



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**APLICAÇÃO DE ZINCO-PORFIRINA E AZUL DE METILENO EM GEL E
AVALIAÇÃO PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

LUÍZA BEATRIZ DE MEDEIROS SANTOS

RECIFE

2016

LUÍZA BEATRIZ DE MEDEIROS SANTOS

**APLICAÇÃO DE ZINCO-PORFIRINA E AZUL DE METILENO EM GEL E
AVALIAÇÃO PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação de mestrado a ser submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Pernambuco (UFPE) como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Beate Saegesser Santos

Coorientadora: Adriana Fontes

RECIFE

2016

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- S237a Santos, Luíza Beatriz de Medeiros.
Aplicação de zinco-porfirina e azul de metileno em gel e avaliação para uso em terapia fotodinâmica / Luíza Beatriz de Medeiros Santos. – 2016.
69 f. il.; tab.; quad.; 30 cm.
- Orientadora: Beate Saegesser Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências.
1. Fotoquimioterapia. 2. Ferroquelatase. 3. Azul de metileno. 4. Espécies de oxigênio reativas. 5. Gel carbopol. I. Santos, Beate Saegesser (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-063)

LUIZA BEATRIZ DE MEDEIROS SANTOS

**APLICAÇÃO DE ZINCO-PORFIRINA E AZUL DE METILENO EM GEL E
AVALIAÇÃO PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 29/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Beate Saegesser Santos (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Luciana Santos Afonso de Melo (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Osir de Sá Viana (Examinador Externo)
Faculdade Pernambucana de Saúde

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Beate Saegesser Santos por me auxiliar no amadurecimento profissional, pela amizade, conselhos e positividade.

À Adriana Fontes pela coorientação e por sempre estar disposta a ajudar e compartilhar suas experiências.

À colaboração do Professor Júlio Rebouças por ceder as amostras essenciais para esta pesquisa e da Professora Jane Higino em ceder material para confecção dos géis.

À Eliete Barros e Giovannia Pereira pela ótima receptividade na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental.

Aos colegas do grupo de pesquisa de Nanotecnologia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco, em especial Osnir Viana, Camila Galvão, Victor Almeida e Bela Andrade.

À Professora Juliana Alencar pelo auxílio e paciência durante a discussão dos resultados.

Aos amigos do Laboratório de Sistemas Dispersos – LASID da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelo apoio e por estarem sempre presentes.

Aos colegas e amigos de trabalho do Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco – LAFEPE, em especial Elcy Araújo e Amanda Oliveira pela compreensão e estímulo.

À minha família pelo incentivo, apoio e confiança.

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma alternativa de tratamento para o câncer e para infecções microbianas e parasitárias. Na TFD, a luz, o oxigênio e um agente fotossensibilizador (FS) são combinados produzindo espécies reativas capazes de induzir danos e morte celular. Como exemplos de substâncias FS tem-se as zincoporfirinas e o azul de metileno (AM) que demonstram um grande potencial para TFD, sendo objetos deste estudo. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo preparar um sistema de aplicação tópica capaz de carrear os FS (Zn(II) meso-tetrakis (N-etilpiridínio-2-il) porfirina - ZnTE-2-PyP⁴⁺ e azul de metileno) para uso em terapia fotodinâmica e avaliar a capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) antes e após a incorporação, como também a caracterização do sistema através de análise de pH, espalhabilidade e viscosidade. Para isso, foi utilizado o gel Carbopol, comumente empregado em preparações farmacêuticas. A detecção de ROS dos FS foi então avaliada antes e após incorporação ao gel, através do método químico indireto, bem como através de caracterização por espectroscopia de absorção e emissão eletrônica. Foi observado que a ZnTE-2-PyP⁴⁺ e o azul de metileno, ainda em solução (5 µM), apresentaram boa resposta na produção de espécies reativas de oxigênio (36 e 52%, respectivamente). Ao analisar a formulação em gel contendo ZnTE-2-PyP⁴⁺, detectou-se um aumento em torno de 6% na produção de ROS se comparado à solução, enquanto que, para o gel contendo AM, houve redução em torno de 25% na geração de ROS e os resultados são discutidos em termos da interação dos FS com a estrutura do polímero formador do gel. O conjunto de resultados evidencia que existe um potencial para aplicação destes FS em gel carbopol para uso em TFD, devido à capacidade de geração de ROS. Por outro lado, como o mecanismo fotodinâmico envolve não somente a sinergia da interação da luz, do oxigênio e propriedades do fotossensibilizador, mas também o local de aplicação da formulação, mais estudos são necessários para se avaliar a aplicabilidade desses sistemas no tratamento fotodinâmico.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia. Ferroquelatase. Azul de Metileno. Espécies de Oxigênio Reativas. Gel Carbopol.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is an alternative treatment for cancer and microbial and parasitic infections. In PDT, light, oxygen and a photosensitizer agent (PS) are combined producing reactive species capable of inducing damage and cell death. As examples of substances PS there are zinc-porphyrins and the methylene blue (MB) which demonstrate a great potential for PDT. In this context, this study aimed to prepare a topical application system capable of carrying the PS (Zn(II) meso-tetrakis (N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin ZnTE-2-PyP⁴⁺ - and Methylene Blue) for use in photodynamic therapy and evaluate the generation capacity of reactive oxygen species (ROS) before and after the incorporation, as well as the characterization of system by electronic absorption and emission spectroscopy, analysis of pH, viscosity and spreadability. Carbopol gel a commonly employed pharmaceutical preparations in was used for the semisolid formulation. The PS were then evaluated before and after incorporation into the gel by indirect chemical method for ROS detection and characterization of optical properties of the final systems. It was observed that aqueous solutions of 5 μ M ZnTE-2-PyP⁴⁺ or MB showed a good response in the production of reactive oxygen species (36 and 52% respectively). The gel formulations containing ZnTE-2-PyP⁴⁺ displayed 6% increase in the ROS production when compared to the solution. On the other hand, the gel containing MB, showed a 25% reduction in the generation of ROS and the overall results are discussed in terms of the interaction of the FS with the polymer forming gel. The results show that there is a potential for the application of these PS in carbopol gel for use in PDT due to the ability of ROS generation. On the other hand, the photodynamic mechanism involves not only the synergistic interaction of light, oxygen and photosensitizing properties but also the application site of the formulation, and therefore, more studies are required to evaluate the applicability of these systems in topic photodynamic treatment.

Keywords: Photochemotherapy. Ferrochelatase. Methylene Blue. Reactive Oxygen Species. Carbopol Gel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do fotossensibilizador Photofrin®	22
Figura 2 - Esquema ilustrando os possíveis processos durante a terapia fotodinâmica com o processo de excitação do FS e formação de ROS	24
Figura 3 - Esquema dos processos de interação da luz com o tecido biológico (a) e a capacidade de penetração na pele humana sadia em várias faixas de comprimentos de onda (%) (b)	26
Figura 4 - Estrutura molecular do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu derivado protoporfirina IX (PpIX)	29
Figura 5 - Estrutura do anel porfirínico base livre. Carbonos nas posições 5, 10,15 e 20 são denominados “carbonos em posição meso”. Os átomos das posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 são conhecidos como “carbonos nas posições β-pirrólicas”	30
Figura 6 - Estrutura de porfirinas de 1ª geração. (a) <i>meso</i> -tetrafenilporfirina (H ₂ TPP), (b) <i>meso</i> -tetraquis(2-piridil)porfirina (H ₂ T-2-PyP) e (c) Zn(II) <i>meso</i> -tetrakis (N-etilpiridínio-2-il) porfirina (ZnTE-2-PyP ⁴⁺), com massa molecular 741,76 e centro de raio 72 pm)	32
Figura 7 - Estrutura de porfirina de 2ª geração.....	33
Figura 8 - Estrutura de porfirina de 3ª geração.....	33
Figura 9 - Espectro eletrônico de absorção característico de porfirina de base livre em diclorometano, apresentando bandas B (406) e bandas Q (acima de 475 nm).....	34
Figura 10 - Estrutura molecular do azul de metileno (AM)	35
Figura 11 - Espectro de absorção de espécies de monômero e dímero de azul de metileno....	36
Figura 12 - Esquema de terapia fotodinâmica aplicada ao tratamento tópico.....	38
Figura 13 - Estrutura química do monômero do polímero carbopol (a) e esquema ilustrando o polímero de Carbopol na forma não ionizada (b).....	39
Figura 14 - Espectro de emissão de ZnP, antes e 90 min após a incorporação em gel natrosol e gel carbopol, excitação em 429 nm com concentração em 5x10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹	40
Figura 15 - Forma de irradiação das amostras realizadas com LED e laser nesta pesquisa.....	46
Figura 16 - Registro fotográfico da formulação de gel carbopol contendo azul de metileno (a) e da formulação de gel carbopol contendo ZnP (b), sob luz ambiente.....	49
Figura 17 - Descrição do comportamento de espalhabilidade absoluta (Ei) dos géis a base de carbopol contendo ou não os ativos.....	51

Figura 18 - Espectro de absorção (em preto) e de emissão (em vermelho) normalizados de uma solução de ZnP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Exc: 450 nm	52
Figura 19 - Registros fotográficos da formulação de gel de carbopol contendo ZnP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) iluminada por fonte de UV (365 nm) em placa (a) e em pele humana (b) evidenciando a fluorescência característica da porfirina na região do vermelho	53
Figura 20 - Espectro de emissão da ZnP em solução e na formulação gel, ambas com concentração $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Exc: 450 nm. Fendas ZnP solução: 10/10; ZnP gel: 10/9,5	53
Figura 21 - Espectro de absorção (em preto) e de emissão (em vermelho) normalizados de uma solução de AM ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Exc: 660 nm.....	54
Figura 22 - Espectro de emissão do AM em solução e na formulação gel, ambas com concentração $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Exc: 660 nm	55
Figura 23 - Estimando a produção de ROS através da degradação de RNO na solução ZnP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), monitorando-se a variação da intensidade a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Espectros registrados após 20s de irradiação com fonte LED (450 nm) por um período de 0 a 300s	56
Figura 24 - Estimando a produção de ROS através da degradação de RNO na formulação gel contendo ZnP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), monitorando-se a variação da intensidade a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Espectros registrados após 20s de irradiação com fonte LED (450 nm) por um período de 0 a 300 s.....	56
Figura 25 - Variação da intensidade de absorção de RNO em $\lambda = 440 \text{ nm}$ em função do tempo de irradiação com LED (450 nm) para as formulações (solução e gel) contendo zincoporfirina a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$	57
Figura 26 - Estimando a produção de ROS através da degradação de RNO na solução de AM ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), monitorando-se a variação do perfil espectral e intensidade a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Espectros registrados a após 20s de irradiação (660 nm) por um período de 0 a 300 s	58
Figura 27 - Estimando a produção de ROS através da degradação de RNO na formulação AM + gel ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), monitorando-se a variação do perfil espectral e intensidade a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Espectros registrados após 20s de irradiação (660 nm) por um período de 0 a 300 s.....	59
Figura 28 – Variação da intensidade de absorção de RNO em $\lambda = 440 \text{ nm}$ em função do tempo de irradiação com laser (660 nm) para as formulações (solução e gel) contendo azul de metileno a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$	59
Figura 29 - Perfil espectral do azul de metileno em solução e em formulação gel a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$	60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Intervalo de absorção máxima do azul de metileno e porfirinas.....	26
Tabela 1 - Componentes do gel Carbopol	43
Tabela 2 - Potencial hidrogeniônico (pH) e viscosidade das formulações contendo azul de metileno e zincoporfirina a $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$	50
Tabela 3 - Resultados de espalhabilidade (em mm^2) das formulações semissólidas contendo ou não o ativo	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AM	Azul de metileno
d	Diâmetro médio
Ei	Espalhabilidade
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizador
HpD	Hematoporfirina
LED	Dispositivo Emissor de Luz
MAL	Metilaminolevulinato
PDI	<i>Photodynamic inactivation</i>
PDT	<i>Photodynamic therapy</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
RNO	N,N-dimetil-4-nitrosoanilina
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
UV	Ultravioleta
ZnP	Zincoporfirina

LISTA DE SIMBOLOS

λ	Comprimento de onda
λ_{\max}	Comprimento de onda máximo
β	Beta
ϵ	Constante de absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
e^-	Elétron
Φ	Rendimento quântico
π	Pi
cp	Centipoise
cps	Intensidade de emissão
g	gramas
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
J/s^{-1}	Joule por segundo
μL	Microlitro
mol.L^{-1}	Mol por litro
mM	milimolar
μM	Micromolar
nm	Nanômetro
pm	Picômetro
O_2^-	Ânion superóxido
O_2	Oxigênio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto
OH^-	Radical hidroxila
PpIX	Protoporfirina IX
R^2	Coefficiente de correlação linear
W/s.m^2	Watt/segundo por metro quadrado
ZnTE-2-PyP ⁴⁺	Zn(II) meso-tetrakis (N-etilpiridinio-2-il)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS.....	19
2.1.	OBJETIVO GERAL	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1.	BREVE HISTÓRICO DA TERAPIA FOTODINÂMICA	21
3.2.	MECANISMO DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA	23
3.3.	COMPONENTES ESSENCIAIS PARA A TERAPIA FOTODINÂMICA.....	25
3.3.1.	Luz	25
3.3.2.	Fotossensibilizador	27
3.3.2.1.	Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA).....	29
3.3.2.2.	Porfirinas.....	30
3.3.2.3.	Fenotiazinas.....	35
4	APLICAÇÃO TÓPICA DE FOTOSSENSIBILIZADORES	37
5	DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)....	41
6	METODOLOGIA	43
6.1.	MATERIAIS.....	43
6.2.	MÉTODOS	43
6.2.1.	Preparo da solução contendo fotossensibilizadores	43
6.2.2.	Preparo da formulação em gel	43
6.2.3.	Determinação do pH.....	44
6.2.4.	Determinação de Espalhabilidade	44
6.2.5.	Determinação de Viscosidade.....	45
6.2.6.	Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS)	45
6.2.7.	Caracterização por espectroscopia de excitação e emissão.....	46
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
7.1.	ASPECTO MACROSCÓPICO DAS FORMULAÇÕES	49
7.2.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES	49
7.2.1.	Determinação de pH e viscosidade	49
7.2.2.	Espalhabilidade	50
7.3.	CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DAS FORMULAÇÕES.....	52
7.4.	DETECÇÃO INDIRETA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).....	55

7.4.1. Produção de ROS pelo FS ZnP	55
7.4.2. Produção de ROS pelo FS Azul de metileno	58
8 CONCLUSÕES	63
8.1. PERSPECTIVAS.....	64
REFERÊNCIAS	65

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD), terapia à base de luz e que vem sendo aplicada no Brasil nas últimas décadas, usa lasers ou outras fontes de luz para ativação de fotofármacos, conhecidos como agentes fotossensibilizadores (FS). Apesar de ter como principal aplicação o tratamento de câncer, vem sendo utilizada também em outras patologias, tais como degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatoide sistêmica, micoses fungóides, infecções bacterianas, arteriosclerose, desativação do vírus da Herpes (Herpes simplex, Herpes zoster) e parasitoses cutâneas como Leishmaniose (MACCORMACK, 2007; BEGA, 2008). A técnica da TFD envolve a interação simultânea de espécies químicas fotossensibilizadoras que são fotoativadas por luz, e oxigênio molecular (O_2) existente nas células, produzindo espécies citotóxicas denominadas *espécies reativas de oxigênio* (ROS) (BEGA, 2008).

Na TFD aplicada ao tratamento de tumores malignos, os FS são administrados conforme sua localização. Em tumores internos, como os broncopulmonares, gastrointestinais ou cerebrais, por exemplo, os FS são administrados por via oral ou por via endovenosa. O uso desta terapia no tratamento de patologias cutâneas, principalmente aquelas de caráter mais superficial, demonstra a necessidade de administração do FS por via tópica (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). No entanto, a aplicação por esta via implica na existência de processos de penetração, permeação, absorção e distribuição pelo organismo ou em parte dele.

O grupo de pesquisa em Nanotecnologia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco em colaboração com o grupo de Porfirinas Aplicadas a Problemas Químicos, Medicinais e Tecnológicos da Universidade Federal da Paraíba vem aplicando novas espécies de fotossensibilizadores (porfirinas e pontos quânticos) para uso em TFD. Recentemente uma zincoporfirina catiônica hidrossolúvel ($ZnTE-2-PyP^{4+}$) demonstrou grande eficiência como agente fotossensibilizador em TFD bacteriana e contra *Leishmania amazonensis* (VIANA, 2015), sugerindo seu uso tópico no tratamento da leishmaniose cutânea. Por outro lado, o agente fotossensibilizador Azul de Metileno (AM) já vem sendo amplamente utilizado na forma de solução no tratamento de periodontite bacteriana. O desenvolvimento de formulações tópicas semissólidas eficientes ainda está no início e poucos sistemas foram relatados na literatura e uma quantidade menor ainda está em fase de teste clínico (GONZÁLEZ-DELGADO *et al*, 2015). De modo geral, a absorção de um princípio ativo liberado de um sistema transdérmico ou de preparações dermatológicas depende das

propriedades físicas e químicas do fármaco, e de seu comportamento quando inserido em um veículo farmacêutico (CERIZE, 2012). Esses fatores aliados à complexidade dos processos envolvidos na formação de espécies reativas de oxigênio incentivam o estudo dos inúmeros aspectos implicados no potencial emprego de agentes fotossensibilizadores no âmbito farmacêutico e desenvolvimento de formulações capazes de facilitar a administração e absorção do fármaco (TOMAZINI *et al.*, 2007). No caso da TFD uma das principais preocupações é a manutenção da capacidade fotossensibilizadora do agente FS confinado numa formulação tópica. Neste contexto, a presente pesquisa visa demonstrar o desenvolvimento de uma formulação a base de gel contendo os fotossensibilizadores azul de metileno ou a zincoporfirina (ZnTE-2-PyP^{4+}) para uso tópico na TFD, de forma a manter suas características fotossensibilizadoras aliada a boas propriedades físico-químicas para uma formulação semissólida.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar e caracterizar a capacidade fotossensibilizadora da Zn(II) meso-tetrakis (N-etilpiridínio-2-il) porfirina e de azul de metileno numa formulação semissólida para uso em terapia fotodinâmica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver formulação semissólida à base de gel para uso tópico contendo ZnP ou AM com concentração terapêutica.
- Determinar o potencial hidrogeniônico (pH) das formulações.
- Determinar a viscosidade e a espalhabilidade das formulações.
- Caracterizar os sistemas obtidos através de espectroscopia de absorção, emissão e excitação.
- Avaliar a capacidade da zincoporfirina (Zn(II) meso-tetrakis (N-etilpiridínio-2-il) porfirina) e do azul de metileno na geração de espécies reativas de oxigênio em solução e após sua incorporação em formulação gel, com concentração terapêutica.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

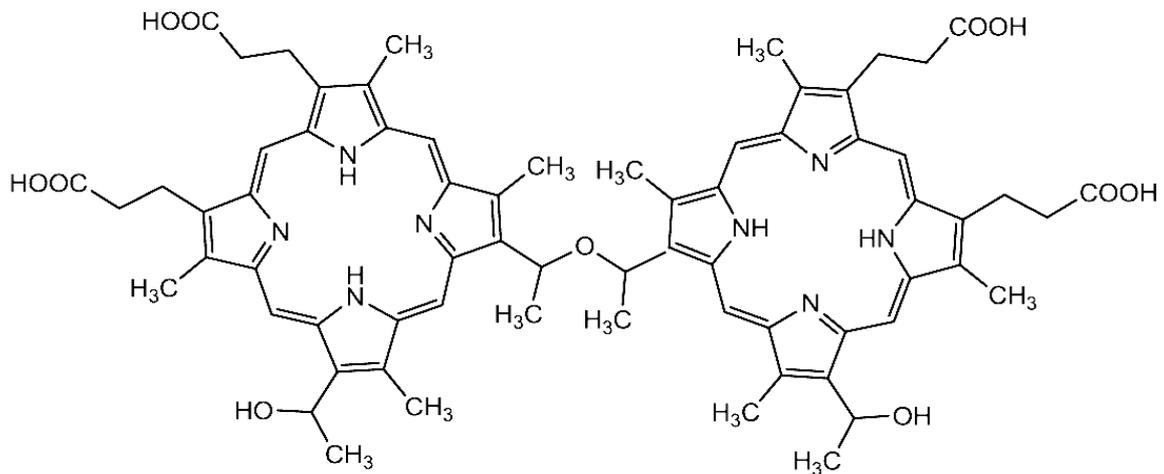
3.1. BREVE HISTÓRICO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

Por volta de 4 milênios, a luz vem sendo utilizada para fins terapêuticos e em antigas civilizações a luz solar era associada a extratos de plantas como medida para o tratamento de doenças como vitiligo, psoríase e câncer de pele (COSTA, 2013). Todavia, a origem da Terapia Fotodinâmica (TFD), também conhecida como “*photodynamic therapy*” – PDT, ocorreu em meados de 1901, quando Oscar Raab, estudante de medicina e sob orientação do Professor Hermann von Tappeiner, observou que a ação combinada do corante acridina com a luz era letal para os paramécios (*Paramecium caudatum*), permitindo assim a identificação de um fotossensibilizante. A propósito, na mesma época, o neurologista Prime utilizou eosina no tratamento de pacientes com epilepsia e evidenciou o aparecimento de reações cutâneas. Esta observação esteve baseada no trabalho desenvolvido por von Tappeiner e Jesionek, que em 1903 combinaram a eosina com a luz para o tratamento de tumores de pele. Após identificarem o oxigênio como um elemento fundamental da reação de fotossensibilização, von Tappeiner e Jodlbauer introduziram, em 1907, o termo “ação fotodinâmica” para descrever este fenômeno (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; COSTA, 2013).

Ainda em 1901, o médico Niels Filsen usou luz vermelha e luz ultravioleta (UV) no tratamento de pacientes com varíola e tuberculose cutânea e o seu trabalho em fototerapia foi laureado com o Prêmio Nobel da Medicina em 1903. Entretanto, essa terapêutica foi pouco explorada até 1972, ano em que Ivan Diamond destruiu células de glioma de rato, *in vitro* e *in vivo*, por ativação de porfirina pela luz (COSTA, 2013). Mais adiante, em 1976, o urologista John F. Kelly eliminou células humanas de carcinoma da bexiga, transplantadas em ratos imunossuprimidos, por ação combinada da luz com derivados de hematoporfirina (HpD) (MACCORMACK, 2007). Motivado pelo sucesso obtido, Kelly realizou, em colaboração com Snell, o primeiro estudo clínico em humanos (MITTON; ACKROYD, 2008).

A partir disso, em 1978, Dougherty coordenou o primeiro ensaio clínico em grande escala e descreveu a resposta de vários tipos de tumores, incluindo carcinomas da mama, cólon, próstata e de melanomas; ao tratamento mediado por HpD. Dougherty efetuou a purificação parcial do HpD por remoção dos monômeros, e a mistura resultante foi denominada de Photofrin II. Esse foi o primeiro fotossensibilizador aprovado pela Food and Drug Administration (FDA), como Photofrin®, em 1993, e comercializado para o tratamento de câncer (COSTA, 2013), sua estrutura molecular está representada na figura 1.

Figura 1 - Estrutura molecular do fotossensibilizador Photofrin®



Fonte: Costa (2013)

A Terapia Fotodinâmica tem como principal aplicação no diagnóstico e tratamento de câncer. Apesar de boa parte do uso da terapia ser centrada nesta doença, outras aplicações, tais como degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatoide sistêmica, micoses fungóides, infecções bacterianas resistentes aos tratamentos tradicionais, remoção de verrugas da laringe, arteriosclerose, desativação do vírus da Herpes (Herpes simplex, Herpes zoster) e parasitoses cutâneas como Leishmaniose têm sido relatadas (DERYCKE *et al.*, 2004; MACCORMACK, 2007; BEGA, 2008).

Como descrito por Issa, Manela-Azulay (2010) a TFD tem sido amplamente utilizada na dermatologia no tratamento de vários tumores malignos, como câncer de pele não melanoma e mais recentemente utilizada para dermatoses não neoplásicas, como as alterações relacionadas ao fotoenvelhecimento. É ainda uma boa indicação para lesões de ceratoses actínicas, carcinoma basocelular e doença de Bowen, pois permite tratamento de múltiplos tumores simultaneamente, com rápida recuperação. No caso de lesões primárias, tem-se reportado um alto índice de casos bem sucedidos (>80%), combinadas a excelentes resultados cosméticos (MACHADO, 2000).

Na TFD voltada ao tratamento do câncer, os FS são administrados conforme a localização do tumor, por exemplo, no tratamento de tumores gastrointestinais, cerebrais ou broncopulmonares, os FS são administrados via oral ou endovenosa. Enquanto que, para tumores do endométrio e carcinoma da bexiga, ocorre predominantemente por instilação; e no tratamento de tumores cutâneos, os FS podem ser aplicados topicamente, com boa eficácia (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). No entanto a via tópica, apesar de possuir fácil acesso

de aplicação, também apresenta uma grande complexidade para a ação fototerápica. Dessa maneira, as características ópticas do tecido, os processos de reflexão, absorção, espalhamento de luz e o estado funcional do tecido devem ser considerados. Como exemplo, a pele escura absorve mais luz em comparação à pele clara devido a maior quantidade de melanina, um dos principais cromóforos do tecido biológico. E no caso de lesões, a penetração da luz é maior se comparada à pele normal de espessura similar (GARCEZ, RIBEIRO, NUÑEZ, 2012). Para isso, é necessário o desenvolvimento de formulações farmacêuticas capazes de veicular os FS ao local acometido pela lesão tecidual, levando em consideração as propriedades ópticas do tecido-alvo.

Vale a pena ressaltar também o uso da TFD para tratamento de periodontites, tendo como principal agente fotossensibilizador o Azul de Metileno. A indústria voltada para odontologia comercializa dispositivos emissores de luz (LEDs) na região de maior absorção do AM, o qual é utilizado na forma de solução (NUNEZ, RIBEIRO, GARCEZ, 2013a).

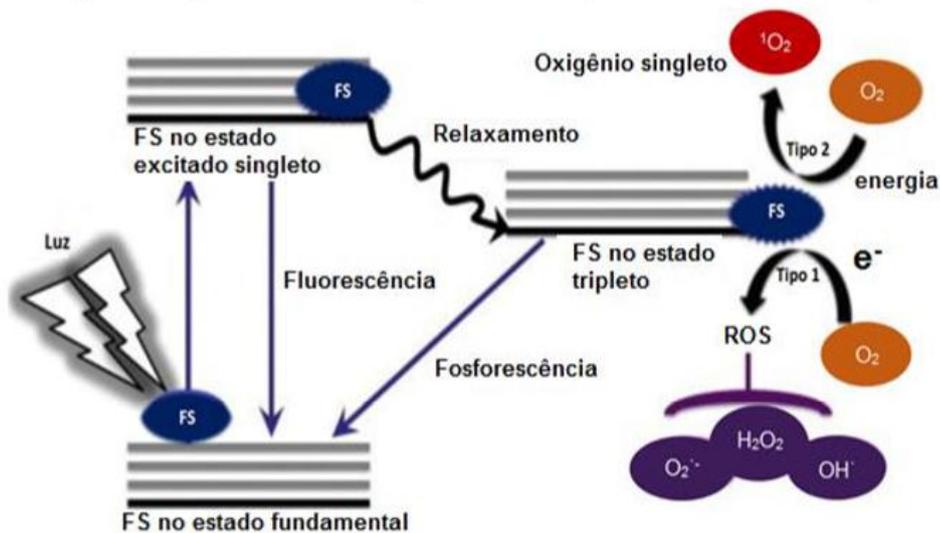
Atualmente, a TFD tem sido utilizada como uma estratégia contra resistência de cepas bacterianas, sendo conhecida como PDI (do inglês, “*photodynamic inactivation*”). A aplicação de PDI tem sido empregada para tratar infecções localizadas superficiais, como as de ocorrência mais frequente na pele e na cavidade oral, mostrando bons resultados contra uma ampla faixa de microrganismos resistentes a antibióticos (NUNEZ, RIBEIRO, GARCEZ 2013b; VIANA, 2015), tornando-se uma alternativa menos invasiva e mais atraente para a erradicação dos microrganismos (GONZÁLEZ-DELGADO, 2015).

3.2. MECANISMO DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

A técnica da TFD envolve a interação simultânea de fotossensibilizadores (FS), luz e oxigênio molecular existente nas células (MACHADO, 2000). O tratamento consiste em duas etapas. Na primeira etapa, os FS acumulam-se preferencialmente nas células tumorais após sua administração, devido à seletividade dos FS ao tecido cancerígeno, pois este apresenta um maior número de receptores de lipoproteínas responsáveis pela captação do FS (MENEZES, 2006). Na segunda etapa, o tumor fotossensibilizado é exposto à luz de comprimento de onda que coincide com a região de maior absorção do agente fotossensibilizante. O FS ativado transfere energia ao oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “*reactive oxygen species*”) altamente tóxicas aos constituintes celulares (MENEZES, 2006; VIANA, 2015).

A Figura 2 apresenta um esquema geral que ilustra os diferentes processos que ocorrem a partir da excitação de um fotossensibilizador por uma fonte de luz. A absorção de um fóton de luz promove a excitação e transição do FS do estado fundamental para o estado excitado singleto. Neste estado, o FS pode regressar ao estado fundamental por emissão de fluorescência ou passar ao estado excitado tripleto no qual pode reagir com o oxigênio molecular de duas formas distintas (reação tipo I e reação tipo II). Na reação do tipo I, o FS reage diretamente com o substrato, membrana celular ou uma molécula, essa reação permite a transferência de elétrons (e^-) formando íons ou radicais derivados do FS e do substrato (COSTA, 2013). As espécies reativas são formadas por reduções de um ou mais elétrons no oxigênio (O_2). Os produtos desta redução incluem ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical alcoxila, radical peroxila e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (NUNEZ, RIBEIRO, GARCEZ, 2013a).

Figura 2 - Esquema ilustrando os possíveis processos durante a terapia fotodinâmica com o processo de excitação do FS e formação de ROS



Fonte: Adaptado de TEGOS et al (2012); COSTA (2013); VIANA (2015)

Por outro lado, na reação tipo II, o fotossensibilizador no estado tripleto transfere sua energia diretamente ao oxigênio molecular (O_2), para produzir o oxigênio singleto (1O_2), uma espécie altamente reativa de oxigênio, capaz de oxidar biomoléculas como lipídios insaturados, nomeadamente triacilgliceróis, fosfolipídios e o colesterol presentes nas membranas biológicas (plasmática, mitocondrial, lipossomal, nuclear e do retículo endoplasmático), resíduos de aminoácidos (triptofano, histidina, metionina e cisteína)

presentes em diversas proteínas e bases de ácidos nucleicos, tais como guanina e guanosina (NYMAN; HYNINEN, 2004; TEGOS *et al.*, 2012). A oxidação desses constituintes celulares danifica as membranas plasmáticas e as organelas, com subsequente alteração de permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelular. Além disso, a inibição de enzimas mitocondriais parece ser o evento chave na morte por TFD (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Diante disso, tem-se a reação do tipo II como a maior responsável pelo efeito fotodinâmico (COSTA, 2013). É provável que a maioria dos fotossensibilizadores utilizados em TFD atue por meio da formação de $^1\text{O}_2$. Além disso, a produção de oxigênio singleto tem sido utilizada como medida de eficiência fotodinâmica, bem como para cálculos de dosimetria direta ou uso de método químico indireto que visam prever os resultados da terapia pelo acompanhamento da formação das espécies reativas de oxigênio (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013a).

3.3. COMPONENTES ESSENCIAIS PARA A TERAPIA FOTODINÂMICA

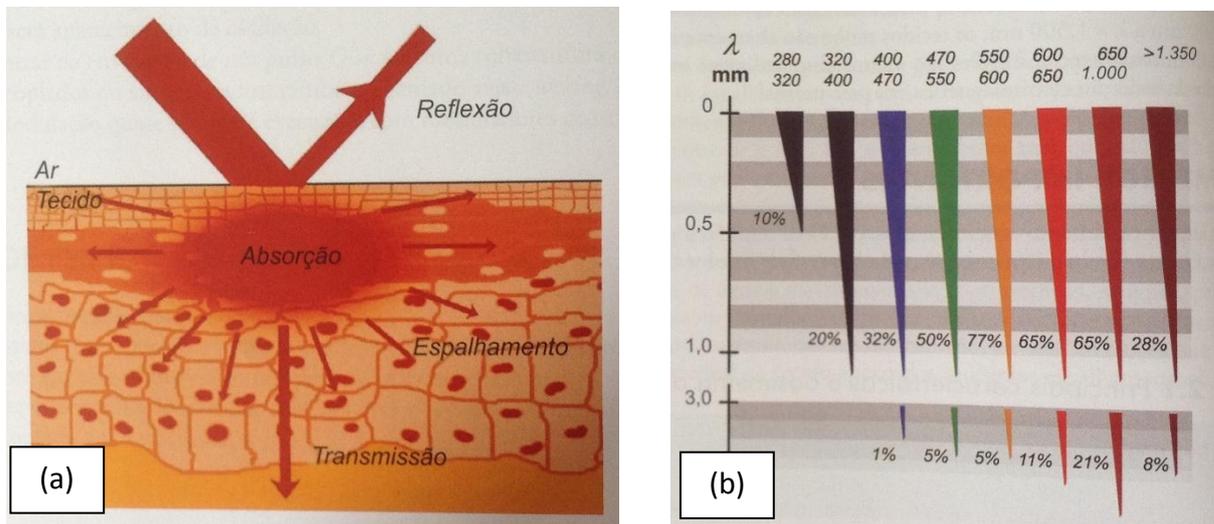
3.3.1. Luz

A intensidade de luz que incide no tecido alvo está relacionada à eficácia do tratamento fotodinâmico e ao tipo de resposta biológica. Tendo isso em vista, é essencial compreender que a interação da luz com os tecidos está sujeita a processos de reflexão, absorção e dispersão (espalhamento), como mostra a Figura 3a. A extensão com que estes processos ocorrem depende da heterogeneidade do tecido e de suas propriedades, como constituição e estrutura das camadas da pele; e do comprimento de onda utilizado, o qual determina a profundidade de penetração da luz pela pele (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009).

Como podemos observar na Figura 3b, a luz azul ($\lambda = 400 \text{ nm}$) penetra menos eficientemente através do tecido, enquanto que as radiações de vermelho ($\lambda = 600 - 650 \text{ nm}$) e infravermelho ($\lambda = >1.350 \text{ nm}$) penetram mais profundamente. A região entre 600 e 1.200 nm é, na maioria das vezes, chamada de janela óptica do tecido, pois nessa região os tecidos são fracos absorvedores de luz, apresentando maior penetração na pele. Porém, o limite superior deste intervalo foi posteriormente restringido a 850 nm, após a comprovação de que

comprimentos de onda superiores não possuem a energia mínima necessária para desencadear a produção de oxigênio singlete (AGOSTINIS *et al.*, 2011; COSTA, 2013).

Figura 3 - Esquema dos processos de interação da luz com o tecido biológico (a) e a capacidade de penetração na pele humana sadia em várias faixas de comprimentos de onda (%) (b)



Fonte: Adaptado de Garcez, Ribeiro e Nuñez (2012)

A fonte de luz para TFD deve ser selecionada com base no espectro máximo de absorção do fotossensibilizador a fim de gerar ROS suficiente para produzir um efeito citotóxico, como também nas propriedades do tecido lesado (localização, tamanho da lesão e acessibilidade), de modo que se estabeleça uma boa relação entre a ativação do FS e a profundidade de penetração com mínimo espalhamento (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009; AGOSTINIS *et al.*, 2011). O quadro 1 mostra o intervalo de absorção máximo dos fotossensibilizadores azul de metileno e porfirinas.

Quadro 1 - Intervalo de absorção máxima do azul de metileno e porfirinas

Fotossensibilizador	Intervalo de λ_{max} (nm)
Azul de metileno	610-660 (vermelho)
Porfirinas	400-420; 600-650 (azul; vermelho)

Fonte: Nunez, Ribeiro e Garcez (2013)

Outro fator de grande importância na eficácia do tratamento é a dose da luz, esta depende da área e profundidade da lesão. Este parâmetro é geralmente expresso pela taxa de fluência da luz, que se define em função da energia que incide numa determinada área da

lesão por unidade de tempo ($W/s.m^2$, $W = J.s^{-1}$) (ETHIRAJAN *et al.*, 2011); ou seja, além da otimização da absorção do FS, são parâmetros importantes a serem avaliados: a potência da fonte luminosa (em Watts), a área que a fonte luminosa atinge e o tempo de exposição.

Ao longo dos anos, diferentes fontes de luz foram aplicadas na fototerapia, tais como lasers de argônio, hélio-neônio, lasers de corantes, de vapores metálicos e os lasers de diodo, normalmente utilizando-se comprimentos de onda próximos ao vermelho visível (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013a). As fontes que não utilizam luzes de laser como xenônio, tubos fluorescentes e emissores de luz diodo (LED), são úteis para o tratamento de grandes áreas da pele (VIANA, 2015).

3.3.2. Fotossensibilizador

A eficiência de um fotossensibilizador como agente terapêutico está relacionada a determinadas características do composto como solubilidade, pH, seletividade, parâmetros fotofísicos, absorção de luz, toxicidade e estabilidade. De forma geral, um FS deve ser solúvel e permanecer estável em solução aquosa a pH fisiológico para permitir circulação e acúmulo seletivo nas células (MENEZES, 2006). Em termos de seletividade, uma característica relevante dos FS e que regula sua interação com as células é sua carga, podendo ser catiônicos e aniônicos, em geral compostos catiônicos interagem melhor com as membranas biológicas, por essas serem negativas (GIANSANTE, 2014).

Em adição, a escolha da formulação farmacêutica para veiculação dos FS deve considerar o caráter hidrofílico/hidrofóbico do fotossensibilizador, pois esta característica influi diretamente no estado de agregação do mesmo e também no seu transporte e incorporação pelas células. Por exemplo, moléculas anfifílicas e polares podem ser dissolvidas em solventes polares, enquanto FS hidrofóbicos têm sido administrados em lipossomas, cujo transporte pode ser feito com a ajuda de lipoproteínas do plasma, ou em emulsão de base óleo (MUSSI, 2003).

Além disso, para aplicações terapêuticas, os parâmetros mais importantes do fotossensibilizador são:

- (1) Apresentar pouca ou nenhuma toxicidade na ausência de luz;
- (2) O rendimento quântico (Φ) de formação do oxigênio singleto que equivale à razão do número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos pelo

fotossensibilizador. Ou seja, FS com alto rendimento quântico apresenta emissão visivelmente brilhante e boa capacidade de geração de oxigênio singleto;

(3) O tempo de meia vida do estado singleto do FS, que em geral, é menor que 1 microssegundo e o principal papel desse estado no mecanismo de fotossensibilização é agir como um precursor do estado tripleto metaestável;

(4) A energia do fotossensibilizador no estado tripleto, esta deve permitir que a transferência de energia para o oxigênio molecular durante a reação tipo II seja eficiente na formação de oxigênio singleto.

A fotossensibilização tem início, sobretudo, com a geração de estados tripletos, que por possuírem um tempo de meia vida mais longo, permitem tanto a maior eficiência na transferência de elétron para produzir radicais livres, quanto para a transferência de energia que dá origem à espécies reativas de oxigênio, dentre elas o oxigênio singleto espécie com grande potencial oxidante (MUSSI, 2003).

Outro fator a ser considerado é o fotobranqueamento (também conhecido por fotodegradação ou *photobleaching*, do inglês) do FS, que está relacionado com mudanças irreversíveis nas propriedades dos cromóforos após exposição à luz. Tais mudanças são devido à fotorreações do fotossensibilizador com as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas no substrato. A ação destas ROS pode inviabilizar a absorção de luz por parte do fotossensibilizador e, conseqüentemente, a geração de mais espécies reativas. Logo, é fundamental que se determinem condições ideais de iluminação e de armazenamento para as substâncias fotoativas, a fim de que sua integridade e sua capacidade fotodinâmica sejam mantidas (TOFFOLI, 2008).

É desejável ainda, que a molécula do FS seja cinética e termodinamicamente estável e que sua obtenção sintética seja rápida, conveniente e de alto rendimento (MUSSI, 2003). Existem vários compostos descritos na literatura que vêm sendo testados como FS e utilizados comercialmente. Dentre eles podem ser citados compostos da classe dos fenotiazínicos (como por exemplo o azul de metileno), os compostos porfirínicos (dentre eles as porfirinas e metaloporfirinas, clorinas e bacterioclorinas e as ftalocianinas) e o ácido 5-aminolevulínico. As seções a seguir reportam algumas características destes compostos.

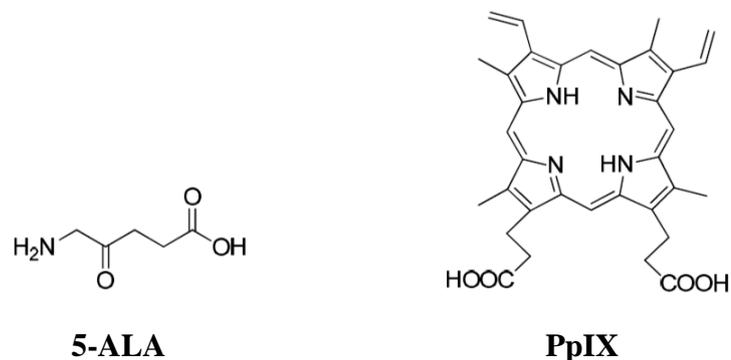
3.3.2.1. Ácido 5-aminolevulínico (5-ALA)

O ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) é um precursor de porfirinas endógenas na via de biossíntese do heme e vem sendo estudado para aplicação tópica, como um pró-fármaco associado à TFD de células pré-cancerígenas na pele, no tratamento de ceratoses actínicas, como também na psoríase. O 5-ALA, após sua irradiação no comprimento de onda apropriado se transforma numa substância altamente fluorescente e fotodinamicamente ativa, a protoporfirina IX (PpIX) (Figura 4).

A PpIX tem sido empregada no tratamento de carcinoma basocelular cutâneo através da administração tópica de ALA (CASAS et al., 2009). Além de diagnóstico fotodinâmico de lesões pré-malignas e malignas, devido à capacidade de o tecido lesionado metabolizar o 5-ALA em PpIX mais rapidamente que o tecido normal (VAIDYANATHAN et al., 2006).

Além do uso do 5-ALA em TFD, pode-se citar o seu derivado lipofílico, o metilaminolevulinato (MAL). No Brasil, o ALA é vendido com nome comercial de Levulan®, em apresentação na forma de stick, seu uso associado a irradiação de luz azul é indicado para o tratamento da ceratose actínica da face ou do couro cabeludo. Enquanto que, o MAL, com o nome comercial de Metvix® e apresentação em creme, possui também aplicação no tratamento de ceratose actínica e tipos de câncer de pele como carcinoma basocelular nodular ou superficial e carcinoma espinocelular *in situ* ou doença de Bowen (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Figura 4 - Estrutura molecular do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) e seu derivado protoporfirina IX (PpIX)



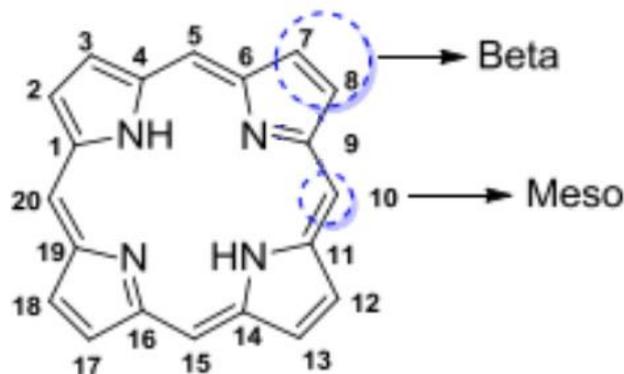
Fonte: González-Delgado (2015)

3.3.2.2. Porfirinas

As porfirinas são compostos macrocíclicos, aromáticos, altamente conjugados e são instáveis em presença da luz e de peróxidos (SILVA, 1971). Muitos de seus derivados metálicos estão presentes em várias proteínas e apresentam importante papel em sistemas biológicos, tais como: transporte (hemoglobina) ou armazenamento de oxigênio (mioglobina), transporte de elétrons na cadeia respiratória (citocromo c) e ainda, ação catalítica, como por exemplo, no metabolismo de fármacos (monooxigenase, no citocromo P-450) (FRIEDERMANN, 2005; MENDES, 2008).

As porfirinas representam uma classe de moléculas orgânicas constituídas por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por pontes de CH (metino), formando um macrociclo, conforme esquematizado na Figura 5. As porfirinas base livre não possuem metais complexados no centro do anel macrocíclico, onde existem dois átomos de hidrogênio ligados a nitrogênios amínicos. Nesta forma ela é considerada um ligante dianiônico. O centro da porfirina possui um raio de aproximadamente 70 pm. As porfirinas base livre não apresentam atividade catalítica em aplicações de oxidação de substratos orgânicos, podendo ser classificadas como primeira, segunda e terceira geração (FRIEDERMANN, 2005).

Figura 5 - Estrutura do anel porfirínico base livre. Carbonos nas posições 5, 10, 15 e 20 são denominados “carbonos em posição meso”. Os átomos das posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 são conhecidos como “carbonos nas posições β -pirrólicas”



Fonte: Friedermann (2005) e Oliveira (2015)

Porfirinas substituídas com grupos fenila nas posições *meso* do anel representam a classe das porfirinas de 1ª geração, também denominadas de *meso* substituídas, como representadas nas figuras 6a, 6b e 6c. As porfirinas de primeira geração incluem as *meso*-

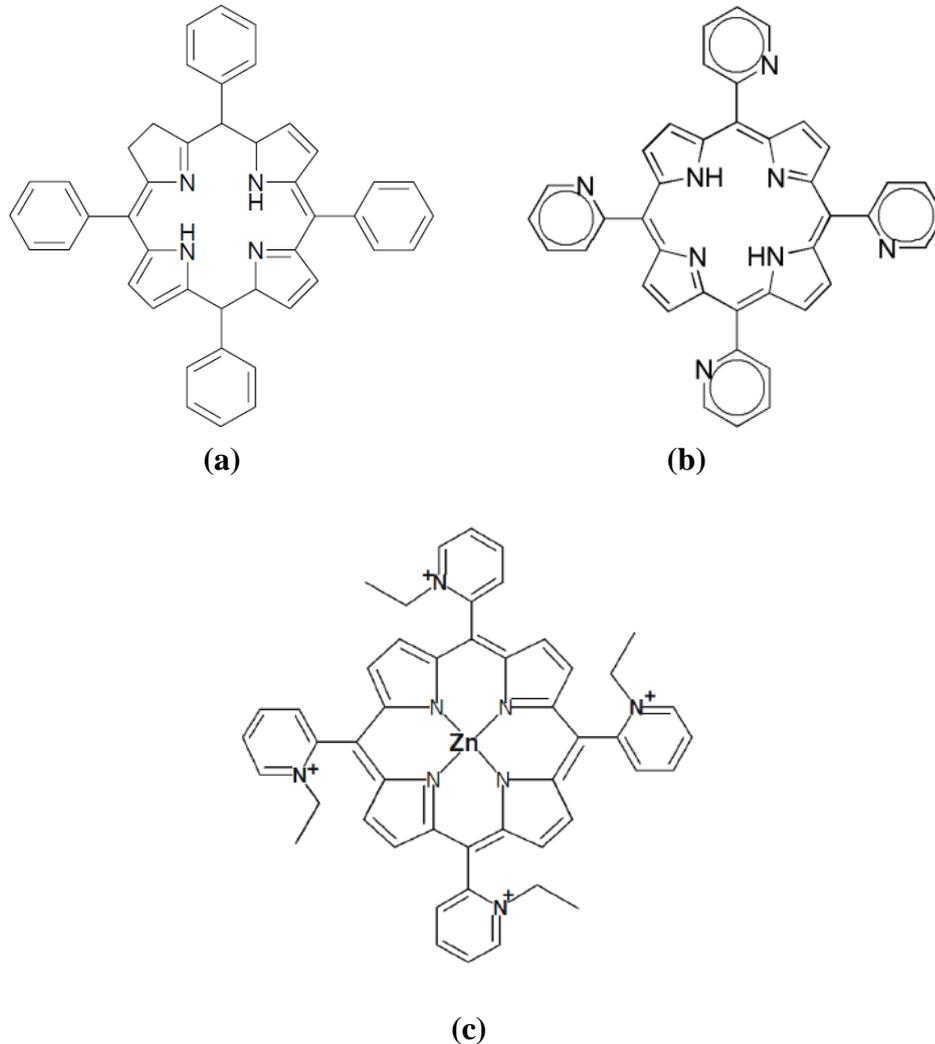
tetrakis fenilporfirinas. Tais porfirinas não apresentam grupos volumosos que levem a impedimento estérico para a formação de dímeros. Somado a isso, moléculas de fotossensibilizador tendem a sofrer agregação ao serem introduzidas em um meio incompatível com seu caráter hidrofílico/hidrofóbico através da formação de ligações entre as próprias moléculas do fotossensibilizador de maneira a “criar uma proteção contra o meio em que estão dispersas”, perdendo assim, parte de seu efeito fotodinâmico. Por exemplo, porfirinas hidrofóbicas em meios aquosos têm maior tendência para formar dímeros ou agregados de maiores dimensões que as porfirinas mais hidrofílicas. A presença de cadeias polares laterais nas estruturas das porfirinas favorecem a solvatação da molécula pela água, reduzindo a autoagregação em consequência do aumento da repulsão eletrostática ou do impedimento estérico entre as cadeias laterais. Deste modo, as porfirinas solúveis em água têm menor capacidade para a autoagregação se comparadas às de caráter hidrofóbico (ALVES, 2014).

A importância da agregação das moléculas se dá pela capacidade em modificar as propriedades fotofísicas dos FS, diminuindo o tempo de meia vida do estado tripleto e o rendimento quântico do oxigênio singleto através da dissipação de energia na forma de calor (MENDES, 2008). Uma das principais maneiras de aferir a presença de espécies agregadas numa amostra, se dá através da análise espectroscópica e testes de conformidade à lei de Beer-Lambert. Desvios negativos a esta 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).

Outro fator que deve ser levado em consideração é o pH, uma vez que, os derivados porfirínicos apresentam como grupamento ácido-base os nitrogênios dos anéis pirrólicos e, eventualmente grupos periféricos ligados à estrutura porfirínica. O fator pH determina a estrutura da espécie presente afetando as propriedades de absorção de luz, rendimento quântico, geração de oxigênio singleto, fotobranqueamento, solubilização, lipofilicidade, afinidade celular, tempo de retenção, biodistribuição, etc (MENDES, 2008). As porfirinas são consideradas ainda, substâncias anfotéricas, solúveis em meios alcalinos e ácidos, respectivamente. A maioria delas tem o seu ponto isoelétrico situado entre pH 3 e 4,5.

A porfirina sintética metalada, de primeira geração, utilizada nesse estudo tem a estrutura molecular representada na Figura 6c.

Figura 6 - Estrutura de porfirinas de 1ª geração. (a) *meso*-tetrafenilporfirina (H₂TPP), (b) *meso*-tetraquis(2-piridil)porfirina (H₂T-2-PyP) e (c) Zn(II) *meso*-tetrakis (N-etilpiridínio-2-il) porfirina (ZnTE-2-PyP⁴⁺), com massa molecular 741,76 g. mol⁻¹ e raio de centro = 72 pm).

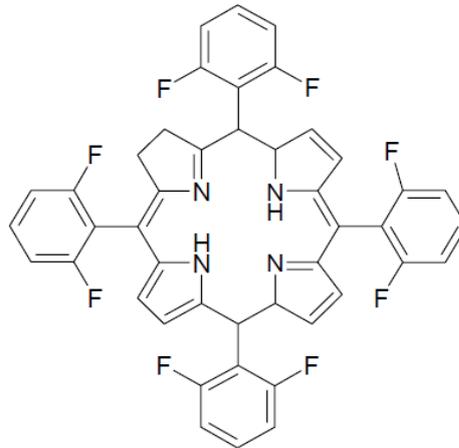


Fonte: Mendes (2008); Peixoto (2012)

A Zn(II) *meso*-tetrakis (N-etilpiridínio-2-il) porfirina ou simplesmente ZnTE-2-PyP⁴⁺, (Figura 6c) possui características importantes: é hidrossolúvel, catiônica e apresenta atividade fotodinâmica recentemente descrita para inibição de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, possui carga positiva o que a torna atraente para as células, as quais possuem uma membrana essencialmente negativa (VIANA, 2015).

As porfirinas de segunda geração são as que possuem grupos fenil substituídos nas posições *meso*, com halogênios ou outros substituintes elétron retiradores (Figura 7). Essas porfirinas apresentam uma melhor ativação do anel, uma vez que os halogênios atuam como retiradores de densidade eletrônica do anel da porfirina (MENDES, 2008).

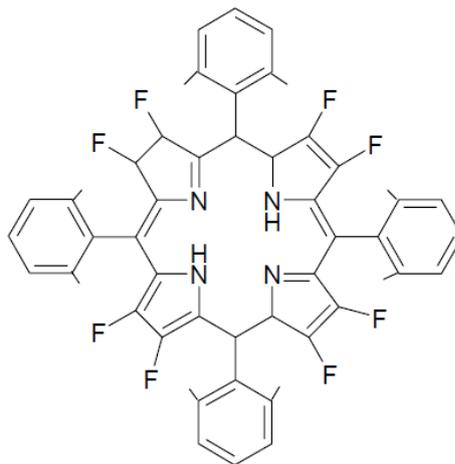
Figura 7 - Estrutura de porfirina de 2ª geração



Fonte: Mendes (2008)

As porfirinas de terceira geração correspondem àquelas que apresentam halogênios (ou outro tipo de substituintes volumosos) nas posições β do macrociclo da porfirina (Figura 8). A presença de grupos volumosos nestas posições confere a estas porfirinas maior proteção à destruição oxidativa e impede ou minimiza a formação de espécies diméricas. As porfirinas podem ainda ser carregadas positiva- (catiônicas) ou negativamente (aniônicas) de acordo com as cargas presentes nos substituintes situados no anel porfirínico (MENDES, 2008).

Figura 8 - Estrutura de porfirina de 3ª geração



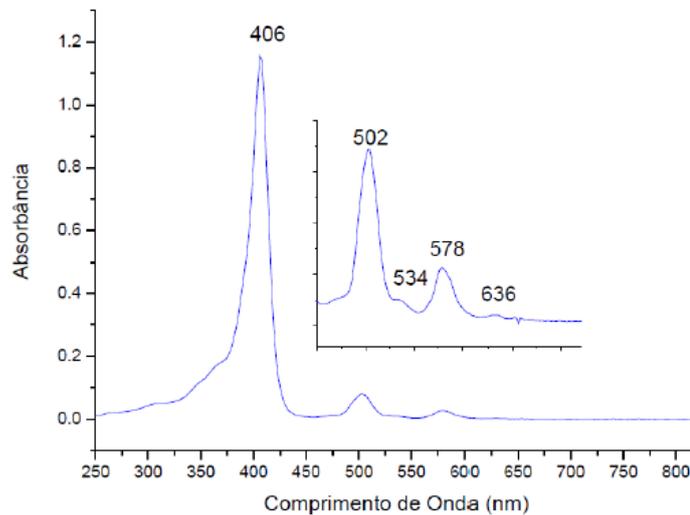
Fonte: Mendes (2008)

Quando se encontra na forma de base livre o macrociclo porfirínico possui dois átomos de nitrogênio capazes de aceitar prótons e dois grupos NH capazes de perder prótons. A protonação da porfirina pode ser promovida em meio fortemente ácido e, como

consequência, há uma alteração significativa das suas propriedades espectroscópicas (MENDES, 2008).

As porfirinas base livre apresentam em seu espectro eletrônico uma banda característica, muito intensa ($\epsilon \sim 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), entre 380 e 430 nm, denominada banda Soret ou banda B, e na região entre 500 e 650 nm apresentam ainda quatro bandas ($\epsilon \sim 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) denominadas bandas Q (BATINIC'-HABERLE; REBOUÇAS; SPASOJEVIC', 2010). O espectro de absorção eletrônica, característico de uma porfirina de base livre, está demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Espectro eletrônico de absorção característico de porfirina de base livre em diclorometano, apresentando bandas B (406) e bandas Q (acima de 475 nm)



Fonte: Adaptado de Friedermann (2005)

Quando a porfirina base livre sofre metalação, observa-se um deslocamento na banda Soret para a região de mais alta energia e as bandas Q se reduzem a duas. Tal processo é útil para acompanhar o desenvolvimento da reação de metalação de uma porfirina base livre. Outra forma de diferenciação das porfirinas base livre das metaloporfirinas são seus espectros de emissão. Quando submetidas à radiação ultravioleta, as porfirinas base livre apresentam intensa fluorescência vermelho-alaranjada, porém essa característica é perdida ou bastante diminuída quando elas são metaladas. Isto explica porque em porfirinas de zinco, cádmio, bário, magnésio entre outras, observa-se fluorescência, com intensidade menor e comprimento de onda diferente da porfirina base livre (FRIEDERMANN, 2005).

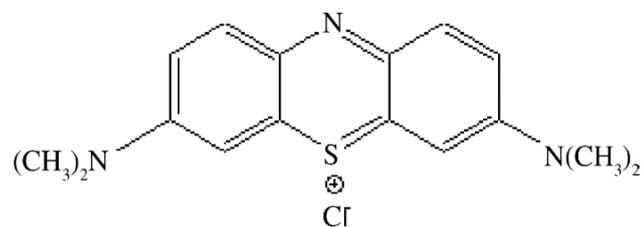
Em adição, os resultados do uso de metaloporfirinas na TFD têm se mostrado promissores devido à alta fotoestabilidade, baixa toxicidade e alta absorção óptica na região espectral λ 400-420 nm e 600-650 nm, com alto rendimento quântico do estado tripleto e bons geradores de oxigênio no estado singleto (BEGA, 2008; MENDES, 2008).

3.3.2.3. Fenotiazinas

Este grupo de FS são compostos tricíclicos planos, anfifílicos e de carácter catiônico em pH fisiológico. Exibem uma forte afinidade pelas membranas celulares devido à sua lipofilicidade e são amplamente utilizados como antipsicóticos e neurolépticos. Há um crescente número de estudos evidenciando a eficácia fotodinâmica destes compostos frente a microrganismos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e diversas bactérias periodontais e fungos como a *Candida* (YAMADA JUNIOR, 2007). Dentre estes compostos um dos mais utilizados é o azul de metileno (AM).

O azul de metileno é um corante catiônico que por ser relativamente lipofílico, é capaz de permear membranas e por possuir carga positiva é atraído pelo potencial negativo das mitocôndrias, podendo atuar nesta organela. Este FS é atualmente empregado no tratamento de infecções bucais, periodontite e descontaminação endodôntica. Possui ainda, eficácia de geração de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e de tripleto ($^3\text{O}_2$) em torno de 50% considerada boa (NUNEZ; RIBEIRO; GARCEZ, 2013a). Sua estrutura molecular está representada na Figura 10.

Figura 10 - Estrutura molecular do azul de metileno (AM)

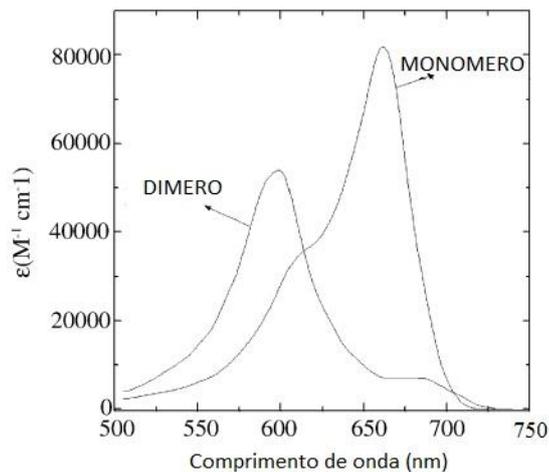


Fonte: TARDIVO *et al.* (2005)

A faixa de absorção eletrônica do AM ocorre entre 500 e 700 nm, apresentando picos de absorção máxima em dois pontos: 610 e 664 nm, que podem variar, dependendo dentre outros fatores, do tipo de solvente empregado e da concentração do FS na solução

(SENA, 2013). O AM apresenta fluorescência na região do vermelho, com máximo em torno de 701 nm. Somado a isso, o espectro de absorção do AM é dependente da concentração devido à dimerização, cuja constante de equilíbrio em água é $3,8 \times 10^3 \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}^{-1}$. A dimerização aumenta com o aumento da força iônica e pode aumentar ou diminuir na presença de cargas na interface, dependendo da relação entre o FS e o meio em que se encontra. Além disso, monômeros e dímeros de AM possuem espectros de absorção diferentes, monômeros têm máxima em torno de 664 nm e dímeros em torno de 590 nm, conforme mostra a Figura 11. A diferença na absorção entre essas espécies facilita o cálculo da concentração de cada uma delas presente em solução (TARDIVO *et al.*, 2005).

Figura 11 - Espectro de absorção de espécies de monômero e dímero de azul de metileno



Fonte: Adaptado de TARDIVO *et al.* (2005)

A presença de monômeros e dímeros pode resultar ainda em diferentes tipos de reações fotoquímicas, o que pode afetar o mecanismo e eficácia da morte celular (TARDIVO *et al.*, 2005). Além disso, a fotoquímica de monômeros de AM apresenta predominância para formação de oxigênio singleto, já os dímeros apresentam maior rendimento para reações do tipo I, envolvendo transferência de elétrons. Portanto, os dois tipos de reação são importantes para o processo fotodinâmico (NÚÑEZ, 2007).

A facilidade de obtenção, a possibilidade do uso de fontes de luz policromáticas e apresentando um relativo baixo custo, são características atraentes do azul de metileno para seu uso como fotossensibilizador para uso em TFD no tratamento de uma variedade de enfermidades.

4. APLICAÇÃO TÓPICA DE FOTOSSENSIBILIZADORES

A via de administração, bem como, o padrão de distribuição do fármaco no organismo pode interferir de maneira direta sobre a duração e extensão da ação terapêutica. Ao se considerar a administração de um fármaco, é fácil prever que a situação ideal seria administrá-lo diretamente no local em que sua ação é desejável. Essa estratégia não somente aumenta a eficácia farmacológica, como também diminui a dose necessária para a obtenção do efeito desejado e tende a atenuar a toxicidade do ativo (CERIZE, 2012). Assim, deve-se prezar pela facilidade de aplicação do medicamento, avaliando-se a via de administração mais adequada a fim de favorecer a biodisponibilidade do ativo da formulação (LAPINSKI, 2008).

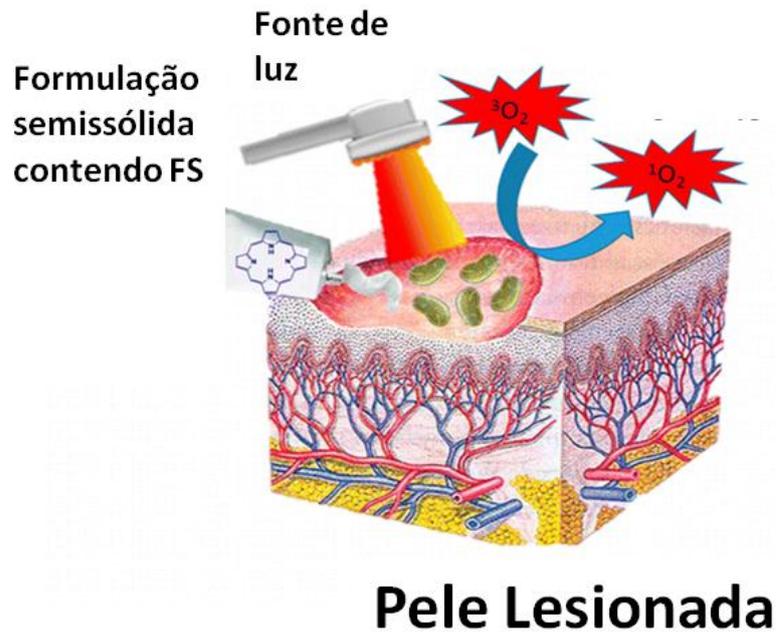
Nesse contexto, tem-se que para o tratamento das patologias cutâneas, especialmente aquelas de caráter mais superficial, a administração do fotossensibilizador próximo ao local de ação é facilitada, por se tratar de local de ação mais acessível (CERIZE, 2012).

No entanto, a aplicação pela via tópica implica na existência de processos de penetração, permeação, absorção e distribuição pelo organismo ou em parte dele. A absorção de uma substância pela pele, que permeia até as camadas mais profundas, entrando inclusive na corrente sanguínea, é denominada absorção percutânea (ANSEL; POPOVICH e ALLEN, 2000).

A pele como maior órgão do nosso corpo é totalmente acessível à radiação de luz necessária para a ativação do fotossensibilizador e permite o uso de formulações tópicas contendo agentes fototerapêuticos, possibilitando melhor seletividade do tratamento (SCHUITMAKER *et al.*, 1996). A Figura 12 apresenta um esquema da TFD aplicada ao tratamento tópico.

Estudos recentes mostram as tentativas de veiculação de FS em formulações sólidas, líquidas e semisólidas, classificadas como cremes, géis, pastas e pomadas ou ainda como emulsões, lipossomas, suspensões e sistemas transdérmicos de acordo com a sua matriz estrutural. Estas formulações têm sido utilizadas em TFD e PDI devido as suas boas propriedades de penetração, fácil acesso aos tecidos danificados e uma estrutura adequada que permite a remoção completa do medicamento após o término do tratamento. Como exemplo das recentes formulações em estudo, tem-se géis contendo o ácido 5-aminolevulínico (5%) aplicado ao tratamento de *acne vulgaris* (MA *et al.*, 2013) e cremes contendo fenotiazinas para uso no tratamento de leishmaniose cutânea (AKILOV *et al.*, 2007).

Figura 12 - Esquema de terapia fotodinâmica aplicada ao tratamento tópico



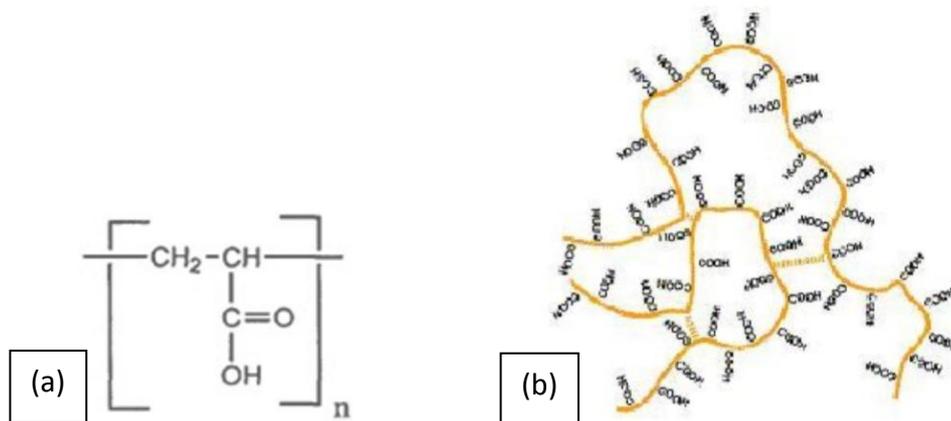
Fonte: González-Delgado (2015)

Sistemas hidrofílicos prepannrados com polímeros como a quitosana (FONTANA et al., 2008), o hidróxi-etil-metacrilato (PARSONS et al., 2009), polietilenoglicol (LOVE; VANDERZANDEN; TAYLOR, 1997) e formulações sol-gel (RYCHTARIKOVA et al., 2012), bem como sistemas não aquosos contendo triglicerídeos de cadeias médias e longas, óleos e álcoois (Labrafilm®, Labrasol®, Transcutan®, Cremophor® etc) têm sido relatados. Outras composições já aprovadas para uso clínico e comercializadas baseiam-se em sistemas mais complexos. Por exemplo, com o mesmo ativo tem-se o creme comercial denominado Metvix® (contendo aminolevulinato de metilo 160 mg/g [sob a forma de cloridrato] e os demais componentes: monoestearato de gliceril, álcool cetosteárico, estearato 40 polioxil, parahidroxibenzoato de metilo (E218), parahidroxibenzoato de propilo (E216), edetato dissódico, glicerol, vaselina branca, colesterol, miristato de isopropilo, óleo de amendoim, óleo de amêndoas refinado, álcool olefílico e água purificada). Outro exemplo é o Medicamento Visudyne® contendo o FS verteporfina numa formulação composta por dimiristoil fosfatidilcolina, o fosfatidilglicerol do ovo, o palmitato de ascorbilo, o butil-hidroxitolueno (E321) e a lactose mono-hidratada. Este medicamento é utilizado no tratamento da degeneração macular da retina relacionada à idade. (GONZÁLEZ-DELGADO, 2015).

Neste sentido, este trabalho visa o desenvolvimento de uma formulação simples na forma gel para incorporação de fotossensibilizadores com a finalidade de aplicação em terapia fotodinâmica. Os géis são sistemas semissólidos nos quais o movimento do meio dispersante é restrito por uma rede tridimensional de partículas interlaçadas ou macromoléculas solvatadas presentes na fase dispersa. Pode estar envolvido um alto grau de interações físicas ou químicas. O aumento da viscosidade causado pelo entrelaçamento e consequente atrito interno é responsável pelo estado semissólido. Um gel pode consistir de filamentos torcidos e emaranhados que geralmente se mantêm unidos por ligações do tipo Van der Waals, formando regiões cristalinas e amorfas ao longo do sistema (LAPINSKI, 2008).

Para a formação de gel, tem-se como exemplo o polímero carbopol de caráter aniônico e hidrofílico, comumente empregado em preparações farmacêuticas (ISLAM, 2004). Quando disperso em água, o carbopol umecta e forma uma dispersão aquosa com valor de pH na faixa de 2,8 a 3,2. Neste estado pré-dissolvido a molécula de carbopol está extremamente enrolada e sua capacidade espessante é limitada (LAPINSKI, 2008). A Figura 13 mostra a estrutura química do monômero do polímero carbopol e um esquema ilustrando o polímero na sua forma não ionizada.

Figura 13 - Estrutura química do monômero do polímero carbopol (a) e esquema ilustrando o polímero de Carbopol na forma não ionizada (b)



Fonte: Rechia (2010)

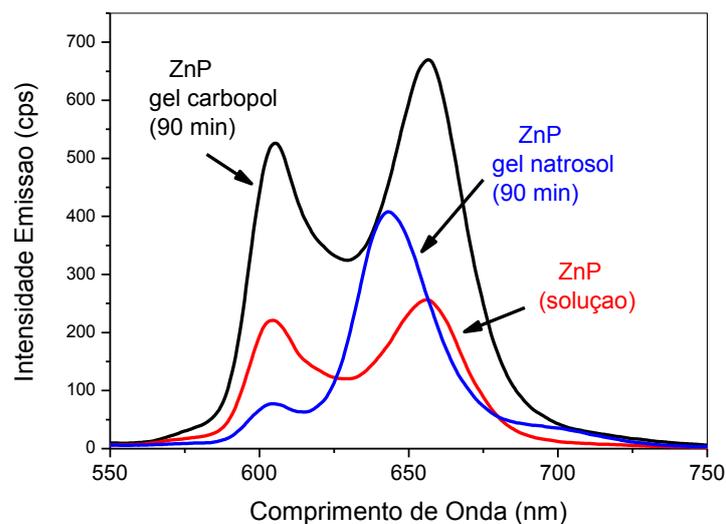
A formação do gel de carbopol ocorre principalmente em resposta a um aumento de pH, o máximo de viscosidade e transparência no gel é conseguido com o pH 7,0 aproximadamente, mas a faixa de pH 4 a 5,5 já é considerada aceitável para os quesitos mencionados (ISLAM, 2004; RECHIA, 2010; FOGED et al., 2014). Para obter a viscosidade

desejada, é necessária a neutralização com bases inorgânicas, como o hidróxido de sódio ou aminas de baixo peso molecular, como exemplo, a trietanolamina. Ao acrescentar trietanolamina ou hidróxido de sódio, o polímero “estica”, devido à neutralização dos grupos carboxilas presentes no polímero (LAPINSKI, 2008).

Entre as vantagens dos géis de Carbopol pode-se citar a capacidade de adquirir alta viscosidade com baixa concentração possuindo, ainda, amplo intervalo de viscosidade e bom comportamento de fluidez, além de possuírem propriedades bioadesivas, compatibilidade com muitos excipientes e ativos, apresentarem bom comportamento reológico, e permanecerem maior tempo no local de aplicação (RECHIA, 2010).

Além das vantagens citadas, a escolha do gel carbopol 940 para este estudo foi baseada em experimentos anteriores realizados pelo grupo, os quais indicaram preliminarmente uma boa estabilidade óptica e estrutural da porfirina em estudo ZnP em formulação gel carbopol (composição m/m: 2% carbopol 940, 1,3% trietanolamina e 0,1% conservante metilparabeno) (ALMEIDA, 2015). Foram realizados também, estudos comparativos entre a formulação de gel de carbopol e a de natrosol (2% Natrosol, 3% glicerina e 0,2% metilparabeno). Este último indicou uma possível degradação de porfirina detectada por um deslocamento do espectro de emissão após incorporação ao gel, conforme Figura 14 (ALMEIDA, 2015).

Figura 14 - Espectro de emissão de ZnP, antes e 90 min após a incorporação em gel natrosol e gel carbopol, excitação em 429 nm com concentração em 5×10^{-6} mol.L⁻¹



Fonte: Almeida (2015)

5. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

A forma mais direta de detecção de oxigênio singlete é realizada através de sua luminescência. Tais medidas são baseadas na verificação da emissão do decaimento radiativo do oxigênio singlete, no comprimento de onda de 1270 nm. No entanto, o decaimento radiativo destas espécies requer sistemas altamente sensíveis de detecção. Além destes, outros métodos possíveis de detecção são: ressonância paramagnética eletrônica, calorimetria, fotoionização, espectroscopia de massa, uso de sondas (*scavengers*) ou uso de métodos químicos que investigam a ação do oxigênio singlete sobre outras substâncias (TOFFOLI, 2008).

O método químico indireto usando p-nitrosodimetilanilina (RNO) é um procedimento utilizado como um teste sensível e seletivo para a detecção do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) originado em soluções aquosas. O método consiste na degradação do RNO que ocorre como consequência da captura do $^1\text{O}_2$ pela L-histidina. O $^1\text{O}_2$ ao reagir com L-histidina forma um composto intermediário bastante reativo, o qual é capaz de reagir e induzir a degradação e perda de coloração do RNO, processo pelo qual muda o valor da absorvância medida à 440 nm (KRALJIC; MOHSNI, 1978; TOFFOLI, 2008; OLIVEIRA, 2009).

Conforme ocorre a degradação do RNO, ou seja, conforme se dá a formação de oxigênio singlete, maior é a queda na densidade óptica neste comprimento de onda. Portanto, quanto mais rápida for esta diminuição no referido comprimento de onda, melhor será o fotossensibilizador em termos de geração de oxigênio singlete (TOFOLLI, 2008).

METODOLOGIA

6. METODOLOGIA

6.1. MATERIAIS

A porfirina hidrossolúvel utilizada foi a Zn (II) meso-tetrakis (N-etilpiridínio-2-il) porfirina, ou simplesmente ZnTE-2-PyP⁴⁺, obtida e purificada através da colaboração com o Dr. Júlio Santos Rebouças, professor da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O azul de metileno (NEON), PM 319,85 g.mol⁻¹. Os reagentes N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) 97% e L-histidina 99%, ambos da Sigma Aldrich®. O Carbopol 940 (Vetec, PA) e trietanolamina (Smartquímica, PA).

6.2. MÉTODOS

6.2.1. Preparo da solução contendo fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (ZnP e AM) foram diluídos em água destilada até atingir a concentração de 5 µM (10⁻⁶ mol.L⁻¹). Todas as amostras foram preparadas no dia das análises. Além disso, durante a preparação e análise evitou-se a exposição das amostras à luz ambiente.

6.2.2. Preparo da formulação em gel

A preparação da formulação em gel foi baseada na metodologia descrita por Lachman, Lieberman e Kanig (2001). Na preparação do gel base de carbopol utilizou-se carbopol 940 (1g), trietanolamina (1 mL) e 100 mL de água destilada com pH 7,0 a partir de agitação mecânica obtida através de um mixer, obtendo-se 100 g do gel carbopol com pH 6,0. Os componentes da formulação estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Componentes do gel Carbopol

COMPONENTES	QUANTIDADE (100 g)
Carbopol® 940	1%
Trietanolamina	1%
Água destilada	qsp – 100%

Após a preparação, os fotossensibilizadores Azul de metileno e a Zincoporfirina foram incorporados ao gel carboxil a fim de obter FS a uma concentração final de $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ na formulação. Durante a preparação e análise evitou-se a exposição das amostras à luz ambiente para todas as formulações contendo fotossensibilizadores. Todas as amostras foram preparadas no dia das análises.

6.2.3. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada através da utilização do pHmetro de bancada digital marca METTLER TOLEDO modelo S20 SevenEasy, calibrado com as soluções determinadas pelo próprio equipamento. O pH das amostras em solução e em gel foi determinado diretamente na preparação (DAS; NAYAK; NANDA, 2013).

6.2.4. Determinação de Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com metodologia descrita por Zanin et al. (2001). Uma amostra de 1 mL (determinado em uma seringa) foi introduzida sobre uma placa suporte de vidro (20 cm x 20 cm) e sob esta placa foi posicionada uma folha de papel milimetrado. Sobre a amostra foram adicionadas 4 placas de vidro de pesos pré-determinados e após 1 minuto da inclusão de cada placa foi calculada a superfície abrangida através da medição do diâmetro em duas posições opostas, com posterior cálculo do diâmetro médio. Calculando-se em seguida, a espalhabilidade (E_i) através da Equação 1.

$$E_i = \frac{d^2 \times \pi}{4} \quad (1)$$

Onde:

E_i = espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2)

d = diâmetro médio (mm)

$\pi = 3,14$

Foram acrescentadas sucessivamente 4 placas para o estudo com peso variável entre 208 g e 212 g perfazendo um total de 844 g quando usadas todas juntas. Os valores da

espalhabilidade em função do peso das placas foram determinados através de 3 medições, calculando-se a média entre elas. Os resultados são descritos como curvas massa adicionada *versus* área resultante.

6.2.5. Determinação de Viscosidade

As medidas de viscosidade foram realizadas com base na metodologia descrita por Borghetti e Knorst (2006), utilizando o viscosímetro Brookfield, modelo DV-I, spindle 4. As amostras dos géis foram analisadas em triplicata, com temperatura a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$. O valor de velocidade de rotação do spindle empregado foi 0,3 rpm. E as leituras foram realizadas com valor de torque $100\% \pm 1$.

6.2.6. Detecção indireta de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para detecção da produção de ROS foi utilizado o método químico indireto utilizando-se N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e a L-histidina (TOFFOLI, 2008). Em uma cubeta de quartzo com um volume total de 1 mL e com 1 cm de caminho óptico, as seguintes substâncias químicas foram utilizadas: N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e L-histidina, com concentrações de $13 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e 15mmol.L^{-1} , respectivamente. O fotossensibilizador foi diluído em água destilada até atingir a concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A irradiação das amostras em solução e na formulação gel contendo ZnP foi realizada através do fotopolimerizador modelo Lecprime WL (MM Optics), emitindo em $450 \pm 10 \text{nm}$ e potência nominal 900mW/cm^2 . As amostras contendo azul de metileno foram irradiadas com laser modelo DUO (MM Optics) emitindo a 660nm e potência $100 \text{mW} \pm 20\%$. Espectros de absorção eletrônica foram registrados entre 350 e 700 nm. Todas as amostras foram irradiadas (conforme demonstrado no registro da Figura 15) por um intervalo de tempo de 5 minutos e a cada 20 segundos foi verificada a absorção no comprimento de onda de 440 nm, este refere-se ao comprimento de onda máximo de absorção do RNO. Tais medidas foram realizadas em triplicata para assegurar a significância estatística do método. Para as leituras empregou-se o espectrofotômetro modelo Lambda 650 UV/Vis, fabricante Perkin Elmer, situado na Central analítica do Departamento de Química Fundamental (UFPE).

A produção de ROS equivale à queda na densidade óptica do RNO, dessa forma a quantificação de ROS foi avaliada a partir do coeficiente angular da reta, e percentual de produção de ROS calculado a partir das Equações 2 e 3.

$$RNOc = \frac{ABS_f \times 100}{ABS_i} \quad (2)$$

$$ROSp = 100 - RNOc \quad (3)$$

Onde:

$RNOc$ = percentual de RNO consumido

ABS_i = absorvância inicial do fotossensibilizador

ABS_f = absorvância final do fotossensibilizador

$ROSp$ = percentual de produção de ROS

Figura 15 - Forma de irradiação das amostras realizadas com LED e laser nesta pesquisa



6.2.7. Caracterização por espectroscopia de excitação e emissão

Os espectros de emissão e excitação das soluções e das formulações contendo fotossensibilizadores na concentração $5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, foram analisados por fluorímetro Perkin Elmer, modelo LS55 – *Fluorescence Spectrometer*. A solução de azul de metileno foi

excitada no comprimento de onda de 660 nm, enquanto que a formulação contendo zincoporfirina foi excitada em $\lambda = 450$ nm.

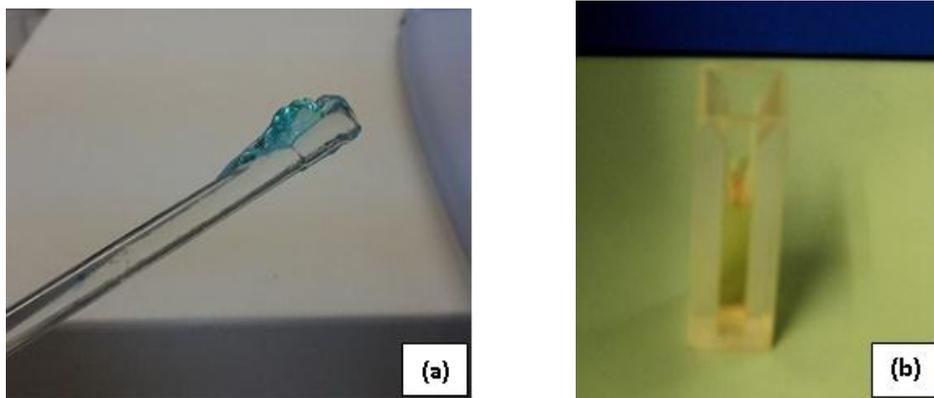
RESULTADOS E DISCUSSÃO

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. ASPECTO MACROSCÓPICO DAS FORMULAÇÕES

As formulações em gel apresentaram-se estáveis, sem separação de fases antes e após a incorporação dos fotossensibilizadores. O gel contendo azul de metileno apresentou coloração azul, cor característica do ativo (Figura 16a). Enquanto que, o gel contendo zincoporfina apresentou leve coloração amarela, também característica do FS empregado (Figura 16b).

Figura 16 - Registro fotográfico da formulação de gel carbopol contendo azul de metileno (a) e da formulação de gel carbopol contendo ZnP (b), sob luz ambiente



7.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES

7.2.1. Determinação de pH e viscosidade

Os resultados de pH de todas as formulações apresentaram-se na faixa 5,53 – 6,24. Esta faixa de pH indica boa proximidade ao pH normal da pele que é levemente ácido, entre 4,6 – 5,8 (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002) além de contribuir com a estabilidade do gel, permanecendo próximo à neutralidade. Os resultados de viscosidade mostram que as diferenças entre os valores de pH não influenciaram no comportamento dos géis. O pH das formulações, bem como da viscosidade, está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Potencial hidrogeniônico (pH) e viscosidade das formulações contendo azul de metileno e zincoporfirina a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$

Formulações	pH	Desvio padrão	Viscosidade (cp)	Desvio padrão
Solução de AM	5,53	0,10	-	-
Solução de ZnP	5,61	0,11	-	-
Gel carbopol	6,00	0,07	2×10^6	0,0
Gel carbopol + AM	6,24	0,05	2×10^6	0,0
Gel carbopol + ZnP	6,16	0,06	2×10^6	0,0

Segundo Alves (2006), a viscosidade é uma expressão da resistência ao fluxo de um fluido, uma vez que quanto maior a viscosidade, maior a resistência do líquido para escoar. Além disso, a determinação deste parâmetro é fundamental para o desenvolvimento tecnológico, pois estas características podem influenciar a estabilidade física do sistema, afetar o desempenho, a espalhabilidade, a absorção, as características sensoriais e as finalidades de uso. Islam (2004) afirma que o comportamento reológico dos géis de carbopol não altera apreciavelmente na faixa de pH 5,0 - 8,0.

Ao analisar a Tabela 2, percebe-se que a viscosidade das formulações não sofreu alteração após a incorporação dos fotossensibilizadores, permanecendo com valores de 2×10^6 cp. Este resultado, aliado aos valores de pH, confirma a hipótese de que a diferença nos valores de pH, a qual reflete também a baixa concentração do FS, não interferiu nas propriedades reológicas das formulações.

7.2.2. Espalhabilidade

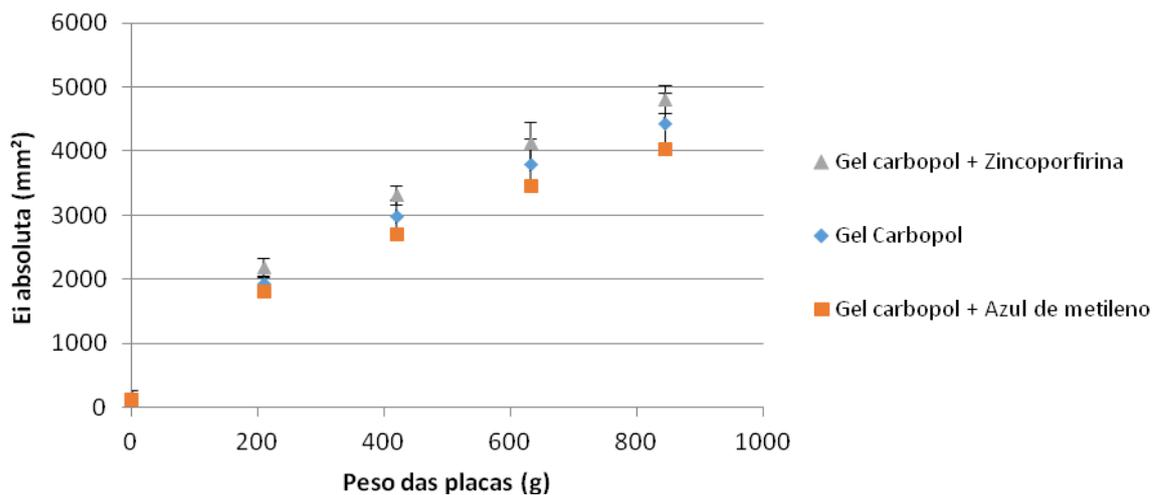
O teste de espalhabilidade se baseia na resistência da formulação semissólida ao movimento forçado. A determinação de sua espalhabilidade está diretamente relacionada com a eficácia de aplicação no local de absorção ou ação, ou seja, quanto maior a espalhabilidade maior será sua absorção pela pele. Os resultados apresentados na Tabela 3 correspondem à relação entre a área de espalhamento com a força aplicada sobre o produto (CORDEIRO *et al.*, 2013).

Tabela 3 - Resultados de espalhabilidade (em mm²) das formulações semissólidas contendo ou não o ativo.

Peso das placas (g)	Gel carbopol + Azul de metileno	Desvio padrão	Gel Carbopol	Desvio padrão	Gel carbopol + Zincoporfirina	Desvio padrão
0	130	21	126	11	177	90
209	1809	0	1938	119	2186	146
419	2717	27	2989	263	3317	144
631	3472	52	3799	390	4129	322
844	4032	86	4444	470	4808	217

De acordo com o gráfico evidenciado na Figura 17 (construído com os resultados descritos na Tabela 3), é possível verificar que estatisticamente o gel de carbopol não sofreu modificação nos valores de espalhabilidade após a incorporação dos ativos. A afirmação de Alves (2006) em que há uma correlação entre os resultados de espalhabilidade e os valores de viscosidade em formulações em gel confirma a hipótese de que após incorporação dos ativos, não houve alteração nas características de viscosidade e espalhabilidade dos géis, possivelmente devido à pequena concentração final dos FS (5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

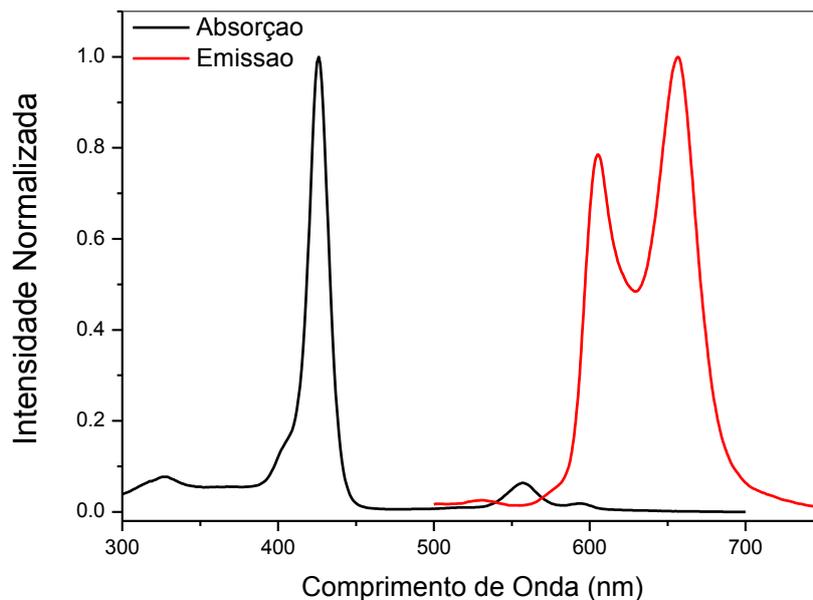
Figura 17 - Descrição do comportamento de espalhabilidade absoluta (Ei) dos géis a base de carbopol contendo ou não os ativos.



7.3. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DAS FORMULAÇÕES

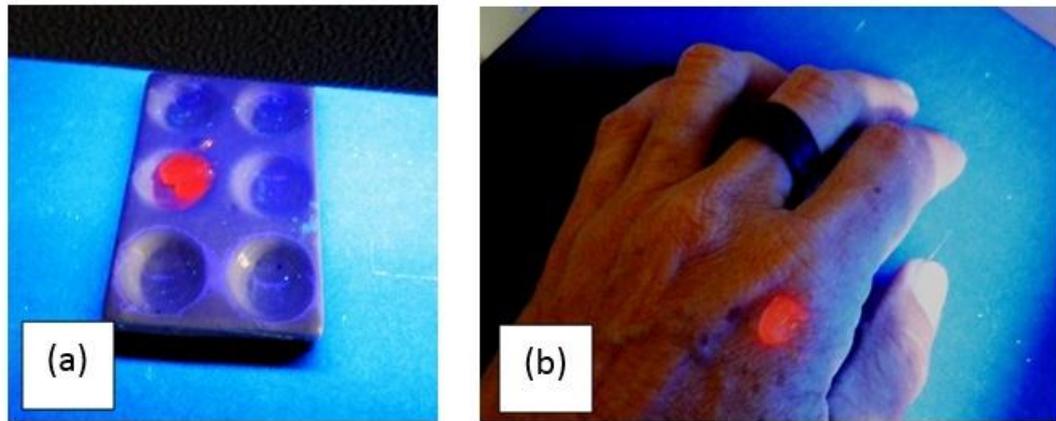
Os espectros de absorção e emissão de soluções aquosas ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) de ZnP estão apresentados na Figura 18. Observam-se as bandas normais esperadas para este composto: duas regiões de absorção, com máximo em 429 nm (que corresponde à Banda de Soret); e duas bandas de emissão na região do vermelho com máximos em $\lambda_1 = 606 \text{ nm}$ e $\lambda_{12} = 656 \text{ nm}$. De acordo com a Figura 3b, a região entre 600 e 680 nm é a de maior penetração na pele. Portanto, a emissão da ZnP apresenta alto potencial de transmissão pela pele e, portanto, de maior eficácia de aplicação da TFD em camadas mais profundas da pele

Figura 18 - Espectro de absorção (em preto) e de emissão (em vermelho) normalizados de uma solução de ZnP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Exc: 450 nm



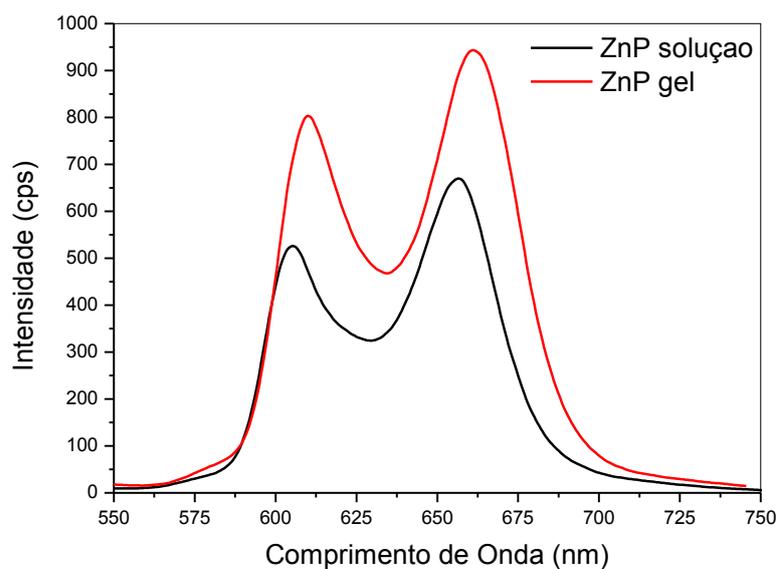
A eficácia do efeito do FS na TFD também depende da fonte de excitação. Para os experimentos de avaliação de formação de espécies reativas de oxigênio relacionadas à ZnP foi utilizada a fonte com excitação $\lambda = 450 \pm 10 \text{ nm}$. Apesar do comprimento de onda 450 nm se situar no fim da banda de absorção máxima da porfirina, a largura de banda equivalente a 10 nm cobre parte do máximo da banda de absorção promovendo a excitação do sistema. A emissão da amostra de ZnP tanto na solução quanto no gel fica bem evidenciada. A Figura 19 apresenta registros fotográficos da emissão característica da ZnP na formulação gel sob excitação de fonte no UV (365 nm).

Figura 19 - Registros fotográficos da formulação de gel de carbopol contendo ZnP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) iluminada por fonte de UV (365 nm) em placa cerâmica (a) e em pele humana (b) evidenciando a fluorescência característica da porfirina na região do vermelho



Os espectros de emissão da formulação e da solução contendo ZnP mostram que o perfil da banda de emissão deslocou-se 5 nm após a incorporação quando comparado ao da solução (Figura 20). Este deslocamento sugere alguma alteração no conjunto de estados eletrônicos da porfirina, provavelmente devido à interação de caráter eletrostático com a rede polimérica do carbopol.

Figura 20 - Espectro de emissão da ZnP em solução e na formulação gel, ambas com concentração $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Exc: 450 nm. Fendas ZnP solução: 10/10; ZnP gel: 10/9,5



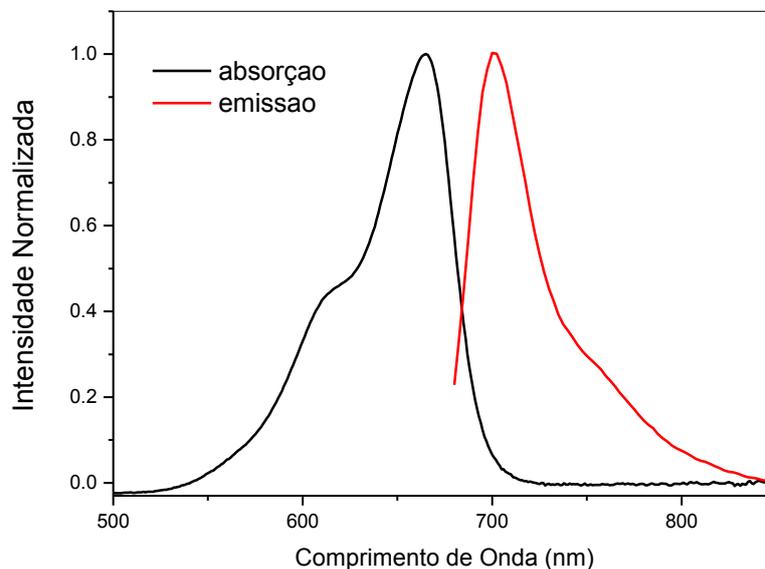
Com relação à intensidade de emissão na formulação em gel observa-se um aumento superior a 50% com relação ao ativo na mesma concentração em solução. Este efeito pode

ocorrer devido ao melhor aprisionamento da luz de excitação dentro da formulação em gel favorecendo uma maior efetividade na excitação alcançando um maior número de moléculas de ZnP.

Os espectro de absorção e emissão da solução contendo o azul de metileno na concentração $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ estão apresentados na Figura 21. A banda de absorção mostra um máximo em torno de $\lambda = 664 \text{ nm}$.

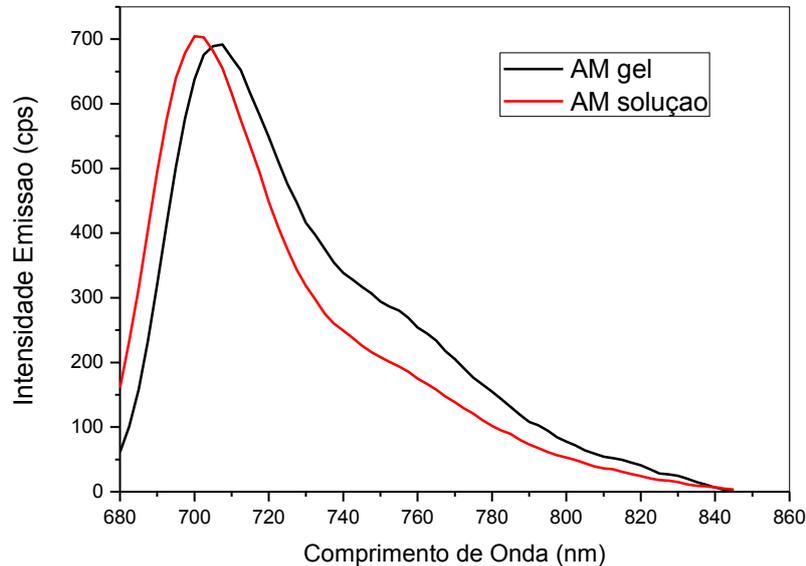
A solução contendo azul de metileno foi excitada em comprimento de onda de 660 nm, com máximo de emissão observado em $\lambda = 701 \text{ nm}$. Diferente do perfil observado para a ZnP, o máximo de absorção encontra-se bem próximo ao de emissão, evidenciando um deslocamento de Stokes de 42 nm. Neste caso a fonte de excitação para geração de ROS (660 nm) é coincidente com a capacidade máxima de absorção e conversão energética do azul de metileno.

Figura 21 - Espectro de absorção (em preto) e de emissão (em vermelho) normalizados de uma solução de AM ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Exc: 660 nm



Quando comparados os espectros de emissão do AM na solução e após incorporação no gel (Figura 22), para uma mesma concentração ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) observa-se um perfil espectral muito similar com um pequeno deslocamento ($\sim 5 \text{ nm}$) para a região de menor energia, semelhante ao observado para a formulação ZnP-gel. Sugere-se que também uma interação eletrostática ou de forças intermoleculares fracas entre o AM e as cadeias poliméricas possam ter resultado nesta alteração energética.

Figura 22 - Espectro de emissão do AM em solução e na formulação gel, ambas com concentração $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.
Exc: 660 nm



7.4. DETECÇÃO INDIRETA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

7.4.1. Produção de ROS pelo FS ZnP

As Figuras 23 e 24 apresentam a variação na intensidade espectral do RNO nas formulações em solução e em gel contendo zincoporfirina/RNO e L-Histidina, respectivamente, após irradiação com fonte em 440 ± 10 nm durante o período de 0 a 5 minutos de irradiação.

Ao observar o perfil de degradação do RNO tanto na solução quanto no gel, observa-se a diminuição de sua concentração e que esta degradação ocorreu com taxas diferentes no período observado para cada sistema. A degradação confirmou a produção de moléculas reativas de oxigênio induzidas pela irradiação da zincoporfirina. Além disso, verificou-se nos dois casos que a degradação do RNO foi linear, com coeficiente de correlação $R^2 = 0,99$ (ANVISA, 2003). Ou seja, a diminuição da absorbância em 440 nm é proporcional ao tempo de irradiação, mostrando que não há um intervalo de tempo mínimo necessário para o início do processo de formação de ROS (TOFFOLI, 2008).

Figura 23 - Estimando a produção de ROS através da degradação de RNO na solução ZnP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), monitorando-se a variação da intensidade a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Espectros registrados após 20s de irradiação com fonte LED (450 nm) por um período de 0 a 300s

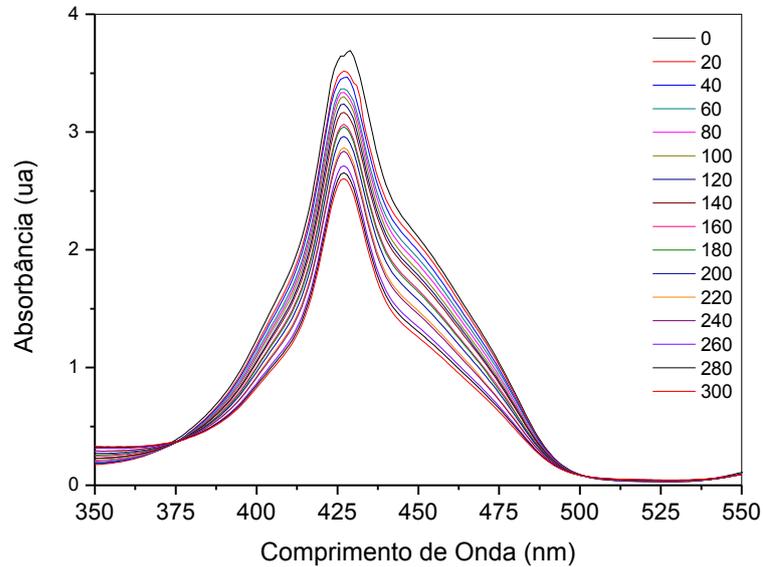
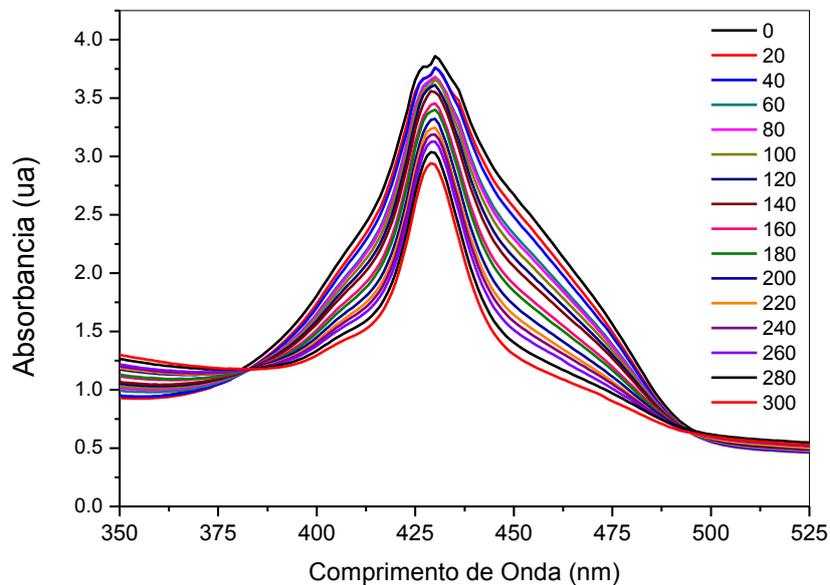
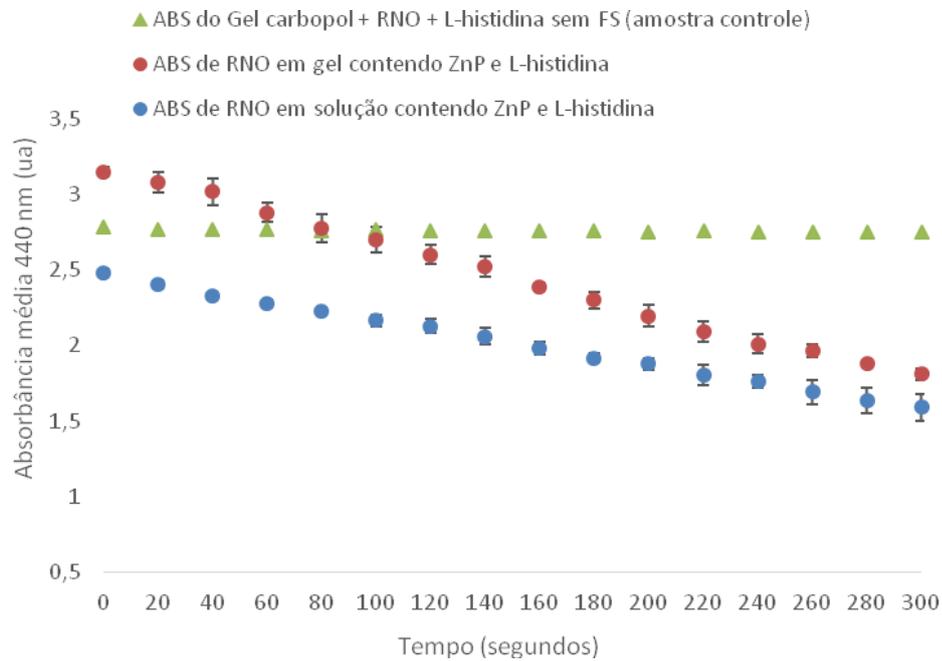


Figura 24 - Estimando a produção de ROS através da degradação de RNO na formulação gel contendo ZnP ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), monitorando-se a variação da intensidade a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Espectros registrados após 20s de irradiação com fonte LED (450 nm) por um período de 0 a 300 s



Para ambos conjuntos espectrais observou-se um decréscimo em toda a faixa, mais notadamente no máximo de absorção. Com base nos valores máximos de absorvância do RNO (440 nm) foram construídas as curvas (com a média de valores em triplicata) que indicam o grau de degradação deste componente pela produção de ROS (Figura 25).

Figura 25 - Variação da intensidade de absorção de RNO em $\lambda = 440$ nm em função do tempo de irradiação com LED (450 nm) para as formulações (solução e gel) contendo zincoporfirina a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$



Como observado, o tempo de irradiação favorece a degradação de RNO e de acordo com Toffoli (2008), quanto mais rápida for esta diminuição da intensidade da banda no comprimento de onda analisado, melhor será a eficiência do fotossensibilizador em termos de geração de ROS. Ao avaliar os valores de coeficiente angular dessas formulações (-0,0590 em solução e -0,0933 em gel), tem-se que quanto maior o ângulo de inclinação da reta, mais rápida é a taxa de degradação de RNO indicando uma cinética mais rápida para a produção de ROS. Ao se efetuar o cálculo de percentual de produção de ROS, observou-se que a ZnP em solução resultou em 36% de produção de ROS, enquanto que a formulação em gel produziu 42% de ROS. Dessa forma, percebe-se um aumento de 6% na produção de ROS para a formulação em gel, se comparada à solução. Sugere-se que para essa formulação, a presença do gel carbopol influenciou significativamente e positivamente no aumento de produção de ROS e uma das evidências é o aumento significativo da intensidade de emissão desta formulação, conforme verificado anteriormente. Sugere-se que este aumento da eficiência de emissão tenha influenciado positivamente para a produção de ROS e, portanto, uma melhor eficiência da ZnP na formulação gel.

A Figura 25 apresenta ainda, o resultado da amostra controle, o qual evidencia que não há degradação de RNO em formulação contendo gel carbopol/RNO e L-histidina na ausência de FS.

7.4.2. Produção de ROS pelo FS Azul de metileno

As Figuras 26 e 27 apresentam a variação na intensidade espectral do RNO nas formulações em solução e em gel contendo azul de metileno/RNO e L-Histidina, respectivamente, após irradiação com fonte laser a 660 nm durante o período de 0 a 5 minutos de irradiação.

Figura 26 - Estimando a produção de ROS através da degradação de RNO na solução de AM ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), monitorando-se a variação do perfil espectral e intensidade a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Espectros registrados a após 20s de irradiação (660 nm) por um período de 0 a 300 s

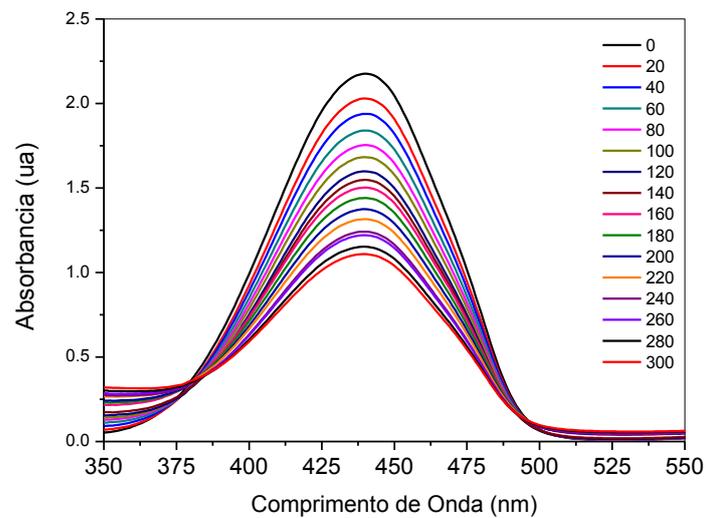
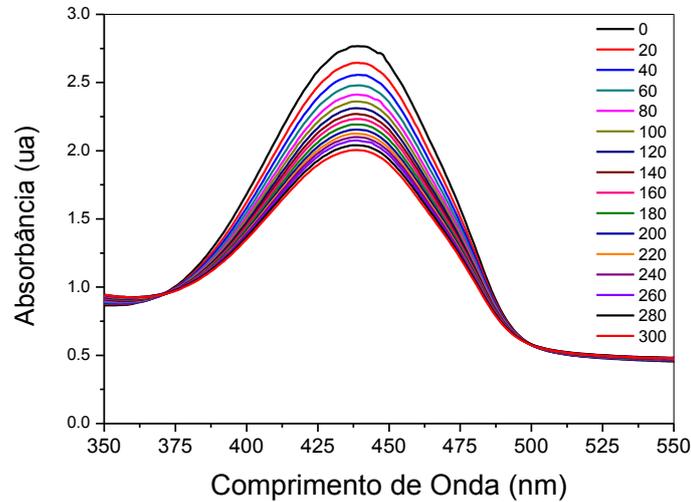
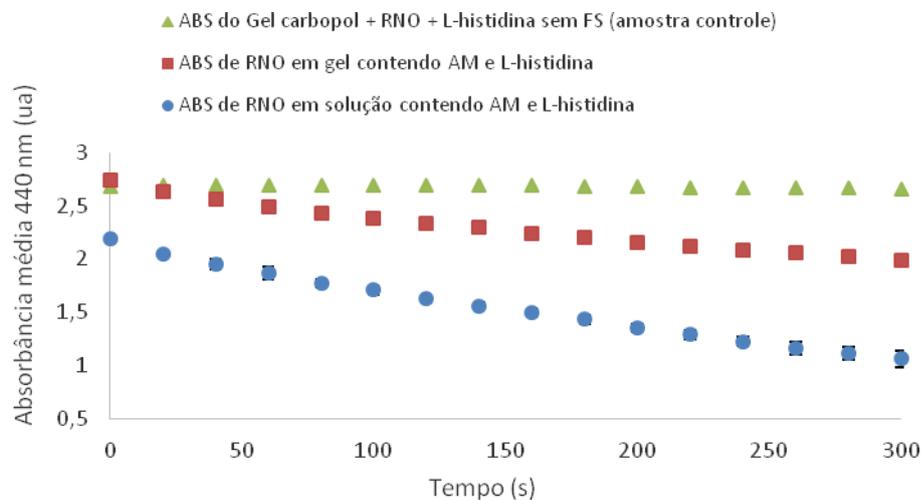


Figura 27 - Estimando a produção de ROS através da degradação de RNO na formulação AM + gel ($5 \mu\text{mol.L}^{-1}$), monitorando-se a variação do perfil espectral e intensidade a $\lambda = 440 \text{ nm}$. Espectros registrados após 20s de irradiação (660 nm) por um período de 0 a 300 s



Em solução o azul de metileno apresentou eficiência em geração de ROS em torno de 52%, valor comparável a valores reportados na literatura. No entanto, ao ser incorporado em gel de carbopol, apresentou uma redução de 25% na produção de ROS. A Figura 28 apresenta a comparação entre as duas formulações e os resultados da amostra controle, a qual indica que não há degradação de RNO em formulação contendo gel carbopol/RNO e L-histidina na ausência de FS.

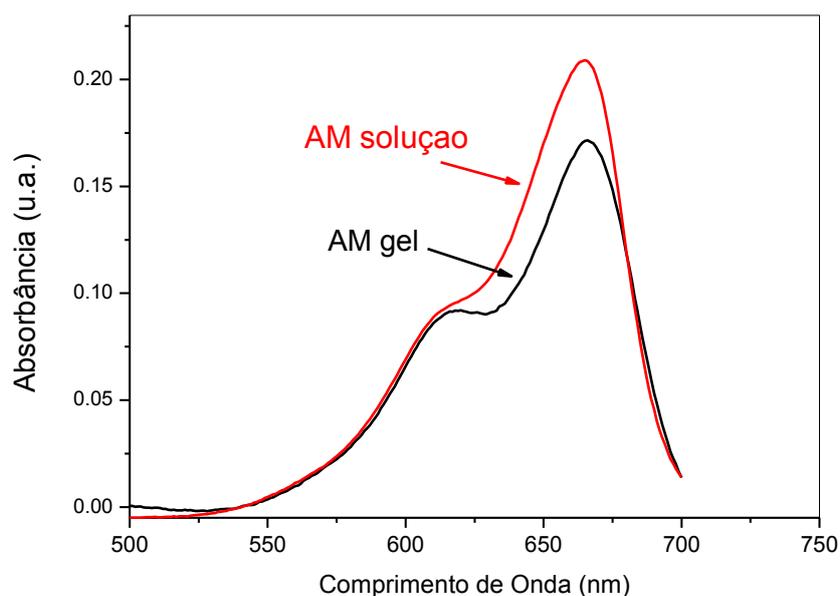
Figura 28 – Variação da intensidade de absorção de RNO em $\lambda = 440 \text{ nm}$ em função do tempo de irradiação com laser (660 nm) para as formulações (solução e gel) contendo azul de metileno a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$



As hipóteses para o decaimento da geração de ROS do AM na formulação em gel estão associadas às interações intermoleculares entre o AM e as cadeias do gel ou à auto supressão de fluorescência devido á possível redução de mobilidade do AM. A molécula de azul de metileno com carga levemente positiva tem possibilidade de interagir com a malha polimérica do gel carbopol. Esta interação supramolecular pode levar à redução da mobilidade das moléculas deste FS, reduzindo a seção de choque com o oxigênio livre dissolvido no meio aquoso.

Outra possibilidade é a dimerização das moléculas de AM. Isto acarretaria na redução de sua eficiência. Este efeito já foi reportado na literatura (SEVERINO et. al., 2003) e causaria uma alteração espectral caracterizando a presença das duas espécies, monômero e dímero. Para verificar esta hipótese foi comparado o espectro de absorção do AM em solução com o obtido em gel. Como o gel possui uma densidade óptica relativamente alta, causando espalhamento homogêneo em todos os comprimentos de onda, sua contribuição foi retirada do espectro e os perfis de banda comparados. A Figura 29 mostra a comparação da região espectral de absorção das espécies (monômeros têm máximo de absorção em torno de 664 nm e dímeros em torno de 590 nm). O perfil de absorção do AM na Figura 29, em ambos sistemas, é relativamente equivalente excluindo a possibilidade de formação de dímeros. A concentração relativamente baixa do AM também reduz a probabilidade de dimerização.

Figura 29 - Perfil espectral do azul de metileno em solução e em formulação gel a $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$



A autosupressão pode também ser resultante da atração das moléculas catiônicas do AM com a malha do carbopol, levando à redução de movimento e menor probabilidade de um maior número de espécies absorverem a radiação incidente. Isto fica ainda mais complexo quando se observa o espectro de absorção e o de emissão do AM (Figura 21) no qual se evidencia um pequeno deslocamento de Stokes e uma região espectral de grande superposição da banda de absorção e a de emissão. Assim, ao emitir luz quando irradiada ocorre a possibilidade de absorção desta luz pelo AM, reduzindo sua eficiência para geração de ROS.

De uma forma geral todas estas possibilidades podem ser testadas realizando-se estudos da dependência da concentração da espécie na formulação semissólida com a eficiência de produção de ROS e caracterização da interação das espécies através de espectroscopia vibracional no infravermelho ou até calorimetria diferencial exploratória.

Comparando-se ambos FS, com relação à eficiência de produção de ROS, observa-se que para uma mesma concentração, o sistema mais eficiente é AM em solução, com 52% de geração de ROS. Por outro lado, quando na formulação gel, o FS mais eficiente é a zincoporfirina, com uma produção de ROS de 42%. Este resultado é muito interessante e demonstra a possibilidade de aplicação tópica deste sistema. Até o momento há poucos relatos de uso da ZnTE-2-Pyp (ZnP) na literatura, mas já foi demonstrada sua capacidade de aniquilamento de células patológicas, como por exemplo, células de *E. coli* (BENOV, 2002) e *Leishmania amazonensis* (VIANA, 2015). Além disso, Benov e col. (2002) demonstraram que a ZnP (tanto na forma orto, meta ou pára) apresentou capacidade de fotoinativação da *E. coli* bem superior ao do azul de metileno (para a mesma concentração).

A pré-formulação obtida neste trabalho é simples e apresenta uma boa capacidade de espalhamento na pele, mantendo ainda a capacidade de produção de ROS. O conjunto de resultados sugere a necessidade de continuidade deste trabalho com testes *in vitro* e *in vivo*, bem como com o estudo da natureza da interação dos ativos dentro da malha do hidrogel.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

8. CONCLUSÕES

- Foi observado que não houve alteração macroscópica nas formulações após incorporação dos fotossensibilizadores ao gel carbopol.
- A incorporação de FS nas preparações semissólidas contendo gel carbopol resultaram em boa estabilidade física, evidenciada a partir dos resultados de pH, viscosidade e espalhabilidade das formulações.
- Os espectros de emissão de ZnP apresentaram alto potencial de transmissão pela, demonstrando maior eficácia de aplicação da TFD em camadas mais profundas da pele. As zincoporfirinas e o azul de metileno, ainda em solução, apresentaram boa resposta na produção de ROS (36 e 52%, respectivamente) nas mesmas concentrações.
- Comparando-se ambos FS, com relação à eficiência de produção de ROS, observa-se que para uma mesma concentração, o sistema mais eficiente é AM em solução, com 52% de produção de ROS. Por outro lado, quando na formulação gel, o FS mais eficiente é a zincoporfirina, com uma produção de ROS de 42%.
- O conjunto de dados obtidos são inéditos e relevantes, considerando a possibilidade de aplicação tópica deste sistema em TFD.

8.1. PERSPECTIVAS

- Verificar compatibilidade das formulações contendo conservantes.
- Realizar estudo de estabilidade dos sistemas.
- Verificar a potencialização fotodinâmica dos sistemas contra cultura de *leishmanias* em ensaios *in vitro*.
- Medir o rendimento quântico dos fotossensibilizadores em meio aquoso.
- Otimização das formulações para sistemas vetorizados.
- Verificar o tempo de irradiação considerando a aplicação *in vivo*.
- Aplicação *in vitro* e *in vivo* dos sistemas semissólidos contendo FS e monitoramento através de análises bioquímicas.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, P., *et al.* Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, p.250-281, 2011.
- AKILOV, O. E.; KOSAKA, S.; O'RIORDAN, K.; HASAN, T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2007.
- ALMEIDA, V. A. de. **Desenvolvimento de Formulação Farmacêutica com Fotossensibilizadores para Terapia Fotodinâmica.** 2015. 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2015.
- ALVES, M. P. Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea in vitro. 2006. 183 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- ALVES, J. F. S. Porfirinas e terapia fotodinâmica em neoplasias. Dissertação - Mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014. 84 p.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos 6ed ed. São Paulo: PREMIER, 2000, p. 1-568.
- ANVISA. RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2003.
- BATINIC'-HABERLE, I.; REBOUÇAS, J. S.; SPASOJEVIC', I. Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology, and Therapeutic Potential. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, p.42, 2010.
- BEGA, P. C. Síntese e caracterização da nova porfirina, meso-TETRAKIS(4-BUTÓXI-3-METÓXIFENIL) PORFIRINA, e seus derivados metalados. Dissertação - Mestrado, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Ponta Grossa, 2008.
- BENOV, L., BATINIC-HABERLE, I., SPASOJEVIC, I., FRIDOVICH, I. Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers. *Arch Biochem Biophys* 2002 Jun;402(2):159-65
- BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Rio Grande do Sul, v. 42, n. 4, p.531-537, 2006.
- CASAS, A.; BATTAH, S.; DI VENOSA, G.; DOBBIN, P.; RODRIGUEZ, L.; FUKUDA, H.; BATLLE, A.; MACROBERT, A. J. Sustained and efficient porphyrin generation in vivo using dendrimer conjugates of 5-ALA for photodynamic therapy, *Journal of Controlled Release*, v. 135, p. 136-143, Apr.2009.

CERIZE, N. N. P. Estudo de Sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica. Tese - Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CORDEIRO, M. S. F., *et al.* Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **Revista Brasileira de Farmácia**, p.5, 2013.

COSTA, L. D. S. Síntese e Caracterização de Porfirinas como Potenciais Agentes Fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica. Dissertação - Mestrado, Departamento de Ciências da vida, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013. 138 p.

DAS, B.; NAYAK, A. K.; NANDA, U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: Preparation and in vitro skin permeation. **International Journal of Biological Macromolecules**, India, n. 62, p.514-517, 2013.

DERYCKE, A. S. L., *et al.* Transferrin-Conjugated Liposome Targeting of Photosensitizer AlPcS4 to Rat Bladder Carcinoma Cells. **Journal of the National Cancer Institute**, p.1620-1630, November 3, 2004, 2004.

ETHIRAJAN, M., *et al.* The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chem Soc Rev**, p.22, 2011.

FOGED, Camilla et al. **Subunit Vaccine Delivery: Advances in Delivery Science and Technology**. New York: Springer, 2014. p. 431.

FONTANA, C. R.; JUNIOR, D. S. D.; BOSCO, J. M.; SPOLIDORIO, D. M.; MARCANTONIO, R. A. C. Evaluation of chitosan gel as antibiotic and photosensitizer delivery. *Drug Deliv.* 2008, 15, 417-422.

FRIEDERMANN, G. R. Estudo de porfirinas base livre e seus derivados de manganês por eletroquímica e espectro-eletroquímica de RPE e UV-Vis. Tese - Doutorado, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Curitiba, 2005. 224 p.

GARCEZ, A. S.; RIBEIRO, M. S.; NUÑEZ, S. C. Laser de baixa potencia: principios básicos e aplicações clínicas na odontologia. **Elsevier**, p.259, 2012.

GIANSANTE, S. Determinação da atividade fotodinâmica antimicrobiana de derivados porfirínicos. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Bioengenharia, Instituto de Engenharia Biomédica, Universidade Camilo Castelo Branco, São José dos Campos, São Paulo, 2014.

GONZÁLEZ-DELGADO, J. A., *et al.* Use of Photosensitizers in Semisolid Formulations for Microbial Photodynamic Inactivation. *J. Med. Chem.* 2015.

ISLAM, MOHAMMAD T. et al. Rheological Characterization of Topical Carbomer Gels Neutralized to Different pH. **Pharmaceutical Research**, USA, v. 21, n. 7, p.1192-1199, 28 mar. 2004.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p.11, 2010.

KRALJIC, I.; MOHSNI, S. E. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. **Photochemistry e Photobiology**, p.5, 1978.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na industria farmaceutica. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 2001.

LAPINSKI, T. F. Fotosensibilizadores naturais em terapia fotodinâmica antimicrobiana: desenvolvimento de creme e gel creme contendo extratos de *Alternanthera brasiliana* (AMARANTHACEAE). Dissertação - Mestrado, Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Universidade do Vale do Paraiba, São José dos Campos, São Paulo, 2008. 112 p.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 77, p.563-569, out. 2002.

LOVE, W. G.; VANDERZANDEN, B. C. H.; TAYLOR, P. W. Formulation of a zinc(II)-phthalocyanine-containing topical gel for photodynamic therapy of hyperproliferative skin conditions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1997, 23, 705–710.

MA, L.; XIANG, L. H.; YU, B.; YIN, R.; CHEN, L.; WU, Y.; TAN, Z. J.; LIU, Y. B.; TIAN, H. Q.; LI, H. Z.; LIN, T.; WANG, X. L.; LI, Y. H.; WANG, W. Z.; YANG, H. L.; LAI, W. Low-dose topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in the treatment of different severity of acne vulgaris. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2013.

MACCORMACK, M. A. Photodynamic Therapy in Dermatology: An Update on Applications and Outcomes. **Seminars in cutaneous medicine and surgery, Elsevier**, p.11, 2007.

MACHADO, A. E. D. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, p.237-243, 2000.

MENDES, M. C. Estudo das propriedades das porfirinas TMPyP e ZnTPPS4 para potencial aplicação em terapia fotodinâmica. Dissertação - Mestrado, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008. 125 p.

MENEZES, P. F. C. D. Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação com laser. Tese - Doutorado, INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Carlos, 2006.

MITTON, D.; ACKROYD, R. A brief overview of photodynamic therapy in Europe. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p.103-111, 6//, 2008.

MUSSI, L. Eficiência Fotodinâmica das Protoporfirinas IX de Magnésio e Zinco. Dissertação - Mestrado em Química, Instituto de Química UNICAMP, Campinas, 2003. 90 p.

NÚÑEZ, S. C. Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica. Tese - Doutorado, Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 146 p.

NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. Princípios da terapia fotodinâmica. **Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**, p.312, 2013a.

NUNEZ, S. C.; RIBEIRO, M. S.; GARCEZ, A. S. Princípios da terapia fotodinâmica. **Terapia Fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**, p.37, 2013b.

NYMAN, E. S.; HYNNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p.1-28, 1/23/, 2004.

OLIVEIRA, A. H. S. Análise das mudanças no perfil protéico durante o estresse oxidativo in vivo e atuação da muty-glicosilase em respostas celulares. Dissertação - Mestrado, Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2009.

OLIVEIRA, K T de et al. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, São Carlos, Sp, v. 1, n. 7, p.310-335, 2015.

PARSONS, C.; MCCOY, C. P.; GORMAN, S. P.; JONES, D. S.; BELL, S. E. J.; BRADY, C.; MCGLINCHEY, S. M. Anti-infective photodynamic biomaterials for the prevention of intraocular lens-associated infectious endophthalmitis. *Biomaterials* 2009, 30, 597–602.

PEIXOTO, I. N. Otimização de n-piridilporfirinas precursoras de moduladores redox de estresse oxidativo e estudos de distorção não-planar. Dissertação - Mestrado, Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

PEREIRA, M. R. D. C. Fotofísica de Porfirinas e Ftalocianinas em Matrizes de TiO₂ preparadas pelo método de Sol-Gel. Tese - Doutorado, UNIVERSIDADE DO MINHO, Braga, 2004. 217 p.

RECHIA, L. M. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de gel a base de extrato de *Melissa Officinalis* L. 2010. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p.1-8, 2009.

RYCHTARIKOVA, R.; SABATA, S.; HETFLEJS, J.; KUNCOVA, G. Composites with photosensitive 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin entrapped into silica gels. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2012, 61, 119–125.

SCHUITMAKER, J. J., *et al.* Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, p.3-12, 1996.

SENA, R. M. M. Efeitos da terapia fotodinâmica mediada por laser de emissão vermelha e azul de metileno em vaginite induzida por "Candida albicans". Tese - Doutorado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SEVERINO D., JUNQUEIRA H. C., GABRIELLI D. S., GUGLIOTTI M., BAPTISTA M. S. Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue. **Photochem Photobiol** 2003;77:459—68.

SILVA, J. A. M. E. Porfirinas e Porfirias. **Revista das Ciências Médicas da Universidade de Lourenço Marques**, p.55, 1971.

TARDIVO, J. P., *et al.* Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p.175-191, 2005.

TEGOS, G., *et al.* Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, 2012-April-10, 2012.

TOFFOLI, D. J. Caracterização espectroscópica de complexos Hipocrelina B: Lantanídeos para uso em terapia fotodinâmica. Dissertação - Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TOMAZINI, M. V., *et al.* Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p.535-541, 2007.

VAIDYANATHAN, V.; WIGGS, R.; STOHL, J.; BAXI, M. ALA-induced fluorescence in the canine oral cavity, *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 24, p. 383-388, June 2006.

VIANA, O. S. Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados à base de quantum dots livres e associados à porfirinas para aplicação em sistemas biológicos. Tese - Doutorado, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2015.

YAMADA JUNIOR, A. M. **Estudos dos efeitos da terapia fotodinâmica em periodontite induzida em ratos**. 2007. 91 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia Nuclear - Materiais, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.

ZANIN, S. M. W. *et al.* Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 2, n. 2, p.47-58, 2001.