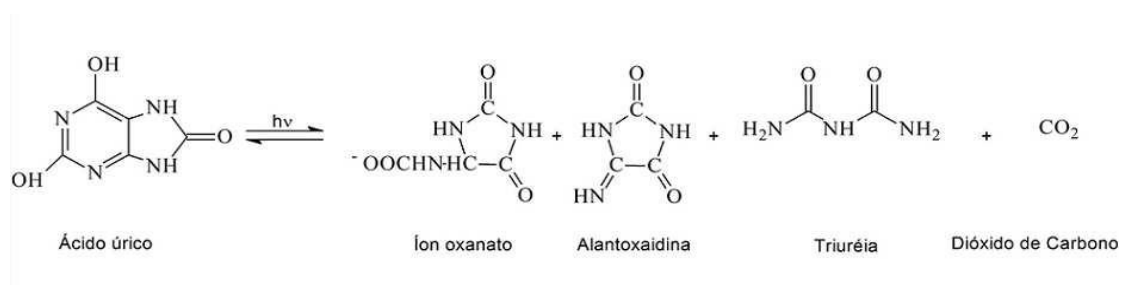


Figura 17- Foto-oxidação do ácido úrico via 1O_2 (MAESTRIN et al., 2004).

A escala de atividade fotodinâmica (AF) obtida para as porfirinas, pode ser matematicamente determinada pela expressão de Fischer modificada, conforme a equação 16 (MAESTRIN et al., 2004)

$$AF = \Delta A_{UA} 10^5 / W t A_{PS\lambda irr} \quad (\text{Equação 16})$$

Sendo:

AF = atividade fotodinâmica;

ΔA_{UA} = variação da absorbância de ácido úrico (293 nm) em uma solução de FS, após irradiação;

W = potência da luz (mW);

t = tempo (s) de irradiação

$A_{PS\lambda irr}$ = absorbância do FS em solução de AU após irradiação.

No entanto, como o uso do *laser* é dificultado pelo seu alto custo, e vários pesquisadores têm testado o uso de sistemas de LED em TFD, o grupo de pesquisa (Físico-Química de Sistemas Micelares e Soluções) liderado pelo professor Dr. Noboru Hioka (UEM - 2008), vem propondo uma equação matemática que forneça a AF com fontes de luz policromáticas (LED). Para fontes policromáticas (LED) propõe-se modificar o termo $W \times A_{PS\lambda irr}$ da equação 16. Esse termo refletiria a quantidade de fótons absorvidos pelo FS (*i.é.* a energia luminosa absorvida), que é correta para luz monocromática. No caso de LED, substituiu-se o termo por P_{abs} (potência absorvida). Para essa, deve ser considerado que a potência de luz do LED é relativa a toda faixa espectral emissiva (PELLOSI et al., 2008). Como esse estudo ainda está em andamento, optou-se em utilizar a equação 16 neste trabalho, para fins de comparação com outros estudos que fizeram uso da mesma equação.

1.9 ESTUDOS *IN VITRO*

Para que se estabeleça a eficiência de um fármaco fotossensibilizador a ser utilizado em terapia fotodinâmica, são necessários ensaios de toxicidade que comprovem o processo de fotólise. Para avaliar tal processo, alguns seres vivos, como o microcrustáceo *Artêmia salina*, ou micro-organismos como bactérias e fungos, têm sido utilizados em diversos estudos para demonstrar o efeito fotodinâmico (NEVRELOVA et al., 2005; XIAOPENG et al., 2009; DOVIGO et al., 2010).

1.9.1 *Artêmia salina*

Artêmia salina é um crustáceo da classe Anostracea, que vive em águas salinas e salobras de todo o mundo, são zooplânctons e são usados como alimento vivo em aquários.

O ciclo de vida da *Artêmia salina* começa com cistos hibernantes encubados ("ovos"), que são embriões enclausurados metabolicamente inativos. Os cistos podem permanecer adormecidos por muitos anos, desde que sejam mantidos secos e livres de oxigênio. Quando os cistos são devolvidos à água salgada, eles se reidratam e reassumem o desenvolvimento. Depois de 15 ou 20 horas, a uma temperatura de 25 °C, os cistos se rompem e o embrião abandona a carapaça. Por algumas horas, o embrião fica preso abaixo da casca do cisto ainda envolvido em uma membrana. Esse estágio é chamado de náuplio, "guarda-chuva". Durante esse estágio, o náuplio completa seu desenvolvimento e emerge como um livre nadador. Em seu primeiro estágio larval, o náuplio é de cor laranja castanho devido à sua reserva de alimento (Figura 18). A *Artêmia salina* recém eclodida não se alimenta, porque sua boca e ânus não estão totalmente desenvolvidos. Aproximadamente 12 horas após a eclosão, eles assumem o segundo estágio larval e começam a se alimentar de partículas de microalgas, bactérias e detritos. Os náuplios irão crescer e passar por 15 mutações antes de atingir a fase adulta em no mínimo oito dias. A

Artêmia salina adulta mede em média 8 mm de comprimento mas pode atingir 20 mm em condições ideais, é 20 vezes maior e possui 500 vezes mais biomassa do que quando é um náuplio (ARAÚJO, 2002).

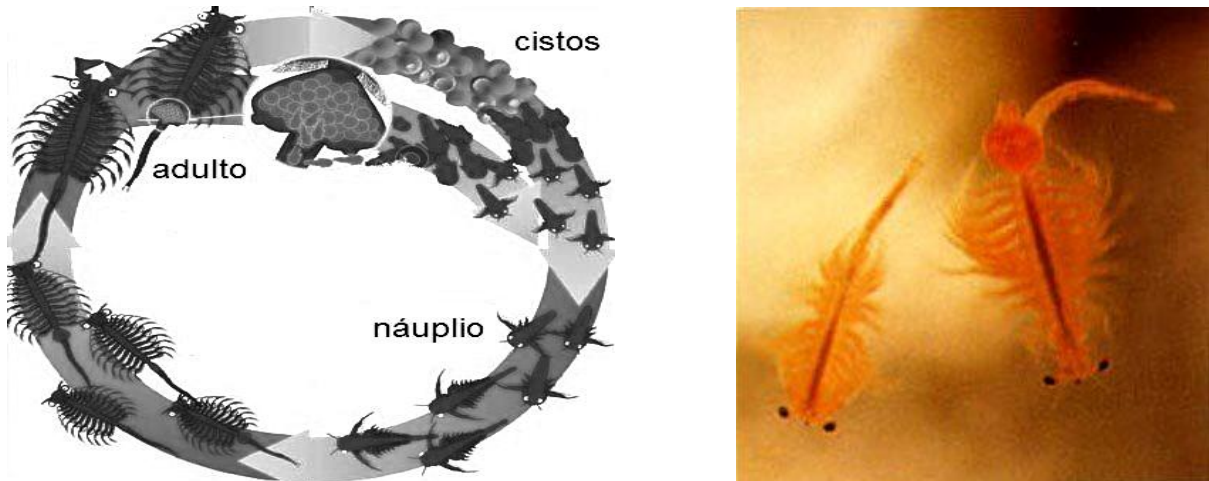


Figura 18- Ciclo de vida da *Artêmia salina* (esquerda) e sua forma adulta (direita).

A temperatura ideal para o cultivo é de 25 °C a 30 °C. O camarão de água salgada prefere uma salinidade cuja densidade encontra-se entre 1,020 e 1,025 g.mL⁻¹) e pode viver em água doce por aproximadamente 5 horas. Outras variáveis de grande importância são: pH, luz e oxigênio. Um pH por volta de 8,0 é ideal, pH inferior a 5,0 e superior a 10,0 matará a cultura. O mais importante é o nível de oxigênio na água, que deve ser mantido com forte aeração associado à iluminação (ARAÚJO, 2002).

Em diversos estudos, têm-se utilizado ensaios *in vitro* com *Artêmia salina*, devido ao fato desses microcrustáceos apresentarem boa sensibilidade frente aos testes de toxicidade, relativos à TFD (CAVALCANTE et al., 2000; BARBOSA et al., 2006; SOARES, 2006).

1.9.2 MICRO-ORGANISMOS

A TFD foi, originalmente, descoberta há 100 anos pelo seu efeito sobre micro-organismos, no entanto, só recentemente tem atraído a atenção como um possível tratamento para infecções localizadas, devido ao aumento à resistência dos micro-organismos patógenos aos antibióticos. As evidências disponíveis sugerem que mesmo as cepas resistentes são facilmente mortas por TFD (PERUSSI, 2007; XIAOPENG et al., 2009).

Uma das formas de classificar bactéria é de acordo com a coloração do corante de Gram. O termo Gram origina do nome de Christian Gram, pesquisador dinamarquês que, em 1884, desenvolveu, de maneira empírica, o método de coloração que passou a ter o seu nome e que permite dividir as bactérias em Gram-positivos e Gram-negativos, conforme a sua coloração (TRABULSI et al., 2005). A principal diferença entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é que a parede celular de bactérias Gram-negativas tem uma membrana externa à camada de peptídeoglicano (Figuras 19 e 20).

A membrana citoplasmática bacteriana, também chamada membrana plasmática, é uma estrutura de aproximadamente 8 nm de espessura, que forma uma barreira responsável pela separação do meio interno (citoplasma) e externo da célula. Como a maioria das membranas biológicas, é composta de proteínas (60%) imersas em uma bicamada fosfolipídica (40%). Os ácidos graxos dos lipídeos são responsáveis pela condição hidrofóbica da porção interna da membrana enquanto a parte hidrofílica dos mesmos fica exposta ao meio externo aquoso, além das interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, cátions como Mg^{2+} e Ca^{2+} são responsáveis pela manutenção da integridade da membrana. (TRABULSI et al., 2005).

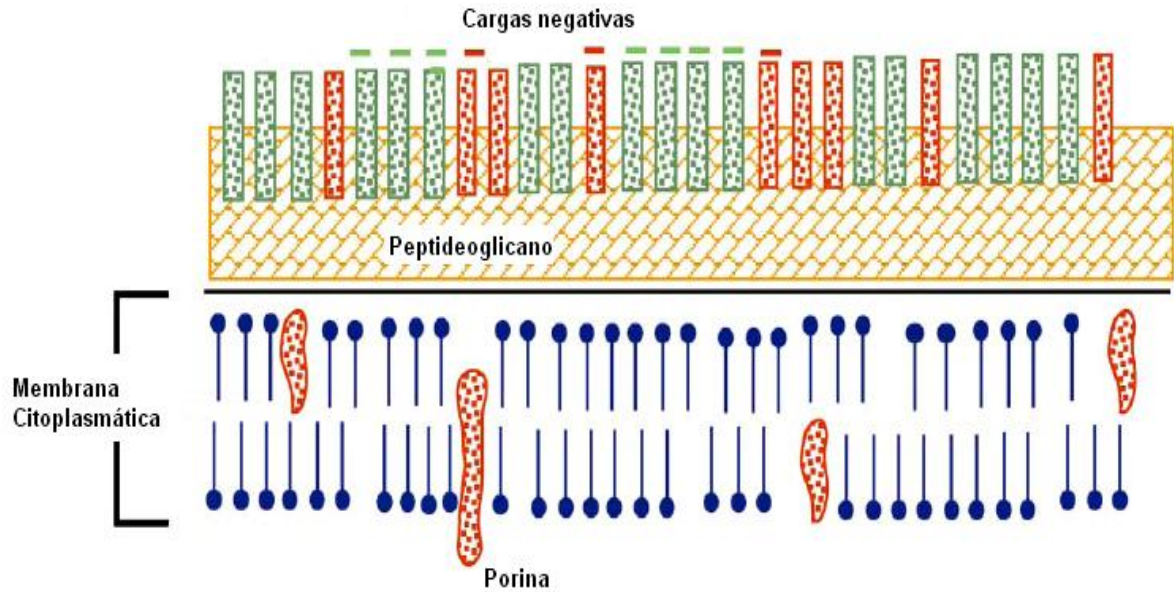


Figura 19- Estrutura esquemática da parede celular de bactérias Gram-positivas.

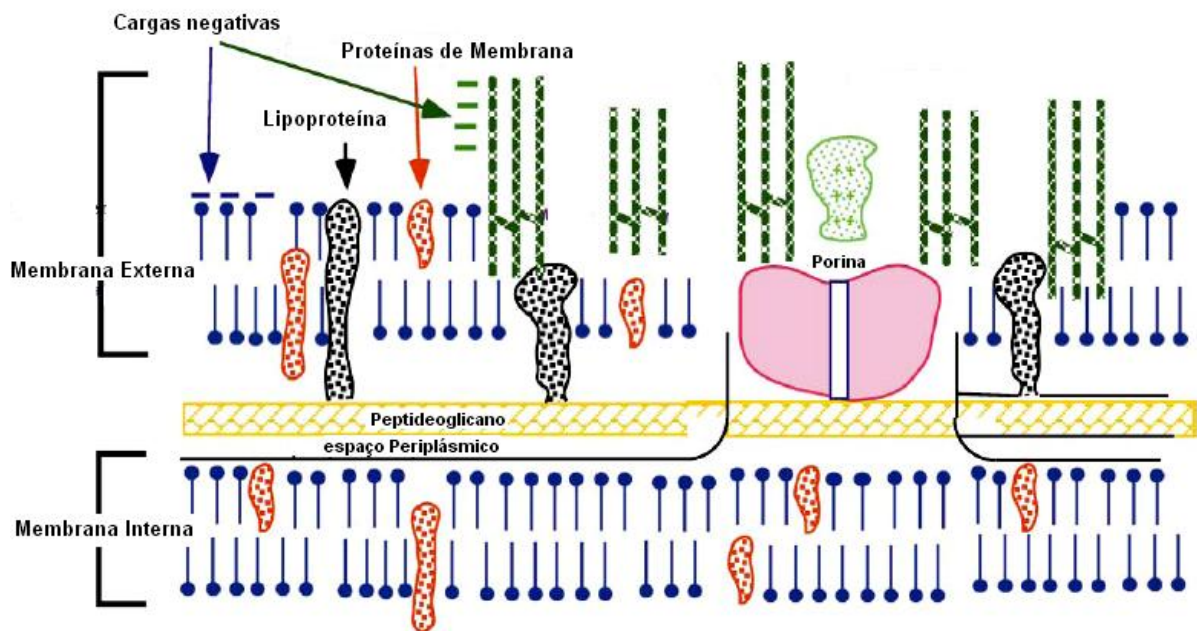


Figura 20- Estrutura esquemática da parede celular de bactérias Gram-negativas.

A membrana externa provê uma forte barreira de permeabilidade dificultando a incorporação do fármaco. Para um FS erradicar uma bactéria, a membrana citoplasmática da célula deve ser danificada. Então, fármacos que se localizam no

interior das células são geralmente mais eficientes (PAOLI, 2005). A membrana da bactéria é um importante alvo para a fototoxicidade dos FS e é possível assumir que sua ação é mediada por peroxidação de lipídios induzida pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Uma vez que FS agem via produção de oxigênio singlete, não existe resistência microbiana natural, assim, não importa se a cepa é resistente a uma ou muitas classes de agentes antibacterianos (PERUSSI, 2007).

As bactérias Gram-negativas apresentam parede celular composta por várias camadas que diferem na sua composição química e, portanto, é mais complexa que a parede das Gram-positivas que, apesar de mais espessa, é composta predominantemente de peptidoglicano. Para os micro-organismos Gram-negativos, os fármacos neutros ou negativamente carregados não são eficientemente incorporados pela bactéria. O processo inicial para a erradicação fotodinâmica desses micro-organismos consiste, então, no dano à membrana externa da célula, que permite que o fármaco se incorpore em sítios celulares internos, onde a ação fotodinâmica é mais eficiente, por exemplo, a membrana citoplasmática (PAOLI, 2005).

Diferenças na susceptibilidade à TFD entre espécies de bactéria da mesma classificação Gram dependem de fatores que podem ser peculiaridades das barreiras de permeabilidade das membranas, mas também de diferenças nas enzimas antioxidantes no DNA ou mecanismos de reparo do DNA, bem como de fatores simples, tais como tamanho da célula microbiana. Além disso, as características de cada FS, como a hidrofobicidade e a presença de cargas nos FS, levam a diferentes interações com as organelas. Desse modo, a ação fotodinâmica de um corante carregado positivamente pode ocorrer na mitocôndria, enquanto que a de um corante carregado negativamente pode ocorrer na membrana para uma mesma classe de micro-organismo (PERUSSI, 2007).

Na escolha dos micro-organismos para este estudo, procurou-se obter cepas que apresentem interesses médicos, ou características diferentes, como bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. Os experimentos foram desenvolvidos utilizando *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*.

Escherichia coli é um dos micro-organismos experimentais por excelência. Tido como habitante natural da flora microbiana do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente sendo, portanto, encontrado em fezes. Muitas cepas de *Escherichia coli* não são patogênicas. São classificados como bastonetes retos, Gram negativos, não formadores de esporos, possuem mobilidade através de flagelos ou são imóveis. São anaeróbios facultativos e utilizam D-glicose e outros carboidratos com a concomitante formação de ácido e gás. São oxidase negativas, catalase positivas e geralmente citrato negativos. Em relação à temperatura de crescimento, a *Escherichia coli* cresce rapidamente entre 30 e 42 °C, com tempos de geração variando de 0,49 h a 37 °C até 0,64 h a 42 °C. É tolerante ao meio ácido (TORTORA, FUNKE, CASE, 2005).

Embora encontrada com uma certa frequência como membro da biota normal do corpo humano, o *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes, uma vez que atua como agente de uma ampla gama de infecções, variando desde aquelas superficialmente localizadas, até algumas disseminadas, com elevada gravidade. São micro-organismos Gram positivos, anaeróbicos facultativos, que se apresentam na forma de cocos, arranjados como cachos de uva. Crescem comparativamente bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade. Produzem ácidos a partir do manitol, da manose, da trealose e da urease e apresentam prova bioquímica positiva para fosfatase e coagulase, também apresentam atividade hemolítica (TRABULSI et al., 2005).

As cepas de *Staphylococcus aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH 7,0, à temperatura ótima de 37 °C. As colônias formadas em placa, após 18-24 horas de incubação, apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes. A coloração dessas colônias varia desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado, não chegando a ser formada nos casos de crescimento em condições anaeróbicas (SANTOS et al., 2007).

Os fungos são importantes agentes etiológicos causadores de doenças humanas. Entre os principais patógenos fúngicos estão as leveduras do gênero *Candida*. A distribuição de leveduras do gênero *Candida* é muito ampla no meio ambiente, o que o torna um agente oportunista em potencial. Constituem células

leveduriformes que podem ser arredondadas ou ovaladas, apresentando um bom crescimento em meio úmido e com uma temperatura acima de 25 °C. Candidíase sistêmica é descrita em 20% a 40% de pacientes com câncer e em, aproximadamente, 25% dos pacientes que recebem transplantes de medula óssea (TRABULSI et al., 2005).

Na maioria dos estudos investigando os mecanismos de TFD em fungos foi observado que a membrana citoplasmática é a estrutura-alvo. A membrana citoplasmática dos fungos é formada por aproximadamente 80 a 90% de carboidratos, proteínas (6 a 25%) e uma pequena porção de lipídeos (1 a 7%). Contém polímeros de β -glucanas e quitina que apresentam uma função estrutural formando um rígido esqueleto que proporciona uma forte propriedade física à célula (PORTELA, 2006). Fungos, como *Candida albicans*, são ainda mais resistentes à TFD devido à presença de uma membrana nuclear que pode representar uma barreira adicional à penetração do FS (PERUSSI, 2007).

Processos fotoquímicos mediados por porfirinas, parecem inicialmente promover uma alteração na membrana citoplasmática da levedura. Este efeito possivelmente ocorre por meio de alterações oxidativas em lipídeos e proteínas presentes na membrana. O FS é então, capaz de penetrar nas células e causar danos irreversíveis à organelas intracelulares, o que leva à inativação celular. O aumento da permeabilidade da membrana durante o processo fotoquímico inicial é fundamental para acentuar o efeito fotodinâmico em células fúngicas, pois a inativação efetivamente ocorre após a absorção do FS para o interior da célula (DOVIGO et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem como objetivo investigar a eficiência fotodinâmica dos compostos $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ e $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, através de ensaios espectroscópicos e citotóxicos, para posterior utilização em terapia fotodinâmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar espectroscopicamente o composto $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$;
- Analisar possíveis alterações do FS, frente às variações físico-químicas, como pH, presença de micelas e incidência de fontes de luz com diferentes comprimentos de onda;
- Analisar a atividade fotodinâmica do composto $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ junto aos micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* e frente ao microcrustáceo *Artêmia salina*, perante a incidência de diferentes LED;
- Complementar o estudo de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ utilizando diferentes LED para o teste de fotobranqueamento, ácido úrico e atividade fotodinâmica sobre os micro-organismos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Para a realização deste trabalho utilizaram-se os compostos cloreto de [5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinato de ferro(III)] [Fe(TPPS₄)]Cl, aniônica, Calbiochem®, cuja fórmula molecular é C₄₄H₂₈ClFeN₄O₁₂S₄ (MM= 1024,3 g.mol⁻¹) e *p*-toluenosulfonato de 5, 10, 15, 20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina [H₂(TMPyP)], catiônica, Sigma®, cuja fórmula molecular é C₇₂H₆₆N₈O₁₂S₄ (MM= 1363,60 g.mol⁻¹). Os compostos foram utilizados sem purificação adicional. As estruturas dos dois compostos são apresentadas nas Figuras 21 e 22.

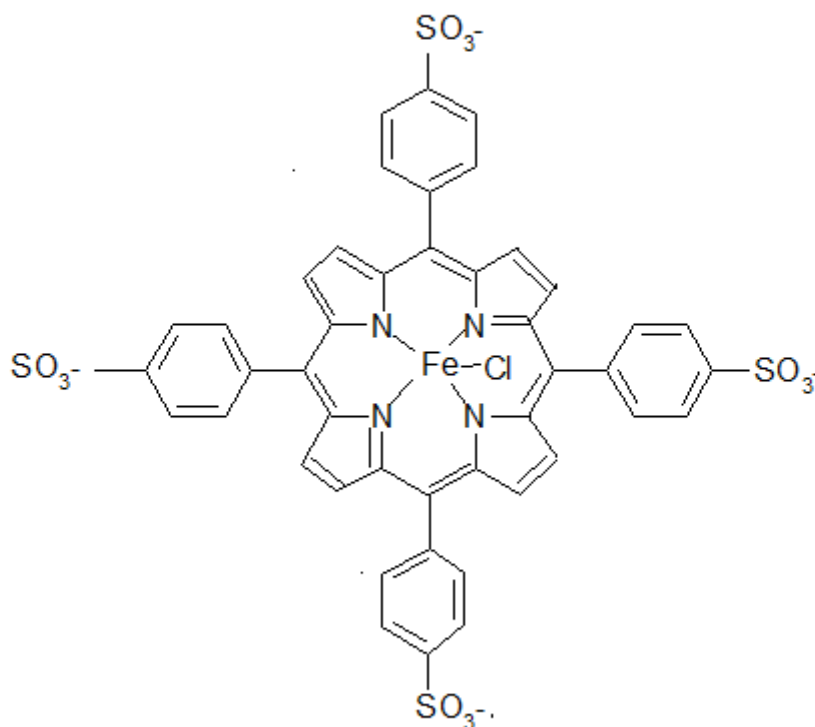


Figura 21- Estrutura da cloreto de [5, 10, 15, 20-tetrakis(4-sulfonatofenil)porfirinato de ferro(III)] [Fe(TPPS₄)]Cl.

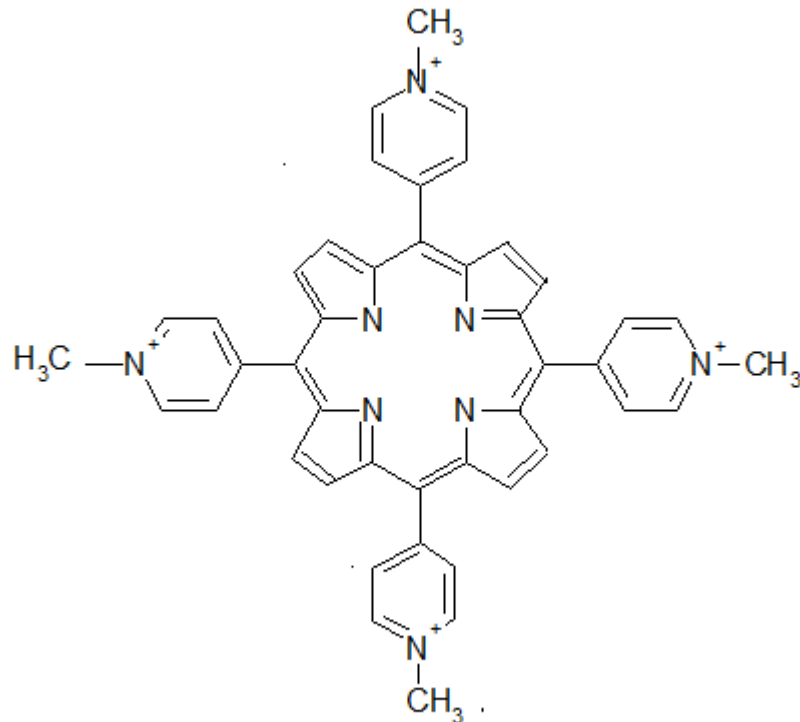


Figura 22- Estrutura da *p*-toluenosulfonato de 5, 10, 15, 20-tetrakis(*N*-metil-4-piridil)porfirina [H₂(TMPyP)].

Para a realização dos testes foram preparadas soluções de porfirina com concentrações próximas a 1,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, de modo a obter absorvância menor que 1,0 na região da banda *Soret*.

Os reagentes utilizados são de qualidade PA, sendo cloreto de sódio (Merck), hidróxido de sódio (Merck), ácido clorídrico (Vetec), ácido úrico (Vetec), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Riedel de Haën), meio nutritivo *Trypticase Soy Agar* (TSA) (Acumédia). A água utilizada no preparo de soluções foi destilada.

As medidas de absorção ótica no Uv-Vis foram realizadas em temperatura em torno de 20 °C utilizando-se espectrofotômetro UV-Visível Cary 100 Varian, com cubeta de quartzo com duas faces polidas e caminho ótico de 1,0 cm. As variações de pH foram registradas com pHmetro Quimis Q400A dotado de um eletrodo de vidro Ag/AgCl e as verificações de massa foram realizadas em balança analítica eletrônica Quimis modelo Q500L210C.

Para os testes de atividade fotodinâmica *in vitro*, utilizaram-se ovos de *Artêmia salina* de alta eclosão (Miramar®) lote 05061. Já para os testes com microorganismos, a absorbância foi detectada em um colorímetro fotoelétrico Micronal a 580 nm e as suspensões sofreram agitações em vortice Quimis. Após os tempos de incubação, as placas-teste e controle foram fotografadas com câmera digital Sony Cybershot DSC 707, com resolução de 5.0 megapixels e as colônias de bactérias foram contadas através do programa analisador de Image-Pro Plus 4.5.0.29 (Media Cybernetics).

Foi utilizado um sistema de iluminação proposto pelo grupo do pesquisador, professor Dr. Noboru Hioka (UEM) para os experimentos de verificação de reações de fotobranqueamento, teste de ácido úrico e para os ensaios *in vitro* com microorganismos e *Artêmia salina*. O sistema empregado é composto de LED com 5 watts de potência, organizados em conjuntos com 6 unidades individuais, perfazendo uma potência máxima de 30 watts, com LED vermelho, alaranjado ou verde, montado em paralelo, constituindo assim um conjunto fonte (Figura 23).

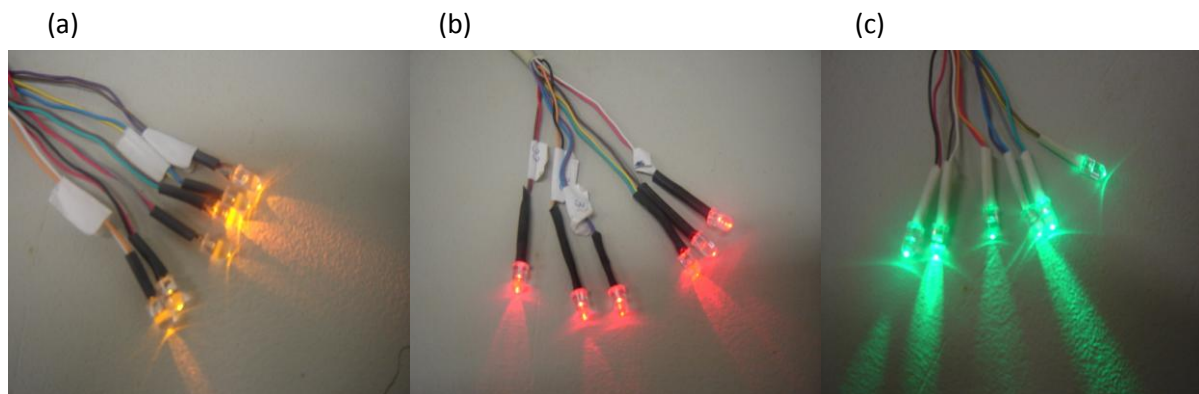


Figura 23- Ilustração da fonte de luz à base de LED alaranjado (a), vermelho (b) e verde (c).

O espectro de emissão dos LED foi obtido em um Monocromador Jarell - Ash 0,5 mm.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO DE PORFIRINAS

Para a determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da porfirina [Fe(TPPS₄)]Cl, preparou-se soluções dessa porfirina em água e etanol, nas concentrações de 9,7, 5,0 e 1,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Obteve-se o espectro de absorção ótica de cada solução na faixa de 300 a 700 nm. Através do tratamento de dados dos valores de absorbância em função da concentração, foi possível obter o coeficiente de absorvidade molar de cada porfirina em cada um dos solventes. O (ϵ) da porfirina [H₂(TMPyP)] já havia sido determinado anteriormente por M.C.Mendes (MENDES, 2008).

3.2.2 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE AGREGAÇÃO

Para analisar a capacidade de agregação do composto [Fe(TPPS₄)]Cl, utilizou-se o sistema água/etanol. As soluções foram preparadas em água e, a partir da adição de volumes pré-determinados de etanol, fez-se a leitura da absorbância em função da composição, as quais foram expressas na forma de porcentagem de volume de água em 1; 15; 30; 40; 50; 75; 85 e 100%. Registrou-se o espectro de absorção do composto na faixa que compreende de 300 a 700 nm para cada uma das misturas água/etanol, realizando o procedimento em triplicata.

A capacidade de agregação pode ser avaliada, também, através da variação da concentração das soluções, uma vez que quanto maior a concentração da solução porfirínica, maior a probabilidade da formação de agregados.

3.2.3 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DO FS FRENTE À ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE MICELAS

Preparou-se 10 mL de solução de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Verificou-se o pH da mesma e realizou-se a medida espectroscópica na faixa que compreende 280 a 700 nm. Adicionaram-se alíquotas de soluções de ácido clorídrico na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ com realização de medidas espectroscópicas à cada incremento. Após o pH apresentar-se extremamente ácido, passou-se a adicionar alíquotas de soluções de hidróxido de sódio na concentração $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e foram feitas as medidas espectroscópicas após a adição de cada alíquota. Utilizando-se outra solução de mesma concentração, adicionaram-se alíquotas de soluções de hidróxido de sódio na concentração $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, realizaram-se medidas espectroscópicas a cada inserção, até o pH apresentar-se extremamente alcalino, adicionaram-se, então, alíquotas de soluções de ácido clorídrico na concentração $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ com acompanhamento espectroscópico. Dessa forma, monitorou-se a absorvância em função do pH, em triplicata e em comprimento de onda convenientemente escolhido.

Foram utilizados modelos biomiméticos constituídos por micelas de surfactantes, dentre os quais se utilizou o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), cuja fórmula molecular é $(\text{C}_{18}\text{H}_{40}\text{NBr})$ e massa molecular $364,48 \text{ g.mol}^{-1}$, Figura 24. O CTAB é um surfactante catiônico, e foi escolhido para verificar a interação com $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ que é um composto aniônico.



Figura 24- Fórmula estrutural do CTAB

Adicionou-se 7,5 mL de solução de CTAB na concentração de $2,0 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹, à 52,5 mL de solução $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$, e dividiu-se em alíquotas de 10 mL, onde repetiu-se o teste de alteração do pH do meio, agora na presença de micelas de CTAB. As análises foram realizadas em triplicata.

3.2.4 REAÇÕES DE FOTOBANQUEAMENTO

Para verificar a existência de reações de fotobranqueamento preparam-se soluções do composto $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ na concentração $1,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$, que foram iluminadas (Figura 25) utilizando-se um sistema de LED. Foram utilizados LED com diferentes faixas de comprimentos de onda de emissão (vermelho, alaranjado e verde), registrando os espectros de absorção das amostras na faixa de 300 a 700 nm, a cada 5 minutos de exposição à luz, perfazendo um total de 60 minutos, a fim de visualizar possíveis mudanças nos espectros dos compostos.

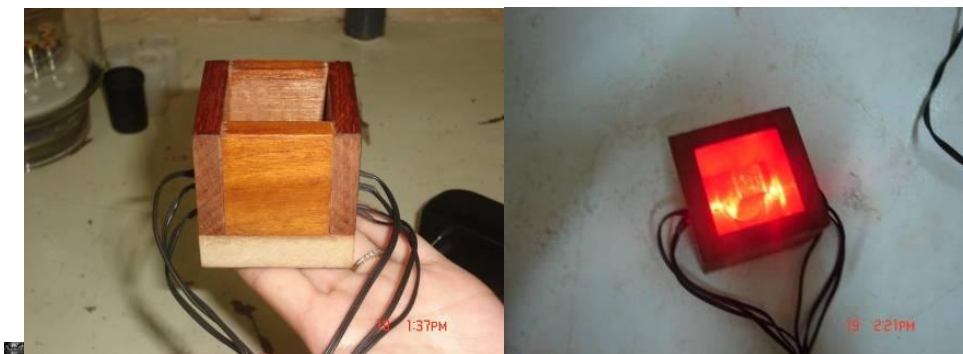


Figura 25- Sistema de LED, utilizado para iluminação das soluções de porfirina.

3.2.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE, UTILIZANDO O TESTE DO ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico (AU), 7,9-dihidro-1H-purina-2,6,8 (3H)-triona, apresenta fórmula molecular $C_5H_4N_4O_3$ e massa molecular 168 g.mol^{-1} (Figura 26).

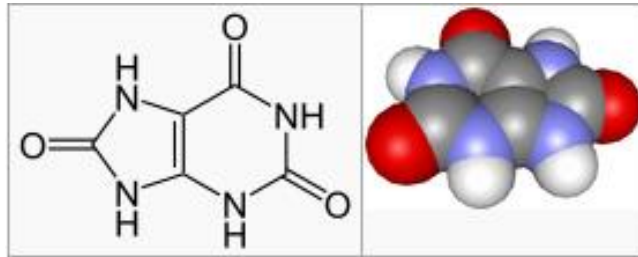


Figura 26-Fórmula molecular do ácido úrico.

Assim, utilizou-se solução de ácido úrico na concentração de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ que foi misturada à solução dos compostos em estudo (com concentração final equivalente a $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em água. A mistura foi iluminada com uma fonte de LED de diferentes faixas de comprimentos de onda (vermelho, alaranjado e verde), e a cada três minutos realizaram-se medidas espectroscópicas da solução na faixa de 200 a 700 nm, durante um período de 30 minutos, procurando observar um decaimento na faixa de absorção do AU em 293 nm. As análises foram realizadas em triplicatas.

3.2.6 TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A ARTÊMIA SALINA (TAS)

O ensaio de toxicidade sobre a *Artêmia salina* foi realizado utilizando-se os ovos (Miramar®) dessa espécie em solução aquosa de NaCl ($3,8 \text{ g.L}^{-1}$). O recipiente utilizado para esse teste é dividido em dois compartimentos, sendo um deles protegido da luz e o outro iluminado. Os ovos foram depositados no compartimento protegido da luz, onde após um período de 48 horas, observou-se a eclosão dos

mesmos, com posterior migração das larvas para a parte iluminada (Figura 27). Os microcrustáceos foram coletados a temperatura de 20 °C e distribuídos em número fixo (20 microcrustáceos) em tubos de ensaio, acrescentando as soluções dos compostos [Fe(TPPS₄)]Cl ou [H₂(TMPyP)] em diferentes concentrações (10,0, 7,0 e 5,0 µmol.L⁻¹) e em meio salino, perfazendo um volume total de 3 mL.



Figura 27- Recipiente utilizado para eclosão dos ovos de *Artêmia salina*.

As amostras foram divididas em dois grupos: as submetidas à iluminação com LED vermelho, alaranjado ou verde, por duas horas e as sem iluminação, incluindo o controle que não possui solução das porfirinas. Após o tempo de irradiação, e pré-incubação (tempo de espera para a produção e ação de EROs - uma hora), realizou-se a contagem do número de camarões vivos e mortos em cada tubo de ensaio.

3.2.7 TESTE DE TOXICIDADES SOBRE MICRO-ORGANISMOS: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*

Para realização desse teste prepararam-se diferentes suspensões utilizando solução salina 0,9% de NaCl (soro fisiológico) com as cepas dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 36801), acompanhando-se a absorbância em um colorímetro

Micronal a 580 nm até que essas atingissem a absorvância próximo a 0,8, equivalente a cerca de 10^8 micro-organismos.mL⁻¹ (UFC.mL⁻¹).

Dessa suspensão, foi transferida uma alíquota de 10 µL para tubos contendo 2 mL de meio nutritivo BHI - Infusão de cérebro e coração, e 40 µL de solução dos compostos [Fe(TPPS₄)]Cl ou [H₂(TMPyP)], ficando a solução com concentração final 5,0 µmol.L⁻¹ desses compostos. Os tubos foram separados em dois grupos: os submetidos à iluminação de LED vermelhos, alaranjados ou verdes, com tempos de iluminação de 10 e 30 minutos, e os sem iluminação. Adotaram-se como padrões os tubos que não foram submetidos à iluminação e aqueles que não continham fotossensibilizadores.

Decorrido o tempo de iluminação, realizou-se a homogeneização das soluções agitando-se por cerca de 15 segundos em um vórtice Quimis e sendo coletada alíquotas de 10 µL de cada um dos tubos para semeá-las em placas de Petri contendo Agar TSA, em triplicata, que foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C, para, posteriormente, serem fotografadas e então realizada a contagem das UFC de micro-organismos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO DE PORFIRINAS

A análise dos espectros de absorção de porfirinas e de seus derivados é importante por este estar correlacionado a muitas características físico-químicas da mesma. A conjugação cíclica dos elétrons gera uma zona de absorção característica, a banda *Soret*, com um alto coeficiente de absorvidade molar. Assim essa absorção foi a escolhida para determinações espectroscópicas quantitativas desses compostos.

Soluções aquosas de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ com pH 6,5, apresentam banda *Soret* com seu máximo em 396 nm e 2 bandas Q com máximos em 528 e 685 nm, como mostrado na Figura 28.

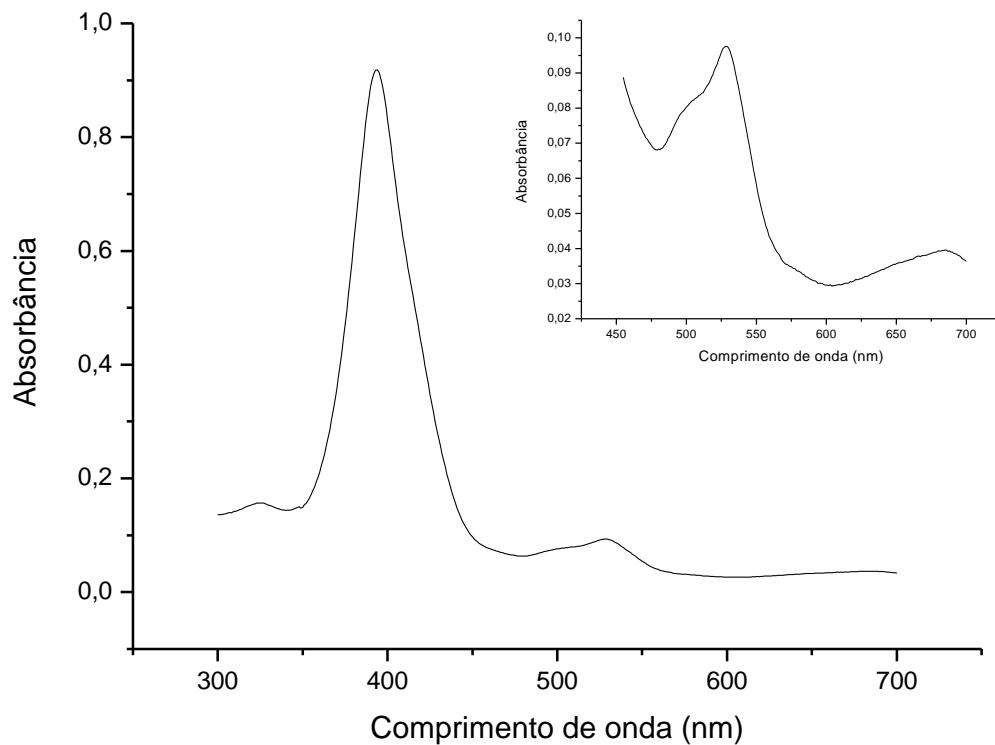


Figura 28- Espectro de absorbância na região de 300 a 700 nm em solução aquosa contendo $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ em pH 6,5.

De acordo com a lei de Lambert-Beer (Equação 1), a concentração da espécie absorvente é proporcional à sua absorbância (A). Sendo assim, para o composto $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$, foram utilizadas três concentrações (9,7, 5,0 e 1,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e plotou-se o gráfico da absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção (396 nm em água) em função da concentração (Figura 29). Em etanol, a absorção máxima foi observada em 424 nm, visto que o solvente influencia nas transições eletrônicas do tipo $\pi-\pi^*$, deslocando o máximo de absorção para comprimentos de onda maiores (efeito batocrômico). O valor de ϵ foi determinado em água e etanol, e podem ser observados na Tabela 2.

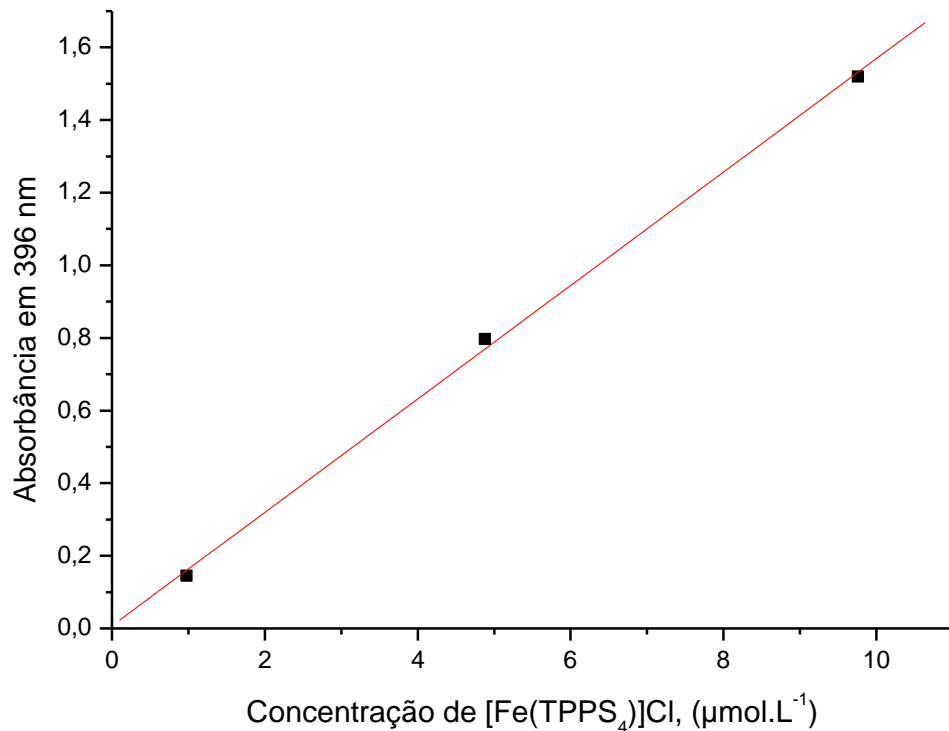


Figura 29- Variação da absorbância em 396 nm, com a concentração de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ em água.

A análise linear ocorreu à partir da equação 17, na qual o valor de A (absorbância) obtido foi de 0,0072377, e o valor de B (correspondente ao epton) foi de 156200, obtendo-se R igual a 0,9994, o que demonstra que a linearidade esperada foi obtida.

$$Y = A + B \text{ (Equação 17)}$$

Para que exista uma relação linear entre absorvância e concentração, a absorvidade molar (ϵ), que é função do comprimento de onda, não deve variar significativamente na faixa correspondente à banda de radiação absorvida. O comportamento linear na faixa de concentração estudada também indica que não há agregação nessa faixa de concentração. Os resultados obtidos são equivalentes aos encontrados na literatura (GANDINI, YUSHMANOV, TABAK, 2001; HALMA et al., 2008).

Tabela 2- Valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) e comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) para as bandas de absorção de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ em água e etanol.

Porfirina	Soret	Q _I	Q _{II}
$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}}$ (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)	1,56x10 ⁵	1,92x10 ⁴	7,45x10 ³
λ (nm)	(396)	(528)	(685)
ϵ_{etanol} (L.cm ⁻¹ .mol ⁻¹)	1,38x10 ⁵	1,87x10 ⁴	1,82x10 ⁴
λ (nm)	(414)	(578)	(622)

Em relação à porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, Mendes, determinou os valores do coeficiente de absorvidade molar, tendo encontrado $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}}$ 3,5 x10⁵ L.cm⁻¹.mol⁻¹ e ϵ_{etanol} 3,7x10⁵ L.cm⁻¹.mol⁻¹ (MENDES, 2008). O espectro de absorção de solução aquosa a 1,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ está apresentado na Figura 30.

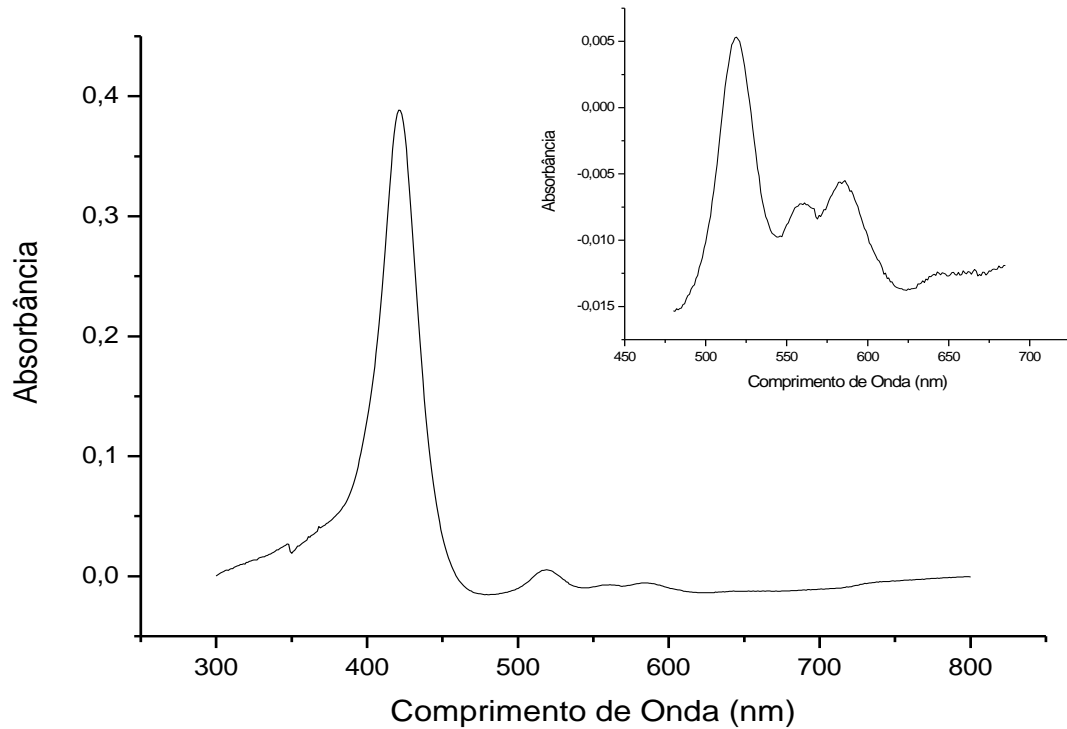


Figura 30- Espectro de absorção na região de 300 a 700 nm em solução aquosa contendo $1,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ (MENDES, 2008).

4.2 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DO FS FRENTE À ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO NA AUSÊNCIA DE MICELAS

À partir de uma solução de concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, adicionou-se alíquotas de solução de $\text{HCl } 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (perfazendo um total de $8 \mu\text{L}$ de incrementos em 10 mL de solução de porfirina), para que o pH apresentasse uma variação de 6,9 a 1,3. Observou-se uma banda persistente em 396 nm , apresentando apenas um decréscimo na absorbância, observado na Figura 31.

O espectro de absorção da porfirina $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ no pH ácido, apresentado na Figura 34, provavelmente está associado a $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)](\text{H}_2\text{O})$, pentacoordenadas, ou a uma mistura de mono e di-aquo espécies hexacoordenadas, conforme já descrito na literatura (GANDINI, YUSHMANOV, TABAK, 2001).

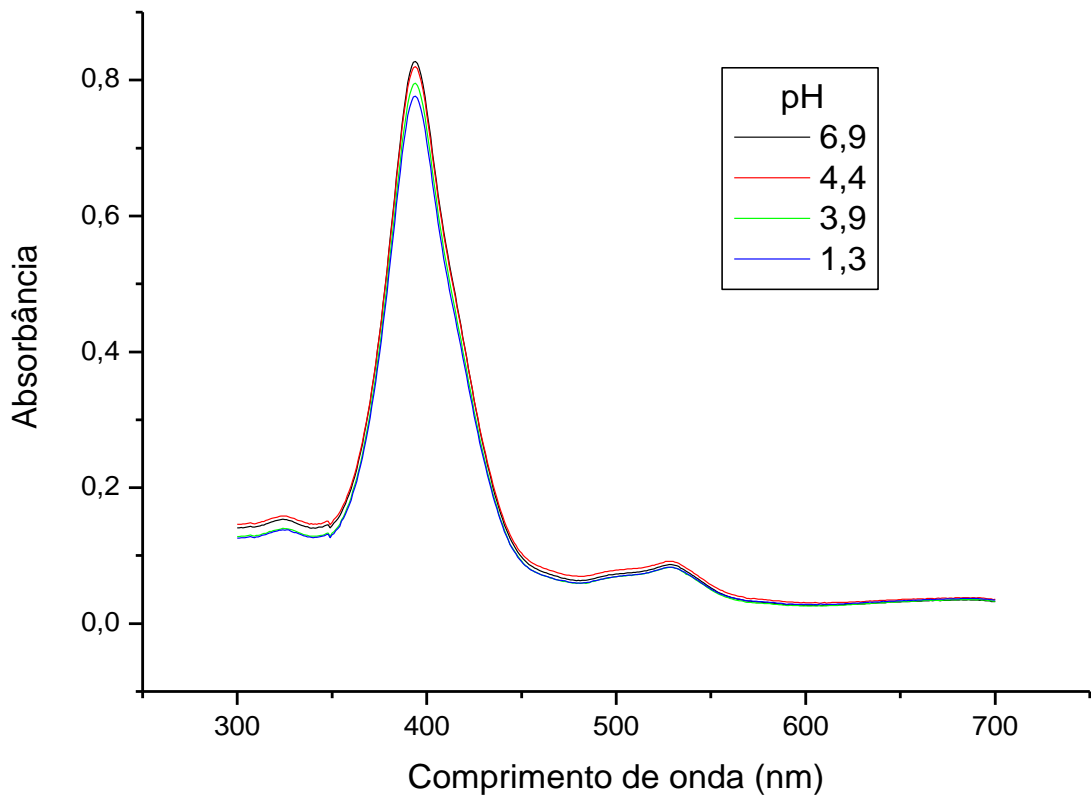
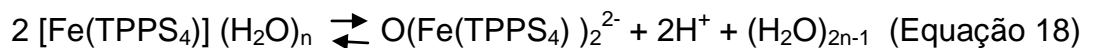


Figura 31- Espectro de absorção de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água na faixa de pH entre 7,0 e 1,0.

A literatura aponta que, em pH baixo, abaixo do pK_a , várias espécies monoméricas de metaloporfirinas poderiam coexistir em equilíbrio (GANDINI, YUSHMANOV, TABAK, 2001). A equação de equilíbrio de dimerização pode ser expressa como demonstrado na equação 18:



O espectro obtido em pH ácido apresenta uma banda atribuída a transições internas $\pi-\pi^*$ da espécie aniônica (amarela). À medida que o pH é diminuído essa banda se mantém, e quando alcaliniza-se o meio pode-se observar a existência de

reversibilidade em 396 nm. Acima de pH 7,12 essa banda desaparece e surge outra banda em 410 nm, conforme observado na Figura 32. Essa mudança espectral está associada à formação de uma nova espécie neutra (coloração verde).

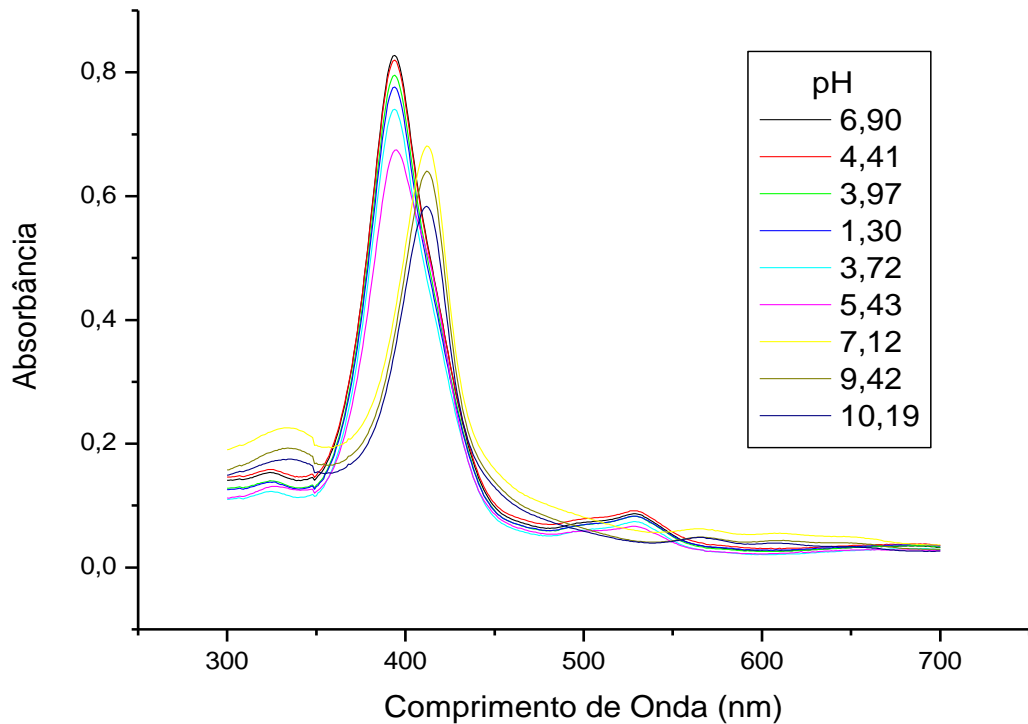


Figura 32- Espectros de absorção de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água na faixa de pH entre 7,0 e 1,0 e posteriormente entre 1,0 e 10,0.

Realizou-se também, a partir de solução de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$, a adição de incrementos de soluções de NaOH, obtendo-se a variação de pH conforme observado na Figura 33, e, posteriormente com a adição de incrementos de HCl, pôde-se observar a existência de reversibilidade (Figura 34), onde constatou-se novamente a formação de duas bandas, uma em 396 nm, em pH ácido e outra em 410 nm em pH básico, a partir de pH 7,12.

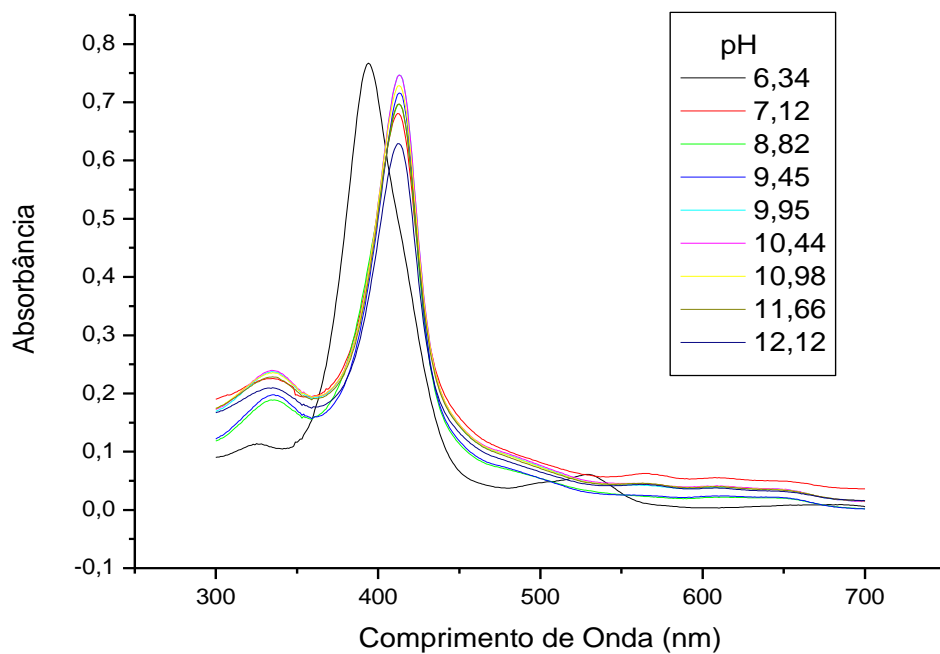


Figura 33- Espectros de absorção de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água na faixa de pH entre 6,0 e 12,5.

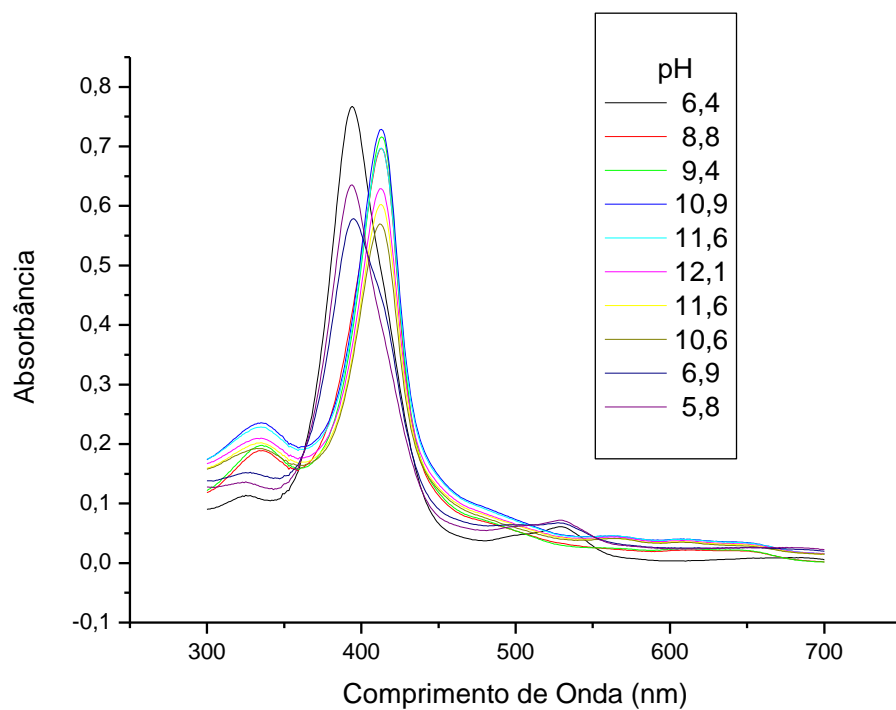


Figura 34- Espectros de absorção de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água, na faixa de pH entre 5,8 e 12,1.

A metaloporfirina [Fe(TPPS₄)]Cl geralmente existe como monômeros em soluções ácidas e podem formar dímeros quando ocorre a alcalinização com um pK de dimerização (pK_d) em torno de 7,8 em soluções aquosas homogêneas (GANDINI, YUSHMANOV, TABAK, 2001). O ajuste dos dados deste experimento usando a função sigmoïdal forneceu um pK_d de 7,7.

As mudanças espectrais consideráveis observadas em função do pH na faixa de pH 4-8, em solução aquosa podem ser atribuídas ao equilíbrio de dimerização. Na Figura 34, é possível observar que na faixa abaixo de pH 7,0 e acima de pH 8,0 a porfirina mantém-se estável, não havendo mudanças estruturais. Considerando que o sangue, principal responsável pela distribuição do FS no organismo, encontra-se tamponado em pH 7,4 (o que não atinge a faixa de estabilidade observada), e os tecidos inflamados e cancerígenos apresentam pH em torno de 5,5, este fator não se demonstra positivo em relação à terapia fotodinâmica, uma vez que pode ocorrer alteração do FS em pH sanguíneo, antes de atingir os tecidos doentes. Não pode-se, portanto afirmar, mesmo com a reversibilidade demonstrada nos experimentos, que o mesmo chegue em sua forma ativa no sítio de ação esperado.

4.2.1 ANÁLISE DA ESTABILIDADE DO FS FRENTE À ALTERAÇÃO DO pH DO MEIO NA PRESENÇA DE MICELAS DE CTAB

As medidas espectroscópicas foram realizadas em sistema aquoso adicionadas de solução aquosa do tensoativo CTAB, as quais permitiram realizar um estudo prévio da interação fotossensibilizador-micela e observar se há formação de agregados.

A solução aquosa de [Fe(TPPS₄)]Cl apresentou pH inicial 5,24 (coloração amarela), sendo o mesmo alterado após a adição de CTAB para 4,92, no qual a solução apresentou coloração verde. A concentração da solução de [Fe(TPPS₄)]Cl após adição de CTAB é de 4,3 μmol.L⁻¹, enquanto a solução de CTAB apresentou a concentração de 2,7 x 10⁻³ mol.L⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando-se incrementos de HCl 1,0x10⁻² mol.L⁻¹ (15 μL de incrementos em 10 mL

de solução de porfirina) e, separadamente, incrementos de NaOH $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ (22 μL de incremento em 10 mL de solução de metaloporfirina).

A partir do procedimento realizado, observou-se que tanto variando o pH para ácido quanto para pH alcalino, a adição de CTAB provocou um deslocamento da banda *Soret* de 396 para 410 nm, característica esta, condizente ao que foi observado em pH básico, antes da adição de CTAB, envolvendo espécies em equilíbrio de dimerização. Também podem-se observar variações em relação às bandas Q_I de 528 para 570 nm, e Q_{II} de 685 para 611 nm, o que permite comparar as formas obtidas em pH ácido e alcalino, a partir da interação com o surfactante (Figura 35).

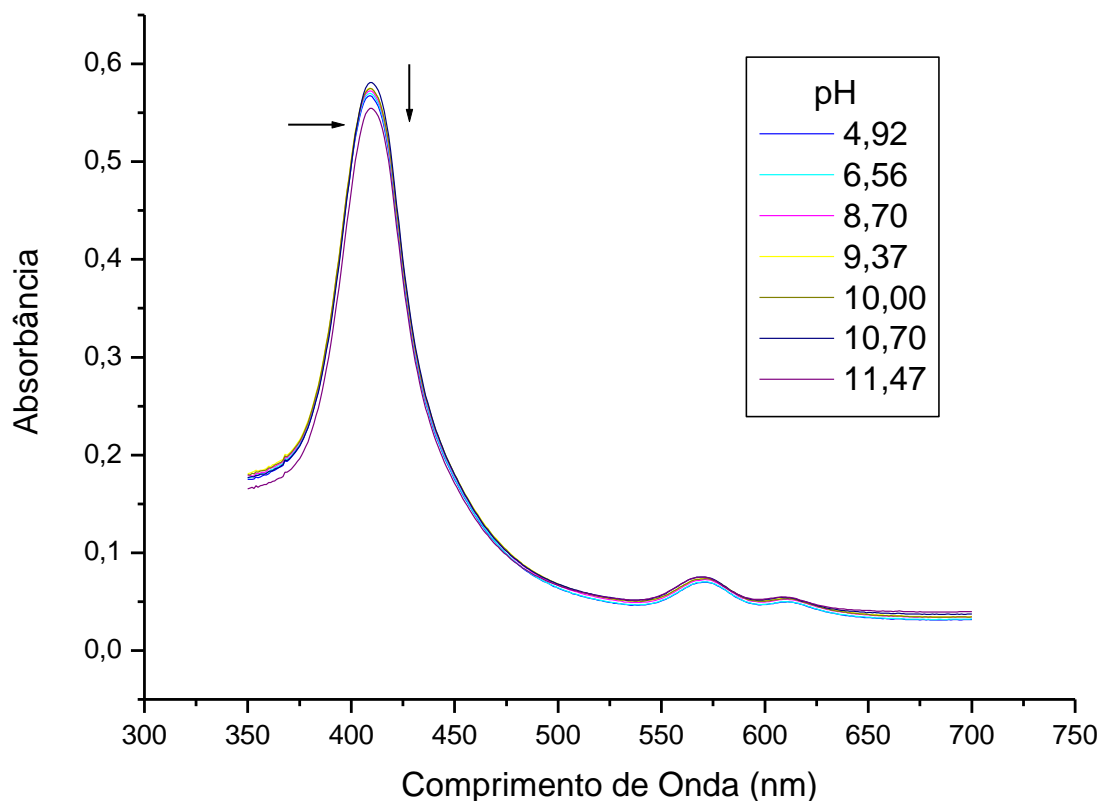


Figura 35- Espectros de absorção de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ $4,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em presença de micelas de CTAB, na faixa de pH entre 4,9 e 11,5.

Na literatura, relata-se a presença de pequenas diferenças nas bandas *Soret* de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ em presença de CTAB, onde em pH 4,0 foi observado $\lambda_{\text{máx}}$ 416 nm e em pH 9,0 $\lambda_{\text{máx}}$ em 414 nm. Esses resultados também são comparados aos espectros obtidos com a metaloporfirina em solução aquosa, o que corresponde à forma dímera (GANDINI, YUSHMANOV, TABAK, 2001). Pode-se, também, observar diferenças dependentes da concentração de CTAB, sendo que as variações citadas foram atribuídas à atração da metaloporfirina pelo surfactante, mas que, por apresentar-se em concentração abaixo da cmc, na faixa micromolar, não formam agregados. Somente a espectroscopia eletrônica de absorção não consegue determinar se as espécies estão vinculadas a monômeros, dímeros ou agregados associados a surfactantes, sendo necessários outros métodos para complementação deste estudo.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE AGREGAÇÃO

A análise da agregação de FS utilizados na TFD demonstra grande importância devido à captação e distribuição intracelular apresentar-se diferente em comparação entre as formas monoméricas e agregadas das espécies. Estudou-se a agregação para a metaloporfirina $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ e observou-se que houve mudança no espectro de absorção à medida que a proporção água/etanol era alterada (Figura 36).

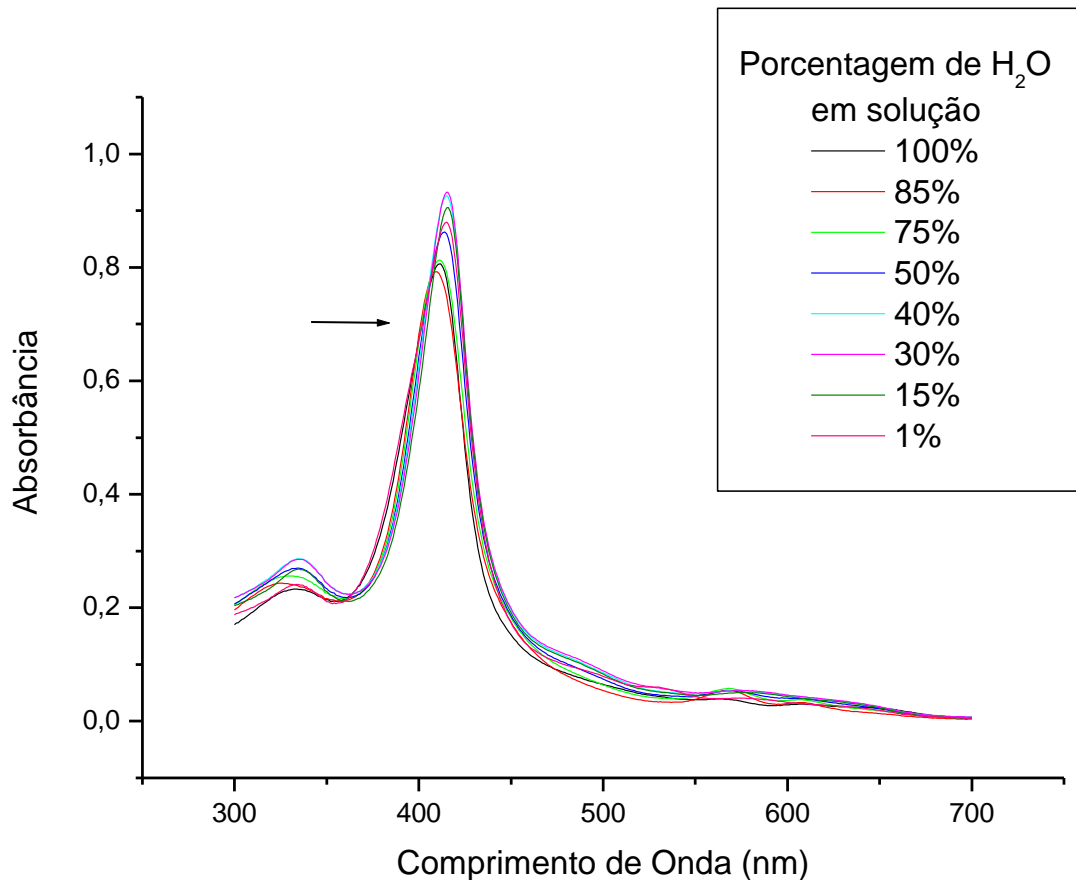


Figura 36- Espectros de absorção de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ a $1,7 \mu\text{mol. L}^{-1}$ em diferentes proporções de água/etanol.

Observou-se o decréscimo da absorção no espectro (Figura 36), à medida que o percentual de água apresentou-se elevado. Quando a proporção de etanol é maior, houve deslocamento do máximo de absorção na banda *Soret*, para comprimentos de onda maiores – deslocamento batocromico, o que pode sugerir a formação de agregados do Tipo J.

Não foi observado o aparecimento de novos picos, o que à princípio seria o principal indicador da presença de uma nova espécie, decorrente de agregação. No entanto, a ausência de picos não quer dizer necessariamente que o fenômeno de agregação não tenha ocorrido.

Deve-se no entanto, considerar a probabilidade desse deslocamento consistir em um comportamento natural da metaloporfirina $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ nos diferentes

solventes, como demonstrado através da determinação do coeficiente de absortividade molar (Tabela 2), onde registrou-se um λ_{max} de 396 nm em água (100%) e 414 nm em etanol (100%), para banda *Soret*.

A análise de fluorescência molecular, que é um dos métodos adequados para determinação da agregação, não pode ser aplicada com a metaloporfirina [Fe(TPPS₄)]Cl, pela mesma não apresentar emissão de fluorescência. Dessa forma, não é conveniente propor uma estrutura ou conformação do agregado da porfirina estudada nesse sistema, através do método utilizado.

4.4 REAÇÕES DE FOTOBANQUEAMENTO

O fotobranqueamento pode ser ocasionado pela reação do FS com as espécies reativas de oxigênio, por ele produzidas. Tal evento compromete a produção de EROs, fazendo com que doses elevadas do fotossensibilizador tenham que ser administradas para compensar a sua perda (RONCHI et al., 2007). Para analisar a existência de fotobranqueamento, as soluções foram iluminadas utilizando-se sistemas de LED em diferentes faixas de comprimentos de onda máximos determinandos, sendo para LED vermelho em 634 nm, (Figura 37); para LED alaranjado em 594 nm, (Figura 38) e para LED verde em 525 nm, (Figura 39), registrando os espectros de absorção das amostras na faixa de 300 a 700 nm, à cada 5 minutos de exposição à luz.

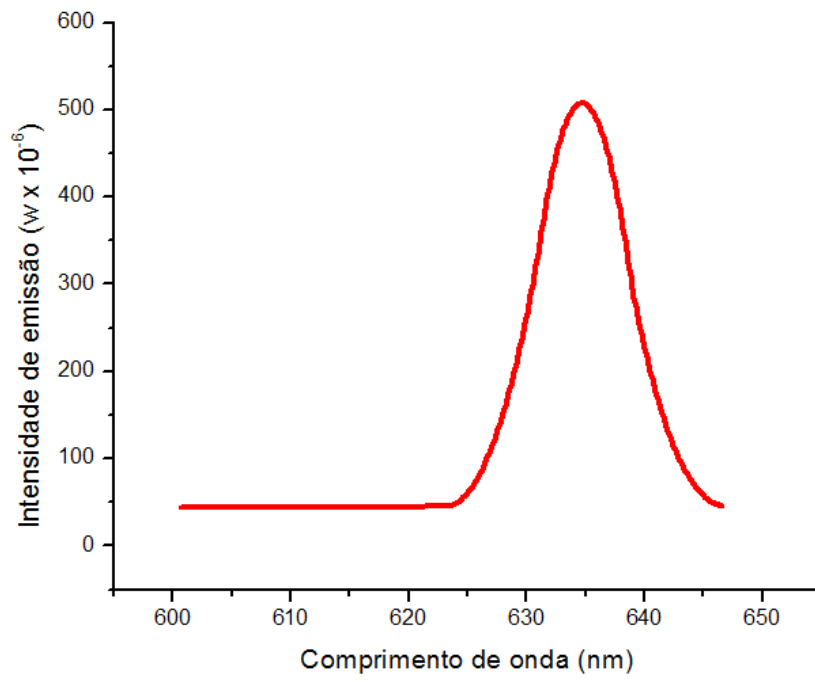


Figura 37- Espectro de emissão para LED vermelho utilizado.

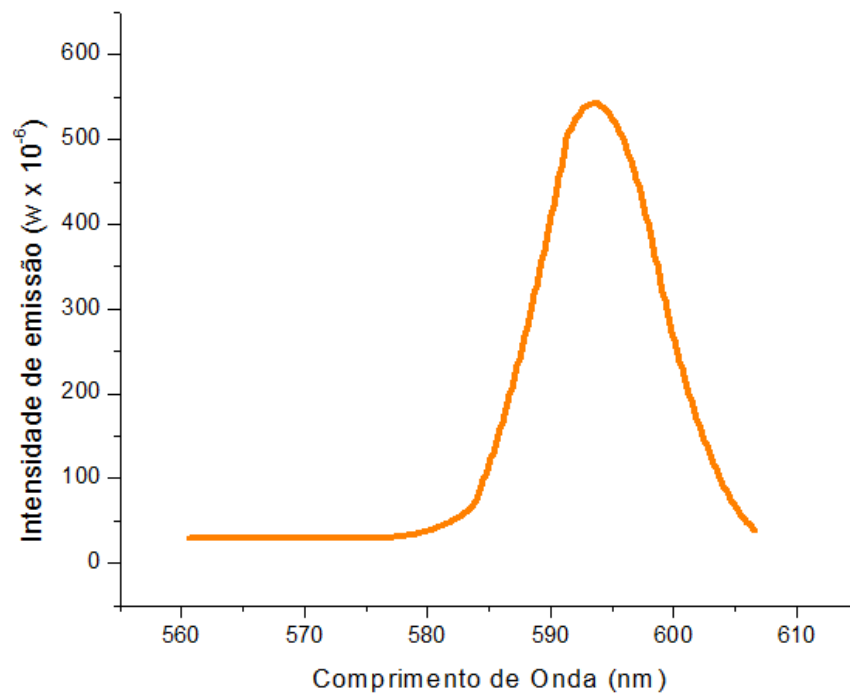


Figura 38- Espectro de emissão para LED alaranjado utilizado.

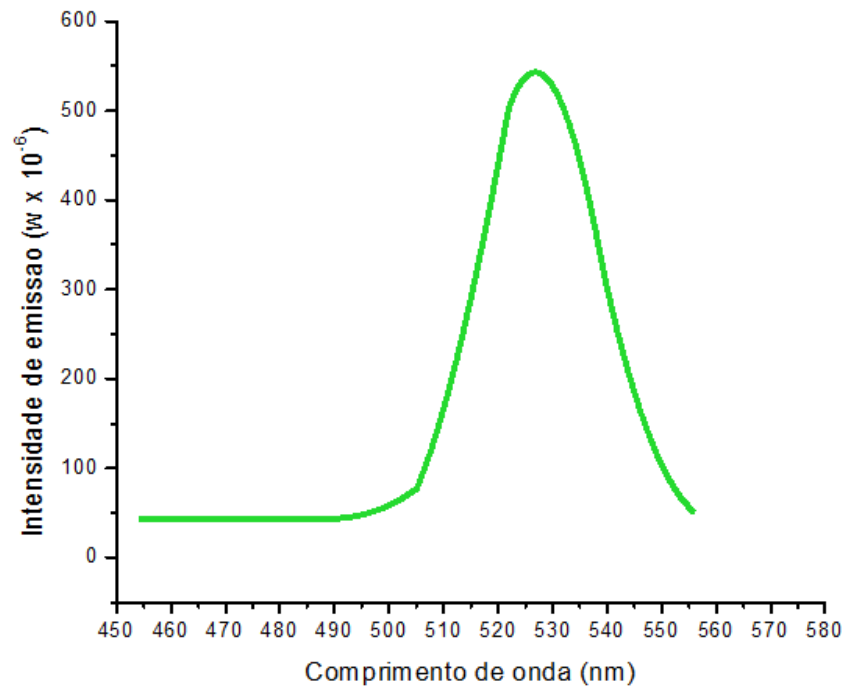


Figura 39- Espectro de emissão para LED verde utilizado.

Tomando-se o espectro inicial da $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ como referência, considerando um tempo total de 60 minutos de iluminação, calculou-se uma diminuição da absorção na banda *Soret* em cerca 1,5% quando se utilizou LED alaranjado, 2,1% quando se utilizou LED verde e 2,8% quando se utilizou LED vermelho. Esses valores, ao serem comparados com outros dados da literatura, como é o caso da clorofila que apresenta uma diminuição em torno de 70% (SOARES, 2006), demonstram que essa metaloporfirina não sofre fotobranqueamento significativo (Figura 40). Compreende-se que a estrutura da porfirina $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ não é degradada nessas condições, e que, portanto, não terá a produção de formas tóxicas de oxigênio afetada pelo fator tempo de irradiação.

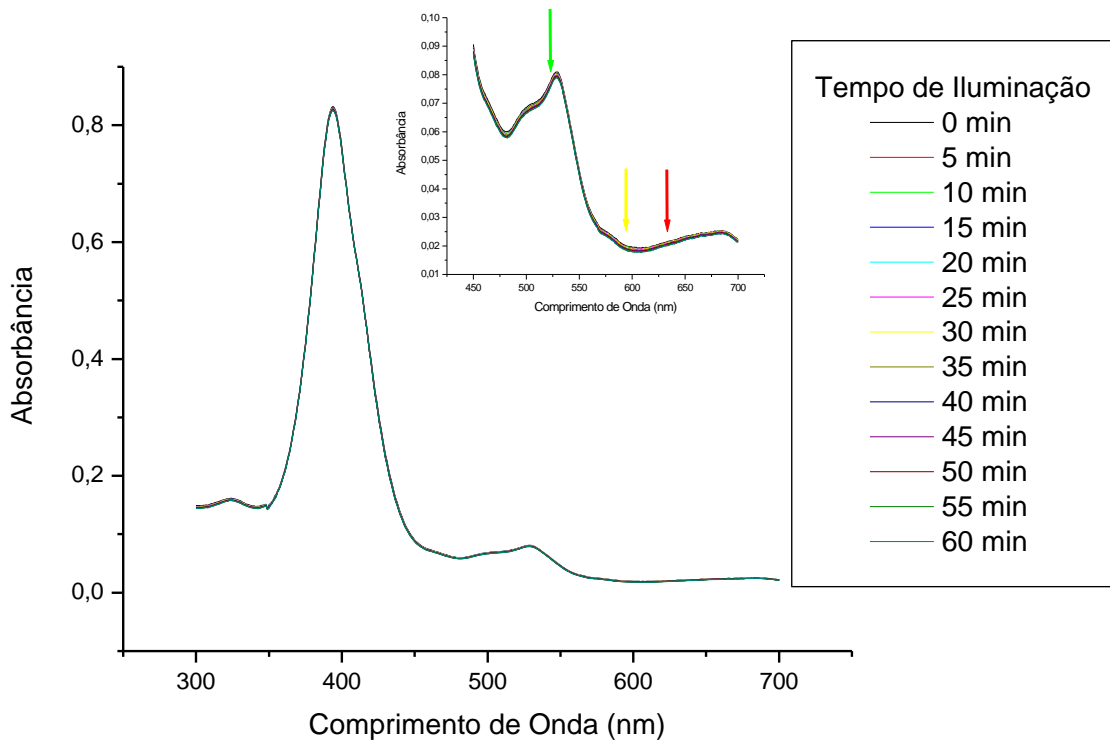


Figura 40- Espectros de absorção de solução contendo $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em água, durante 60 minutos de iluminação com LED alaranjado. As setas verde, amarela e vermelha, indicando o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de cada sistema de LED utilizado.

Uma outra maneira de medir o fotobranqueamento de um FS é irradiá-lo com luz visível, num meio saturado com $^3\text{O}_2$, e monitorar sua fluorescência. Caso ocorra fotobranqueamento, o mesmo será detectado através da queda na intensidade de fluorescência do FS. Mas, como já mencionado, $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ não apresenta emissão de fluorescência.

Em relação à porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, Mendes havia realizado testes com LED vermelho, considerando um tempo total de 60 minutos de iluminação, no qual se observou um decaimento de cerca de 2% do máximo de absorção na banda *Soret* em água, e que conforme comentado anteriormente, não se constitui em uma decomposição significativa (MENDES, 2008). Realizou-se então outros estudos, agora utilizando LED alaranjado e verde, também em um tempo máximo de 60 minutos, onde se observou um decaimento de 15,9% com LED alaranjado, e de

14,6% com LED verde para a banda *Soret*, o que indica uma considerável degradação do FS. O resultado de um dos experimentos realizados com LED verde é apresentado na Figura 41.

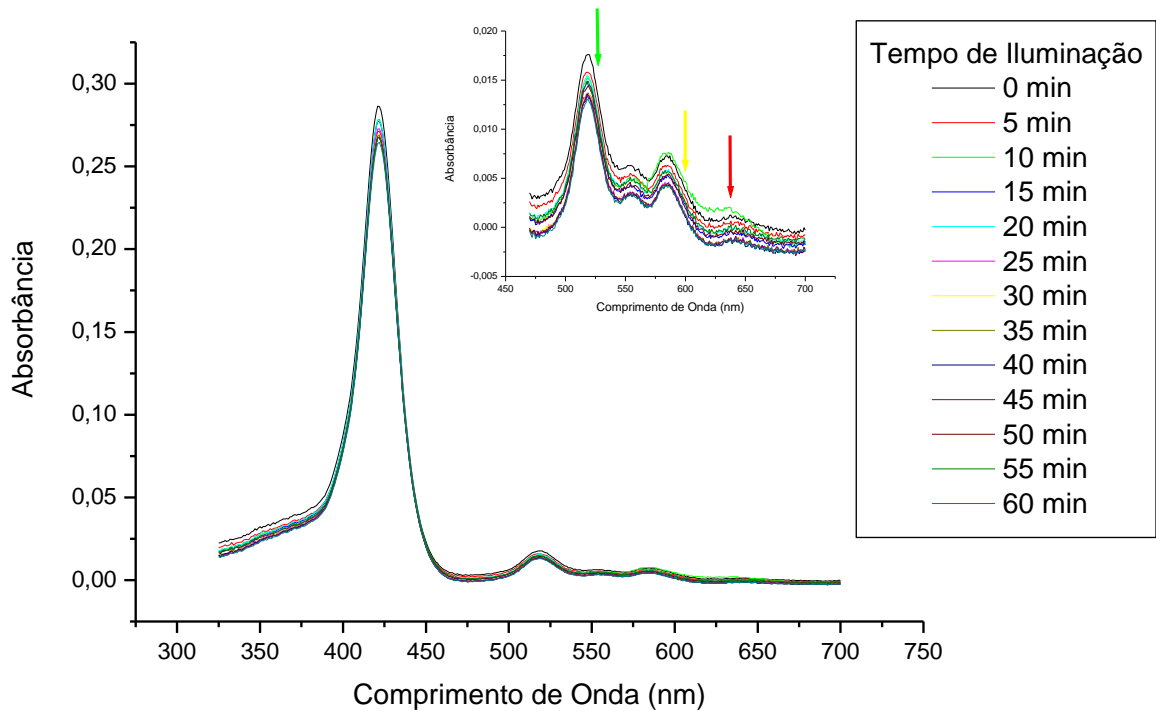


Figura 41- Espectros de absorção de solução contendo $1,78 \mu\text{mol.L}^{-1}$ da porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ durante 60 minutos de iluminação com LED verde. As setas verde, amarela e vermelha, indicando o $\lambda_{\text{máx}}$ de emissão de cada sistema de LED utilizado.

4.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE UTILIZANDO TESTE DO ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico (AU), por ser um excelente captador de oxigênio singlete, é utilizado em diversos trabalhos na literatura, como dosímetro para determinação quantitativa da ação fotodinâmica. O AU apresenta uma banda de absorção com máximo em 293 nm, o que não interfere na interação da luz com o FS nos experimentos de determinação do coeficiente de atividade fotodinâmica. A determinação da atividade fotodinâmica ocorre a partir da iluminação com uma fonte

de LED de diferentes faixas de comprimentos de onda (vermelho, alaranjado e verde), e da realização de medidas espectroscópicas da solução na faixa de 200 a 700 nm, a cada três minutos.

Os espectros de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ após a irradiação por 30 minutos com LED de diferentes cores e em presença de AU, não apresentaram diminuição na banda *Soret* ou bandas Q, nem a degradação específica de ácido úrico (Figura 42), que é caracterizada pela diminuição na banda de 293 nm.

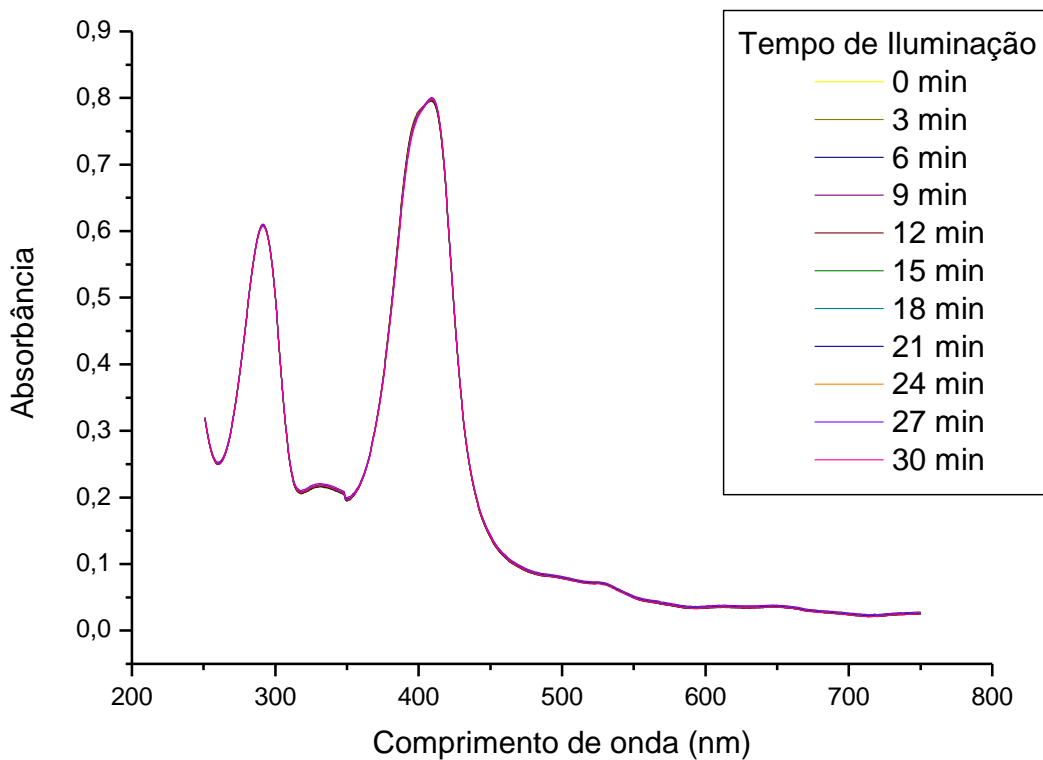


Figura 42- Espectros de absorção de 200 a 700 nm, contendo solução de ácido úrico $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, e solução de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, iluminado com LED verde.

Mendes realizou testes para a determinação da atividade fotodinâmica através do teste do ácido úrico, com LED vermelho, para a porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, após irradiação de 30 minutos (MENDES, 2008). Neste trabalho, realizou-se os testes para esta porfirina com LED alaranjado e verde.

A porfirina [$H_2(TMPyP)$] demonstrou decaimento em suas bandas de absorção em especial na banda *Soret* (5,7% com LED alaranjado e 10,9% com LED verde). Isso demonstra que nesse meio, é possível que parte do oxigênio singlete gerado tenha sido consumido no fotobranqueamento da porfirina, em vez de ter sido capturado pelo ácido úrico. No entanto, ao observar a primeira e a segunda banda de ácido úrico (Figura 43), presentes em 290 e 233 nm, nota-se redução da absorbância (3,9% e 1,2% com LED alaranjado, 51,4% e 27,3% com LED verde) o que leva a concluir que as moléculas de ácido úrico também sofreram degradação durante o período de iluminação, e que essa mudança pode estar relacionada com a ação do oxigênio singlete.

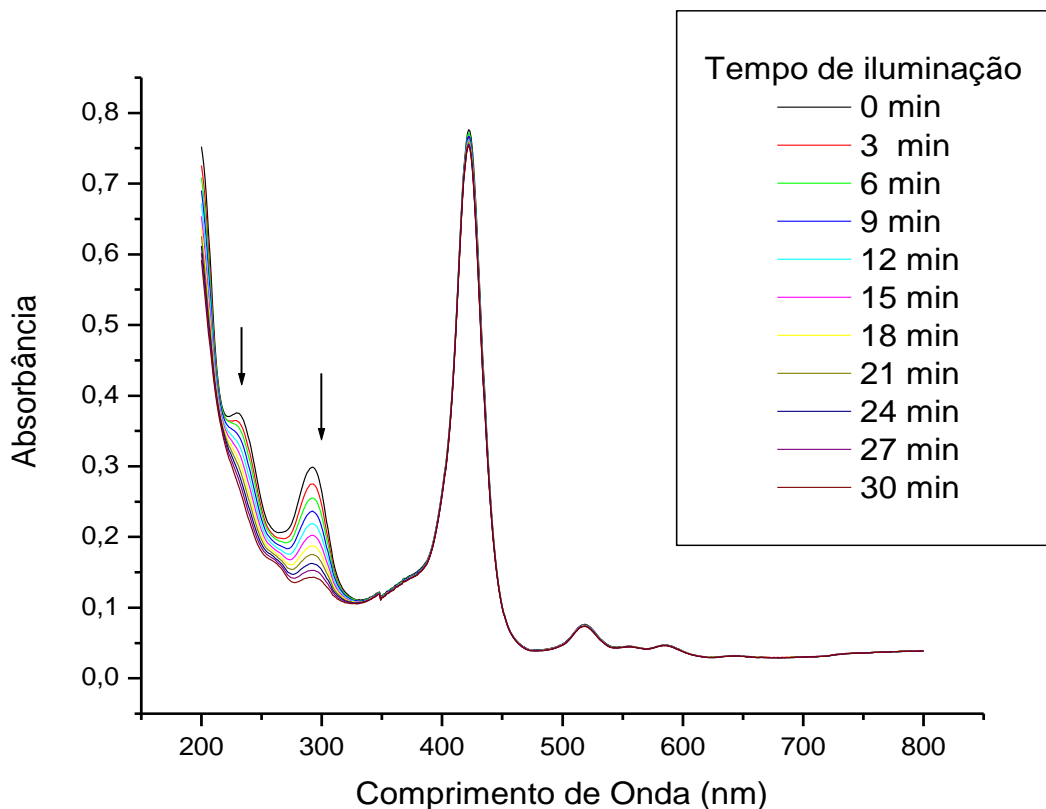


Figura 43- Espectros de absorção de 200 a 700 nm, de solução contendo ácido úrico $1,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹, e solução de [$H_2(TMPyP)$] em $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, iluminado com LED verde.

Embora, uma nova equação, para cálculo da AU, tenha sido proposta para a determinação da atividade fotodinâmica (PELLOSI et al., 2008), neste trabalho, optou-se por utilizar a equação 16, para fim de comparação com outros trabalhos (SOARES, 2006; MENDES, 2008; SILVA, 2009) realizados de forma similar. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 3, onde percebe-se uma baixa AF para a porfirina [Fe(TPPS₄)]Cl com todos os LED utilizados, e, para a porfirina [H₂(TMPyP)] observa-se uma AF alta com LED vermelho e verde.

Tabela 3- Valores médios de algumas grandezas, obtidas através dos espectros do teste do AU para os compostos [Fe(TPPS₄)]Cl e [H₂(TMPyP)].

Composto	LED	$\Delta A_{A.U.}$	t(s)	AF
[Fe(TPPS ₄)]Cl	Vermelho	0,0063	1800	0,28
	Alaranjado	0,0097	1800	0,40
	Verde	0,0139	1800	0,33
[H ₂ (TMPyP)]	Vermelho*	0,0460*	1800	3,09*
	Alaranjado	0,0242	1800	2,17
	Verde	0,1530	1800	4,66

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

4.6 TESTE DE TOXICIDADE SOBRE A *Artêmia salina* (TAS)

O método padrão deste bioensaio consiste na contagem dos microcrustáceos vivos, após terem sido expostos ao FS e a uma hora de iluminação

com LED vermelho, alaranjado ou verde, a contagem foi realizada duas horas após a iluminação.

Os resultados dos testes com a *Artêmia salina* nos quais foi empregada a porfirina [Fe(TPPS₄)]Cl, estão mostrados no gráfico da Figura 44, que expressa a média dos valores obtidos dos testes em triplicata. As concentrações utilizadas foram de 10, 7,0 e 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em meio salino. Para controle utilizaram-se tubos com o composto, sem iluminação (branco).

Assim para a ação fotodinâmica, não foi possível verificar uma diferença significativa entre os tubos que receberam a iluminação e os que não receberam.

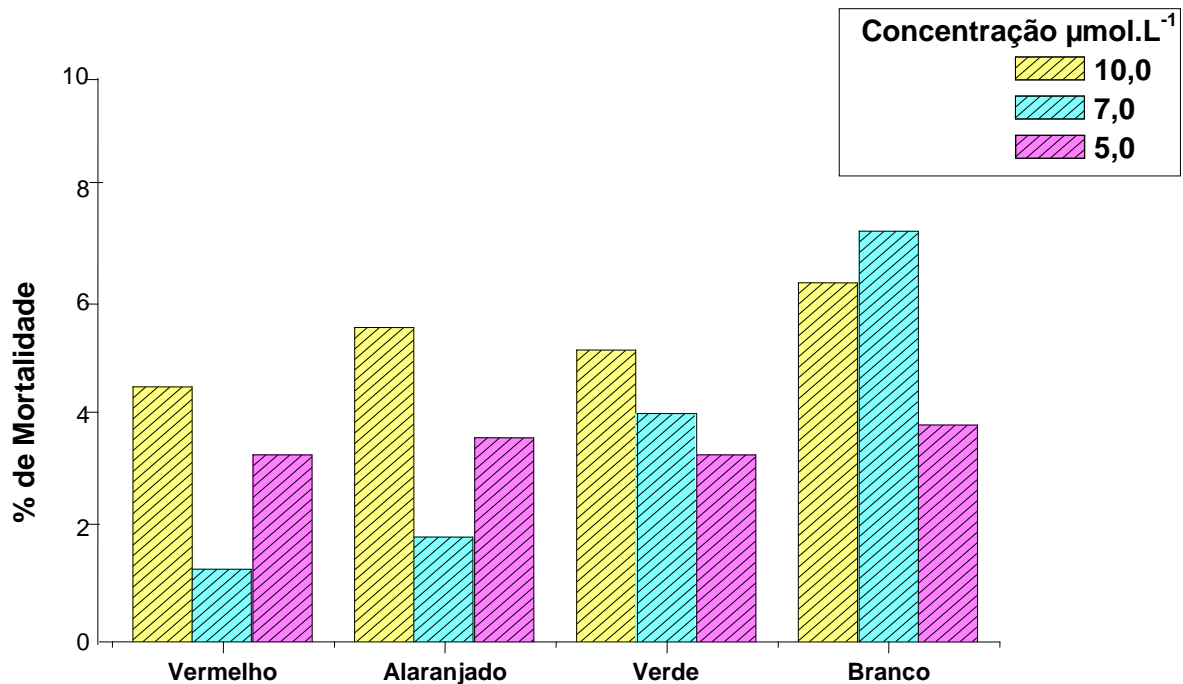


Figura 44- Percentual de mortalidade de [Fe(TPPS₄)]Cl frente a *Artêmia salina* com iluminação (LED verde, alaranjado e vermelho), e sem iluminação.

Como mostra o gráfico (Figura 44), a metaloporfirina não se mostrou capaz de causar a morte dos microcrustáceos de *Artêmia salina*. Os dados não mostraram uma correlação linear com a concentração de porfirina e não se pode afirmar que a mortalidade tenha sido maior sob iluminação do que sem iluminação. Esses resultados, somados à baixa variação das bandas de ácido úrico, sugerem que o

oxigênio singlete não está sendo gerado pela porfirina $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$, o que provoca baixa atividade fotodinâmica da mesma.

4.7 TESTE DE TOXICIDADE SOBRE MICRO-ORGANISMOS: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*

A susceptibilidade das cepas estudadas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) ao processo fototerapêutico, foi avaliada por meio da exposição das suspensões de micro-organismos à concentração dos compostos estudados, $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ e $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, equivalente a $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e utilizando-se dois tempos de iluminação (10 e 30 minutos) com os LED vermelho, alaranjado e verde.

Para análises das variantes utilizadas neste trabalho, adotaram-se três situações comparativas como padrões, sendo: a) tubos contendo somente iluminação sem porfirina (L+P-) a fim de verificar a ação da luz sobre os micro-organismos; b) tubos contendo compostos FS ($5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e ausência de iluminação (L-P+) com o intuito de avaliar se a presença dos compostos FS causa algum efeito tóxico sobre as suspensões bacterianas; c) tubos com ausência de iluminação e de FS (L-P-) utilizadas como controle geral para verificar provável crescimento bacteriano e a confiabilidade do estudo. Aos demais tubos, adicionou-se os compostos ($5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e iluminação (L+P+) com as variantes (tempo e luz) necessárias ao estudo.

Para cada experimento foram preparados dois tubos (duplicata) e, para cada tubo foram preparadas três placas. Assim as médias encontradas referem-se a dados obtidos em 6 placas. A eficiência do FS foi avaliada com base na determinação do número de unidades formadoras de colônias viáveis (UFC) por mililitro. Foi estabelecido que a contagem das colônias estivesse limitada ao valor de $2800 \times 10^2 \text{ UFC.mL}^{-1}$. As placas que apresentaram unidades formadoras de colônias com valor maior que o estabelecido foram denominadas “incontáveis”.

4.7.1 *Escherichia coli*

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentados os resultados obtidos para os diferentes grupos experimentais estudados para *Escherichia coli* (UFC.mL⁻¹ x 10²), com os compostos [Fe(TPPS₄)]Cl e [H₂(TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L⁻¹, com luz vermelha, alaranjada e verde sob os tempos de iluminação respectivos a 10 e 30 minutos.

As quatro primeiras linhas das Tabelas 4 e 5 representam os padrões utilizados. Para o padrão geral (L-P-) e para o padrão sem iluminação e com derivados porfirínicos (L-P+), as UFC.mL⁻¹ apresentaram-se “incontáveis” para ambos os compostos, isto é, houve um grande crescimento bacteriano. O mesmo foi observado para a metaloporfirina [Fe(TPPS₄)]Cl em relação aos padrões, sem FS mas com iluminação (L+P-) de 10 minutos, e de 30 minutos com LED vermelho e alaranjado. Já em relação à porfirina [H₂(TMPyP)], pode-se observar a condição “incontável” para o padrão (L+P-) de 10 minutos com LED vermelho e alaranjado.

Tabela 4- Efeito dos diferentes grupos experimentais em *Escherichia coli* (UFC.mL⁻¹x10²), para o composto [Fe(TPPS₄)]Cl na concentração 5,0 µmol.L⁻¹ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.

Experimento	Tempo (min)	Sem Luz	LED vermelho	LED alaranjado	LED verde
L-P-	0	Incontável			
L-P+	0	Incontável			
L+P-	10		Incontável	Incontável	Incontável
L+P-	30		Incontável	Incontável	Incontável
L+P+	10		Incontável	Incontável	Incontável
L+P+	30		2493	Incontável	2537

Tabela 5- Efeito dos diferentes grupos experimentais em *Escherichia coli* (UFC.mL.⁻¹x10²), para a porfirina [H₂(TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L⁻¹ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.

Experimento	Tempo (min)	Sem Luz	LED Vermelho	LED alaranjado	LED verde
L-P-	0	Incontável			
L-P+	0	Incontável			
L+P-	10		Incontável	Incontável	Incontável
L+P-	30		Incontável	Incontável	Incontável
L+P+	10		954	1286	1145
L+P+	30		744	1024	912

Analisando os resultados obtidos para os grupos L+P+ observou-se um pequeno efeito fotodinâmico para a metaloporfirina [Fe(TPPS₄)]Cl com uso de LED verde, e vermelho com 30 min de iluminação, Figura 45, o que já era esperado frente ao baixo valor de AF encontrado. Em geral, porfirinas aniônicas exibem uma baixa atividade na fotoinativação de bactérias Gram-negativas, devido à sua superfície externa apresentar-se carregada negativamente (devido às cargas negativas dos lipopolissacarídeos). Essa resistência pode ser superada pelo uso de conjugados de FS com polímeros catiônicos ou por co-administração de peptídeos permeabilizantes.

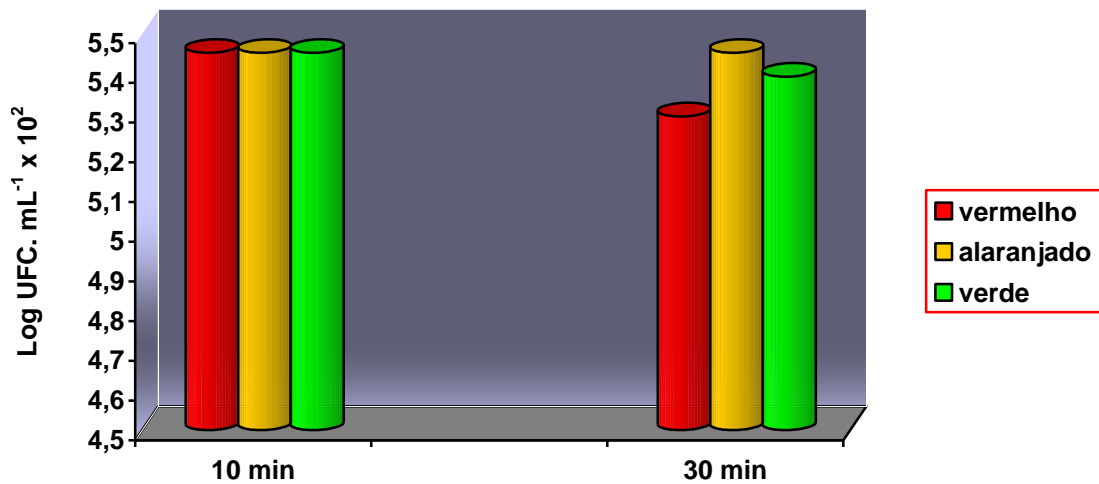


Figura 45- Efeito da porfirina $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ frente *Escherichia coli*, sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.

Fotossensibilizadores positivamente carregados são geralmente mais eficientes em bactérias e agem em concentrações menores que as moléculas de FS neutras e aniônicas (PERUSSI, 2007). Esse fato pode ser observado na Tabela 5 e Figura 46, para a porfirina catiônica $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, que apresenta maior AF, e resultados favoráveis a TFD, com redução nas UFC.mL^{-1} para iluminação com luz vermelha (mais eficaz), alaranjada e verde, sendo o efeito mais acentuado quanto maior o tempo de iluminação.

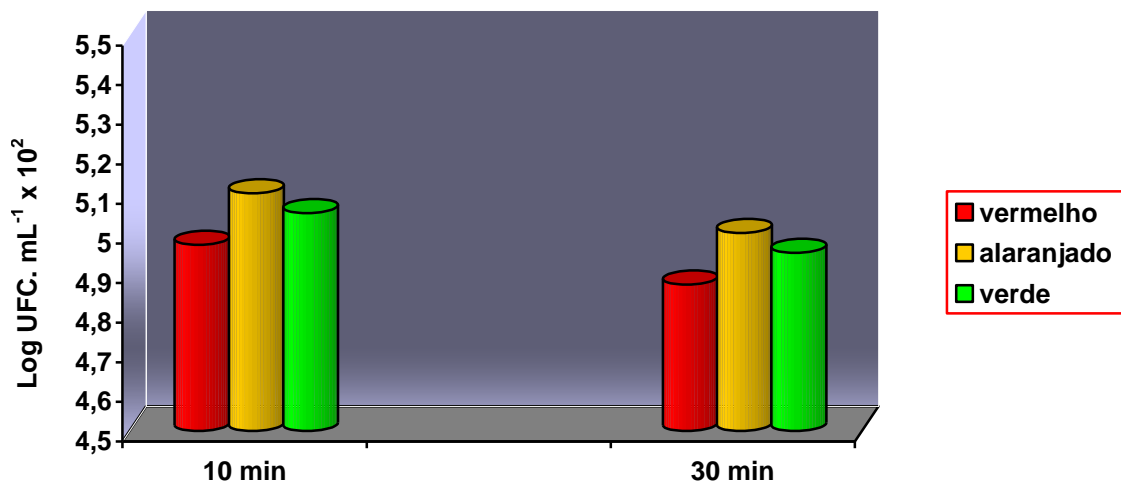


Figura 46- Efeito da porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ frente *Escherichia coli*, sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.

Dentre as características mais importantes para a estrutura molecular dos FS e sua ação em TFD estão uma combinação de grupamentos catiônicos e solubilidade em água. A carga catiônica é ainda mais importante no caso das bactérias Gram-negativas que possuem uma estrutura de membrana dupla, e que exclui muitas estruturas aniônicas e moléculas lipofílicas (HAMBLIN, HASAN, 2004). O resultado obtido em relação ao tempo de iluminação foi o esperado, uma vez que se acredita que a inativação fotodinâmica seja mais eficaz se fizermos o uso de um período de tempo maior de irradiação, para assim, a associação de luz e porfirinas apresentar resultados satisfatórios.

A Figura 47 mostra o efeito fotodinâmico (bacteriostático) da porfirina [H₂(TMPyP)] na inibição da reprodução celular da *Escherichia coli*, quando foi utilizado o LED vermelho e o tempo de 30 minutos apresentando o menor número de colônias.

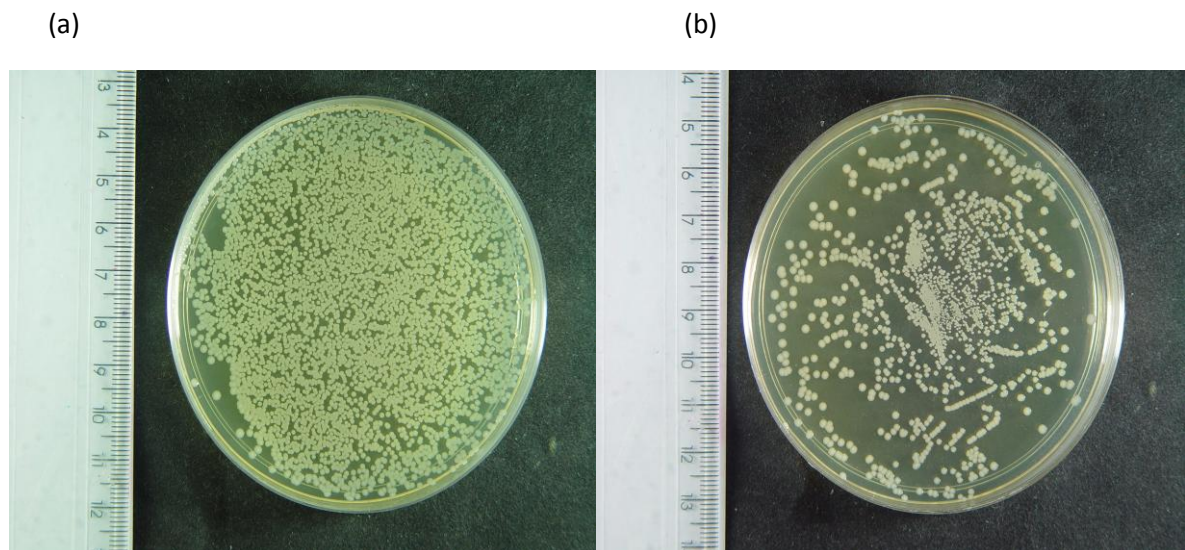


Figura 47- Unidades formadoras de colônias de *Escherichia coli* (a) na ausência de luz e de porfirina (L-P-); (b) na presença da porfirina [H₂(TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L⁻¹, iluminada com LED vermelho 30 minutos (L+P+).

A carga positiva do fármaco fotossensível favorece a forte interação eletrostática com os sítios negativamente carregados da superfície da célula bacteriana, aumentando a eficiência do processo fotodinâmico (CAMINOS, DURANTINI, 2006). Este fato, associado a AF encontrada neste estudo, mostra que

a porfirina catiônica é um fotossensibilizador eficaz para inativar células de *Escherichia coli* utilizando-se TFD.

Os resultados obtidos foram comparados com a bibliografia (MENDES, 2008), em que a porfirina [H₂(TMPyP)] com iluminação com LED vermelho apresentou melhores resultados frente à bactéria *Escherichia coli*, quando comparada à metaloporfirina [Zn(TPPS₄)]Cl.

4.7.2 *Staphylococcus aureus*

Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2007). Esse fato justifica a realização de experimentos, buscando formas alternativas de combatê-la.

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido historicamente utilizada como um meio para o tratamento de tumores cancerosos, mas foi recentemente utilizada para matar as células bacterianas através do uso de fotossensibilizadores alvo. Os testes com a bactéria *Staphylococcus aureus*, têm apresentado resultados positivos na presença de diversas porfirinas e clorinas (ROVALDI et al., 2000), o mesmo pode-se observar com a análise dos resultados obtidos por este trabalho, principalmente com aqueles obtidos com a porfirina [H₂(TMPyP)].

As Tabelas 6 e 7 apresentam a média para os valores obtidos em cada experimento (variante tempo e luz), com os compostos [Fe(TPPS₄)]Cl e [H₂(TMPyP)], ambas na concentração 5,0 µmol.L⁻¹.

Tabela 6- Efeito dos diferentes grupos experimentais em *Staphylococcus aureus* (UFC.mL⁻¹ x 10²), para a porfirina [Fe(TPPS₄)]Cl na concentração 5,0 µmol.L⁻¹ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.

Experimento	Tempo (min)	Sem Luz	LED vermelho	LED alaranjado	LED verde
L-P-	0	Incontável			
L-P+	0	Incontável			
L+P-	10		Incontável	Incontável	Incontável
L+P-	30		Incontável	Incontável	Incontável
L+P+	10		Incontável	Incontável	1966
L+P+	30		1854	1948	1723

Tabela 7- Efeito dos diferentes grupos experimentais em *Staphylococcus aureus* (UFC.mL⁻¹ x 10²), para a porfirina [H₂(TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L⁻¹ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.

Experimento	Tempo (min)	Sem Luz	LED vermelho	LED alaranjado	LED verde
L-P-	0	Incontável			
L-P+	0	Incontável			
L+P-	10		Incontável	Incontável	Incontável
L+P-	30		Incontável	Incontável	Incontável
L+P+	10		1376	1504	1667
L+P+	30		928	1137	1321

Em relação aos padrões utilizados, pode-se observar que a ausência de luz e presença de porfirina (L-P+), não se observou redução do crescimento bacteriano, o que demonstra a importância da luz para ativação do FS.

Para a metaloporfirina [Fe(TPPS₄)]Cl, observou-se que houve diminuição no número de UFC.mL⁻¹ x 10² de *Staphylococcus aureus*, tendo sido observado maior

efeito fotodinâmico, embora baixo, com 30 minutos de iluminação (Figura 48). Já em relação à fonte de luz, a utilização de LED vermelho e alaranjado não apresentou diferenças significativas entre si, enquanto a fonte LED verde, em ambos os tempos de iluminação, apresentou uma maior diminuição do número de UFC.mL⁻¹.

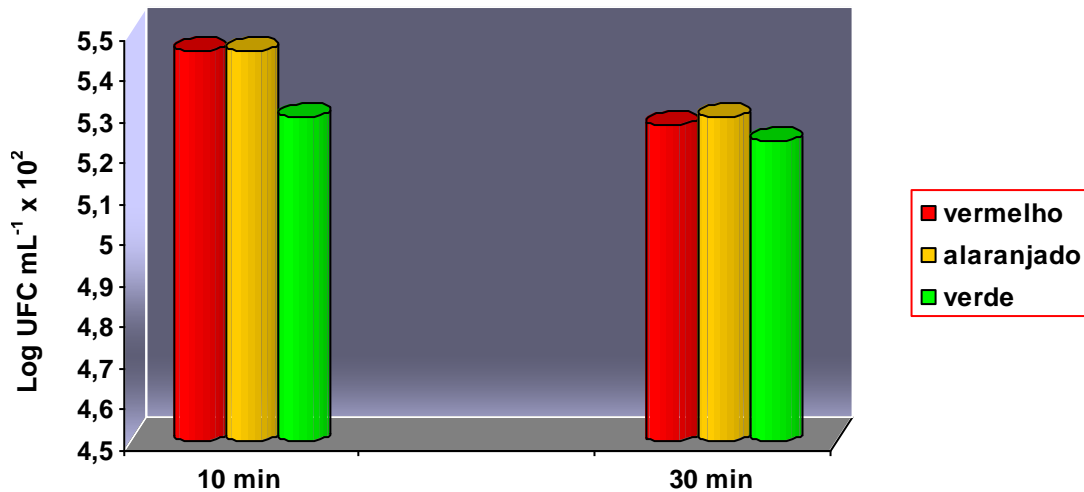


Figura 48- Efeito de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ frente *Staphylococcus aureus*, sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.

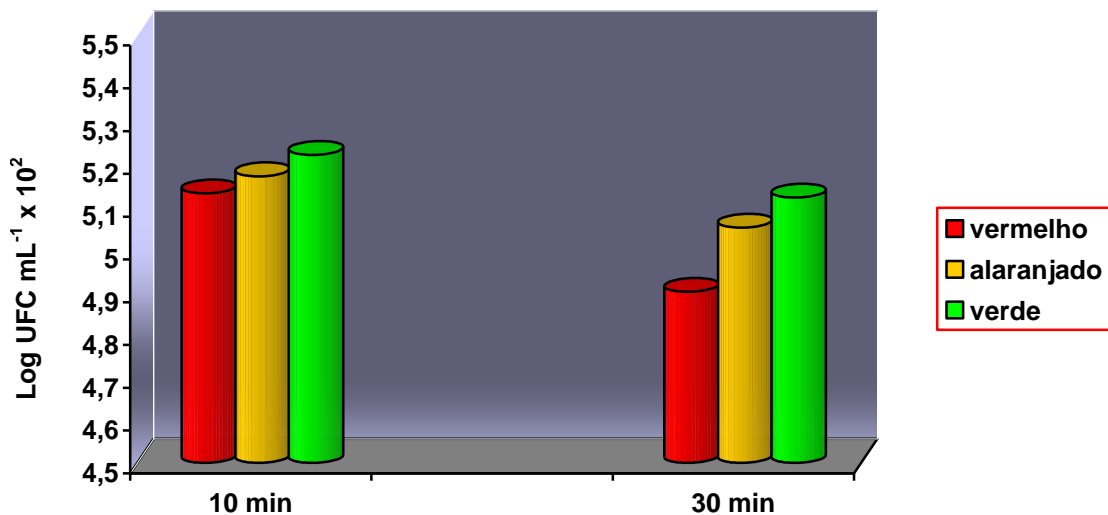


Figura 49- Efeito da porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ frente *Staphylococcus aureus*, sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.

A representação gráfica dos resultados referentes a porfirina [$H_2(TMPyP)$] frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (Figura 49), mostra um maior efeito fotodinâmico em ambas as faixas de emissão de luz, comparando com a porfirina [$Fe(TPPS_4)Cl$], sendo que o LED vermelho apresentou um efeito mais acentuado. Também foi observado aumento do efeito fotodinâmico com o aumento da iluminação (tempo 30 minutos), para todas as fontes de luz.

O efeito fotodinâmico pode ser observado na Figura 50, onde se compara o controle sem iluminação e com porfirina (L-P+) com o grupo iluminação vermelha por 30 minutos, na presença da porfirina [$H_2(TMPyP)$] na concentração $5,0 \mu mol.L^{-1}$ (L+P+). Os resultados obtidos com a porfirina [$H_2(TMPyP)$] apresentando um efeito fotodinâmico mais acentuado que a porfirina [$Fe(TPPS_4)Cl$] estão relacionados aos resultados obtidos em relação a AF, e que se confirmam pela presença de grupos carregados positivamente na estrutura da porfirina que é fundamental para a atividade antibacteriana.

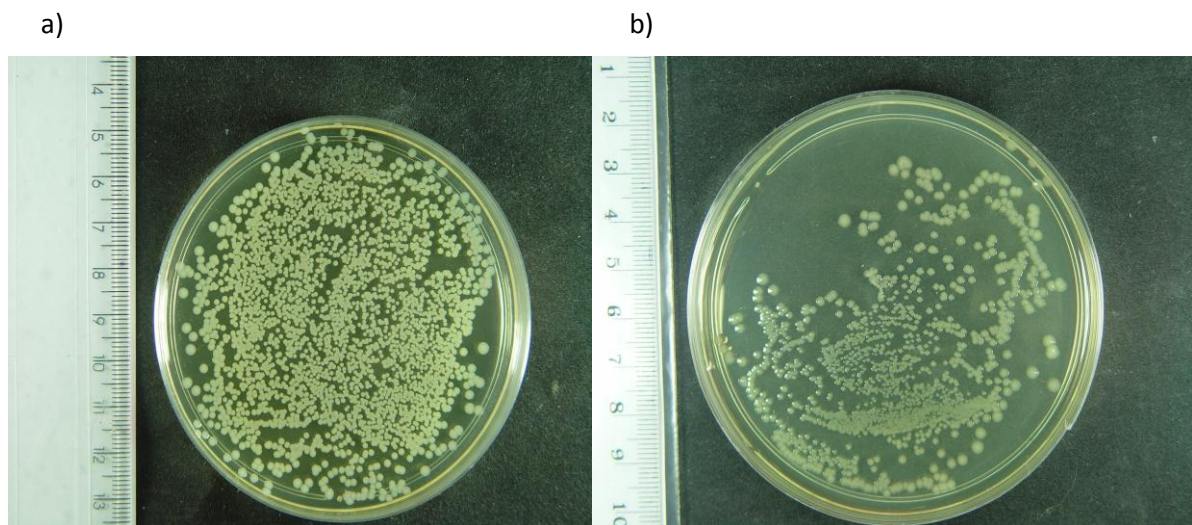


Figura 50- Unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus aureus* em presença de porfirina [$H_2(TMPyP)$] na concentração $5,0 \mu mol.L^{-1}$ (a) Controle ausência de luz (L-P+) (b). iluminada com LED vermelho durante 30 minutos (L+P+).

Neste trabalho, o tempo de iluminação de 30 minutos foi mais eficiente do que o tempo de 10 minutos, na inativação de micro-organismos. Outros estudos utilizaram tempo de iluminação de 270 minutos pode-se observar que, além da ação fotodinâmica eficiente, demonstrou-se também, que os micro-organismos foram

incapazes de recuperar atividade metabólica, o que comprova a relativa ausência de mecanismos de resistência após a iluminação (ALVES et al., 2009). Este fato justifica este trabalho, considerando a grande resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos atuais, encontrados no mercado.

4.7.3 *Candida albicans*

Para avaliar a atividade fotodinâmica dos compostos $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ e $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ na inativação de micro-organismos, realizou-se também, testes com a levedura *Candida albicans*, utilizando-se os mesmos sistemas de iluminação utilizados para os experimentos com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Nas Tabelas 8 e 9, são apresentadas as médias dos resultados dos experimentos realizados com os compostos $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ e $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, respectivamente, nos quais se comparam os efeitos com os LED vermelho e alaranjado e verde, numa mesma concentração de porfirina.

Tabela 8- Efeito dos diferentes grupos experimentais em *Candida albicans* ($\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1} \times 10^2$), para a porfirina $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ na concentração $5,0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.

Experimento	Tempo (min)	Sem Luz	LED vermelho	LED alaranjado	LED verde
L-P-	0	Incontável			
L-P+	0	Incontável			
L+P-	10		Incontável	Incontável	Incontável
L+P-	30		Incontável	Incontável	Incontável
L+P+	10		1573	2221	1845
L+P+	30		1023	1659	1424

Tabela 9- Efeito dos diferentes grupos experimentais em *Candida albicans* (UFC.mL⁻¹ x 10²), para a porfirina [H₂(TMPyP)] na concentração 5,0 µmol.L⁻¹ com luz vermelha, alaranjada e verde sob diferentes tempos de iluminação.

Experimento	Tempo (min)	Sem Luz	LED vermelho	LED alaranjado	LED verde
L-P-	0	Incontável			
L-P+	0	Incontável			
L+P-	10		Incontável	Incontável	Incontável
L+P-	30		Incontável	Incontável	Incontável
L+P+	10		1057	1346	1144
L+P+	30		738	1021	892

Analisando as Tabelas, pode-se verificar que, na presença dos dois compostos FS utilizados, na concentração de 5,0 µmol.L⁻¹ e iluminação, houve inibição no crescimento da levedura, quando comparado com os controles para os três tipos de LED utilizados. Houve maior inibição do crescimento das leveduras, quando a amostra foi submetida a luz vermelha, e sob o tempo de iluminação de 30 minutos (Figuras 51 e 52).

A ação antifúngica provocada pelas porfirinas pode ser nitidamente observada através da redução de UFC.mL⁻¹, sendo mais acentuada no experimento com a porfirina [H₂(TMPyP)] do que com a porfirina [Fe(TPPS₄)]Cl, e que demonstra o efeito fotodinâmico exercida pelas mesmas.

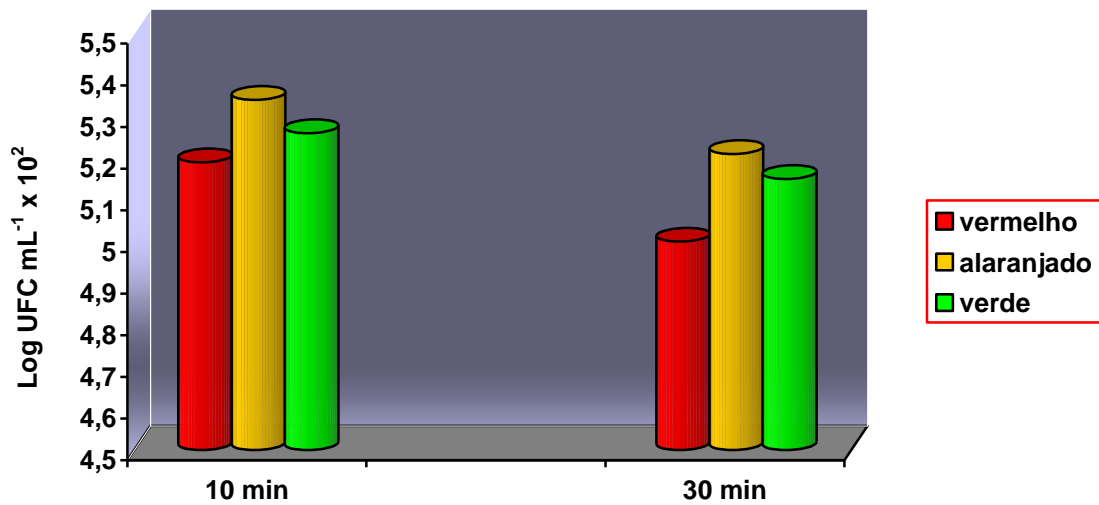


Figura 51- Efeito de $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ frente *Candida albicans*, sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.

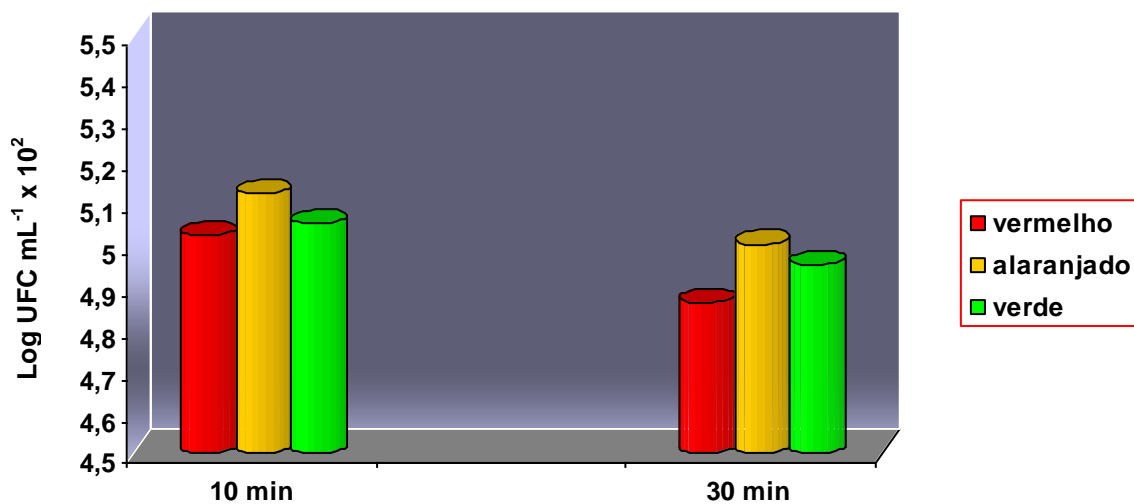


Figura 52- Efeito da porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ frente *Candida albicans*, sob tempo de 10 e 30 minutos e sob iluminação vermelha, alaranjada e verde.

Na Figura 53, compara-se a redução de UFC.mL^{-1} em relação ao controle ausência de luz e de porfirina (L-P-) em presença de porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$ na concentração $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ iluminada com LED vermelho durante 30 minutos (L+P+). O LED vermelho apresentou maior eficiência fotodinâmica, fator que está relacionado com a AF, e pode estar relacionado com o fato do FS ser catiônico.

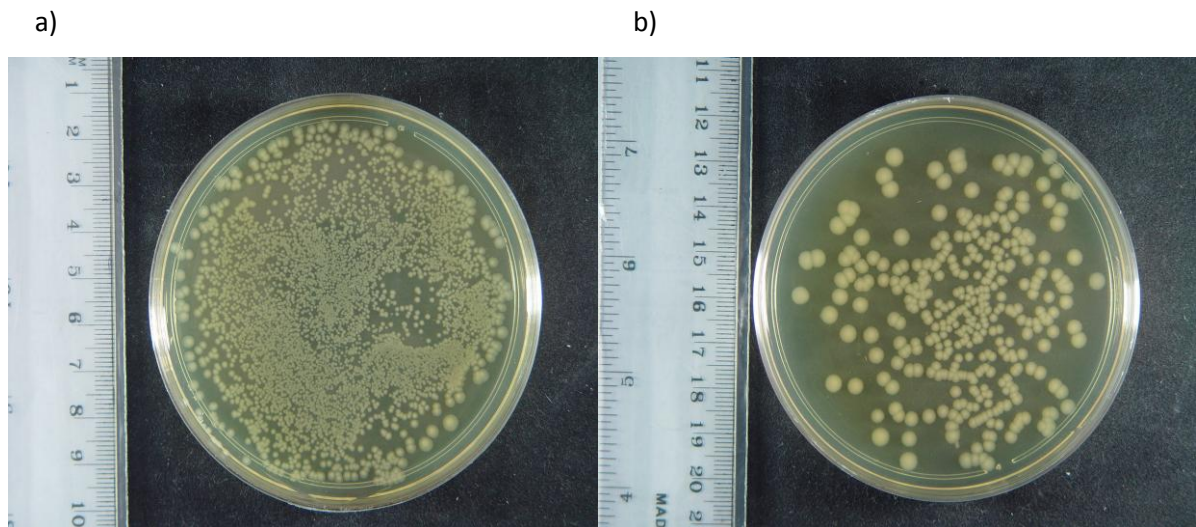


Figura 53- Unidades formadoras de colônias de *Candida albicans* (a) Controle ausência de luz e de porfirina (L-P-) (b).em presença de porfirina [H₂(TMPyP)] na concentração 5,0 μmol.L⁻¹ iluminada com LED vermelho durante 30 minutos (L+P+).

Em todos os experimentos realizados com os micro-organismos em análise, foi com o tempo de iluminação de 30 minutos que obteve-se um melhor efeito fotodinâmico. Para tanto, espera-se que o corante una-se ao micro-organismo ou mesmo chegue a ultrapassar a barreira da membrana celular, localizando-se no citoplasma da célula ou mesmo intercalando-se com o DNA.

Os tempos de irradiação típicos utilizados em TFD antimicrobiana vão de um a dez minutos (ALVES et al., 2009). Deve-se levar em consideração que a interação do FS com o substrato, muitas vezes é um ponto crítico para a eficiência fotodinâmica, necessitando de um maior tempo para que a ativação pela fonte de energia possa ocorrer.

5 CONCLUSÃO

Os resultados da avaliação do comportamento espectral da metaloporfirina aniônica $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ sob variação de pH, em água, e em etanol indicam a formação de agregados em solução aquosa com pH acima de 7,0. A presença de micelas de CTAB influencia na formação desses agregados.

A $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ não apresentou reações de fotobranqueamento significativas com os sistemas de iluminação utilizados. O ácido úrico foi utilizado como dosímetro químico de modo a permitir uma avaliação da geração de oxigênio singlete, tendo sido baixos valores de atividade fotodinâmica para os sistemas de iluminação e concentração testados.

Através da análise dos dados nos teste com *Artêmia salina*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* conclui-se que o composto $[\text{Fe}(\text{TPPS}_4)]\text{Cl}$ apresentou baixa atividade fotodinâmica nas condições de iluminação e concentração utilizadas. Os resultados para os testes com *Candida albicans* indicaram maior inativação.

As análises realizadas neste trabalho com a porfirina $[\text{H}_2(\text{TMPyP})]$, demonstram que a mesma tem potencial para ser utilizada em TFD, uma vez que apresentou atividade fotodinâmica satisfatória, e uma inibição significativa nas UFCs, frente aos micro-organismos estudados, principalmente, quando se fez uso de LED vermelho e tempo de iluminação de 30 minutos.

REFERÊNCIAS

ALBERTI, G. M. U. **Síntese, Caracterização, Estudo da Imobilização em Sílica obtida pelo processo Sol-Gel e Investigação Catalítica de Metaloporfirinas**. 2009, 76.p. Dissertação (Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

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

ANDRADE, S. M.; COSTA, S. M. B. Aggregation Kinetics of *Meso*-tetrakis(4-sulfonatophenyl) Porphine in the Presence of Proteins: Temperature and Ionic Strength Effects. **Journal of Fluorescence**, v.12, n.1, p.77-82, 2002.

ARAÚJO, F. R. P. **A sustentabilidade da exploração da artemia (*Artemia sp*): O caso do município de Grossos-RN**. Mossoró, 2002. Disponível em: <<http://monografias.com.br/trabalhos/exploracao-artemia/exploracaoartemia4.shtml>>. Acesso em 10 jun. 2010.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química: questionando a vida moderna**. 3.ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 965p.

BARBOSA, T. P.; JÚNIOR, C. G. L.; SILVA, F. P. L.; SOUSA, S. C. R.; VASCONCELOS, M. L. A. A. Síntese e Avaliação da Atividade Tóxica em *Artêmia salina* Leach de Adutos de Morita-Baylis Hillman. In: SBQ 2006 – Química é Energia – Transforme a Vida e Preserve o Ambiente. Águas de Lindóia. **Anais do 29º SBQ**. Águas de Lindóia, 2006.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v.43, n.2,

p.167-179, 2007.

BONACIN, J. A.; ENGELMANN, F. M.; SEVERINO, D.; TOMA, H. E.; BAPTISTA, M. S. Singlet Oxygen Quantum Yields (ϕ_D) in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs **Journal Brazilian Chemistry Society**, v. 20, p. 31-36, 2009.

BORISSEVICH, I. E.; GANDINI, S. C. M. Photophysical studies of excited state characteristics of *meso*-tetrakis(4-*N*-methyl-pyridinium) porphyrin bound to DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, v. 43, p.112-120, 1998.

BORISSEVITCH, I. E.; SCHABERLE, F. A.; KUZMIN, V. A. .Spectroscopic studies of interaction of cyanine dye with two chromophores with DNA. Effects of ionic strength. **Biochimica et Biophysica Acta. G**, General Subjects, v.1621/2, p.183-191, 2003.

CALZAVARA-PINTON, P. G; VENTURINI, M; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results. **Journal European academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, p.439-451, 2007a.

CAMINOS, D. A; DURANTINI, E. N. A Simple Experiment to Show Photodynamic Inactivation of Bacteria on Surfaces. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 35, n.1, p.64–69, 2007.

CASTRO-E-SILVA, T.; CASTRO-E-SILVA, O. Jr.; ZUCOLOTO, S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; BAGNATO, V. S. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondrial function and liver regeneration of partially hepatectomized rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.1065-1069, 2007.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-Triazinas substituídas e Avaliação da Toxicidade frente à *Artêmia salina leach*. **Química Nova**, v.23. p.20-22, 2000.

DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. Tradução de Yara M. Michelacci. 5 ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher. 2003. 1084p.

DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G.; XIE, L. Y. Polyhaloporphyrins: Unusual Ligands for Metals and Metal-Catalyzed Oxidations. **Acc. Chemistry. Res.**, v. 30, p. 251-259, 1997.

DOVIGO, L. N.; PAVARINA, A. C.; RIBEIRO, D. G.; ADRIANO, C. S.; BAGNATO, V. S. Photodynamic Inactivation of four *Candida* Species Induced by Photogem® **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41: p.42-49, 2010.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Assistência Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997

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

GOUTERMANN, M. Spectro of Porphyrins. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v.6., p.138-163, 1961.

HALMA, M; CASTRO, K. A. D. F; GUEHO, C. T; PRÉVOT, V; FORANO, C; WYPYCH, F; NAKAGAKI, S. Synthesis, Characterization and Catalytic Activity of Anionic Iron (III) Porphyrins Intercalated into Layered Double Hydroxides. **Journal of Catalysis**, v. 257, n.2, p.233-243, 2008.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. **Photochem. Photobiology Science**, v.3, p.436-450, 2004.

HILF, R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. **Journal Bioenergetic Biomembrane**, v.39, p.85–89, 2007.

HOPPER, C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. **Lancet Oncology**, n.1, p.212-219, 2000

KELBAUSKAS, L.; BAGDONAS, S.; DIETEL, W.; ROTOMSKIS, R. Excitation relaxation and structure of TPPS₄ J-aggregates. **Journal of Luminescence**, v.101, p.253–262, 2003.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução de Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto Navega Lodi. 4.ed. São Paulo: Sarvier. 2005.1342 p.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Química Nova**, v.23, n.2, p.236-243, 2000.

MAESTRIN, A. P. J.; RIBEIRO, A. O.; TEDESCO, A. C.; NERI, C. R.; VINHADO, F. S.; SERRA, O. A.; MARTINS, P. R.; IAMAMOTO, Y., SILVA, A. M. G.; TOMÉ, A. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. A Novel Chlorin Derivative of *Meso*-tris(pentafluorophenyl)-4-pyridylporphyrin: Synthesis, Photophysics and Photochemical Properties **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.15, n.6, p.923-930, 2004.

MAESTRIN, A. P. J; TEDESCO, A. C; NERI, C. R; GANDINI, M. E. F; SERRA, O. A; IAMAMOTO, Y. Synthesis, Spectroscopy and Photosensitizing Properties of Hydroxynitrophenylporphyrins. **Journal Brazilian Chemistry Society**, v.15, n.5, p.708-713, 2004.

MENDES, M. C. **Estudo das Propriedades das Porfirinas TMPyP e ZnTPPS₄ para Potencial Aplicação em Terapia Fotodinâmica**. 2008, 190p. Dissertação (Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

MILGROM, L. R. **The Colours of Life**: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds. 1ed. United States: Oxford University Press. New York. 1997.249 p.

MOREIRA, L. M.; RIBELATTO, J. C.; IMASATO, H. Conformações distorcida e planar do anel porfirínico em complexos e hemoproteínas: propriedades físico-químicas e implicações espectroscópicas. **Química Nova**, v.27, n.6, p.958-963, 2004.

MUSSI, L. **Eficiência Fotodinâmica das Protoporfirinas IX de Magnésio e Zinco**. 2003, 73p. Dissertação (Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

NERI, C. R.; SERRA, O. A.; VINHADO, F. S.; MAESTRIN, A. P. J.; IAMAMOTO, Y.; FERREIRA, A. G. Síntese, caracterização e estudos de transferência de energia do complexo dimérico constituído por Zn e Mn porfirina . **Eclética Química**, v.27, p.00-00, 2002.

NEVRELOVA, P; KOLAROVA, H; BAJGAR, R; MACECEK, J; TOMECKA, M; TOMANKOVA, K; STRNAD, M. Measurement of Reactive Oxygen Species After Photodynamic Therapy in Vitro. **Scripta Médica**, v. 78, n. 5, p. 281-290, 2005.

OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. Apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how. **Photochem. Photobiology Sciency**. v.1, p1-21, 2002.

PAOLI, V. M. **Terapia fotodinâmica aplicada à erradicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***: avaliação in vitro da eficiência de diferentes fármacos fotossensíveis. 2005, 200p. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2005.

PELEGRINO, A. C.; CAROLINA, M.; GOTARDO, A. F.; SIMIONI, A. R.; ASSIS, M. D.; TEDESCO, A. C. Photophysical properties of crowned porphyrins. **Photochem Photobiology**. v.81, p.771-776, 2005.

PELLOSI, D. S.; BATISTELA, V. R.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N. Proposta metodológica para quantificar atividade fotodinâmica química de fotossensibilizadores irradiados por luz policromática. In: XVI Encontro de Química da Região Sul , 2008, Blumenau –SC. **Resumo**. Blumenau, 2008. Disponível em: <http://www.furb.br/temp_sbqsul/_app/_FILE_RESUMO_CD/207.pdf>. Acesso em 02 fev. 2010.

PEREIRA, M. R. C. **Fotofísica de Porfirinas e Ftalocianinas em Matrizes de TiO₂, preparadas pelo método Sol-Gel**. 2004, 217.p. Tese (Doutoramento em Ciências) – Universidade do Minho, Braga, 2004.

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

PIERRE, M. B. R.; LOPEZ, R. F. V.; BENTLEY, M. V. L.B. Influence of ceramide 2 on *in vitro* skin permeation and retention of 5-ALA and its ester derivatives for Photodynamic Therapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n. 1, p.109-116, 2009.

PORTELA, M. B. **Estudo de Proteínas Funcionais de *Candida spp.* Isoladas da Cavidade Bucal de Crianças Infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Adquirida**. 2006. 191p.Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2006

PREVIDELLO, B. A. F.; CARVALHO, F. R.; TESSARO, A. L.; SOUZA, V. R.; HIOKA, H. O pK_a de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais. **Química Nova**, v. 29, n.3, p.600-606, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829p.

RIBEIRO, J. N.; FLORES, A. V.; MESQUITA, R.; NICOLA, J. H.; NICOLA, E. M. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. **Physicae**, v.5, p.5-14, 2005.

RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A. Análise das propriedades anticancerígenas de Meso-Tetramesitilporfirina empregando métodos espectroscópicos. **Revista Analítica**, abril/maio, n.10, p.43-49, 2004

RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A.; SILVA, A. R. Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy. **Journal Brazilian Pathology Medical Laboratory**, v. 40, n. 6,p. 383-390, 2004.

RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A.; SILVA, A. R.; FLORES, A. V.; RONCHI, L. M.; TEDESCO, A. C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v.32, n.1, p7-14 ,2007.

RONCHI, L. M.; FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; SILVA, A. R.; SENA, G. L.; JORGE, R. A. The Influence of Aggregation and Photobleaching in the Photodynamic Activity of Magnesium Protoporphyrin. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, n.2, p.5-12, 2007.

ROVALDI, C. R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N. A.; FRIDEN, P. M.; ROTHSTEIN, D. M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens in vitro. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.44, p.3364-3367, 2000.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.6, p.413-423, 2007.

SETÚBAL, C. A. **Procura por Novos Fotossensibilizadores para Terapia Fotodinâmica**. 2007, 111p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VANLIER, J. E. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. **Methods in Enzymology**, v.319, p.376-400, 2000.

SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK, N. L.; KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.869-880, 2000.

SILVA, E. R.; SANTOS, E. P.; RICCI Jr, E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p.211-217, 2009.

SILVA, J. A. M. Metabolismo das Porfirinas I - estrutura, biossíntese e regulação **Revista das Ciências Médicas da Universidade de Lourenço Marques**, v. 5, p109-141, 1970.

SILVA, J. D. **Caracterização Espectroscópica e Ensaio Químico – Biológicos de $H_2(TNBPpP)$ e $Zn(TPPS_4)$ Visando Utilização em Terapia Fotodinâmica**. 2009, 123p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1369 p.

SILVA, R. C. **Avaliação de Eficiência Fotodinâmica de Fotossensibilizadores com Aplicação em Terapia Fotodinâmica**. 2007, 71p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2007.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana** - Uma abordagem integrada. 5.ed. São Paulo: Artmed, 2010. 992p.

SIMPLICIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p.801-807, 2002.

SOARES, R. R. S. **Estudo de Propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando Terapia Fotodinâmica**. 2006. 78p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2006.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Editora Arned, 2005. 920 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; MARTINEZ, M. B.; CAMPOS, L. C.; GOMPERTZ, O. F.; RACZ, M. L. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718 p.

TRAYLOR, P. S.; DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G. Sterically Protected Hemins with Electronegative Substituents: Efficient Catalysts for Hydroxylation and Epoxidation. **Journal Chemistry Society.**, v.5, p.279-280, 1984.

VAN NOSTRUM, C. F. Delivery of photosensitizers in photodynamic therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, n.1, p.5-6, 2004.

XIAOPENG, M.; HUIXUAN, P. B.; GAOSONG, W.; ZHIFANG, Y. A.; JILIN, Y. A. Ultrasound may be exploited for the treatment of microbial diseases. **Medical Hypotheses**, v.73, p.18–19, 2009.

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

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](#)