

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo da fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando lipossomas e proteínas de *Moringa oleifera* como sistemas de entrega de fotosensibilizadores sintéticos e naturais.

BRUNO PEREIRA GARCÊS

UBERLÂNDIA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Estudo da fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando lipossomas e proteínas de *Moringa oleifera* como sistemas de entrega de fotosensibilizadores sintéticos e naturais.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química
Bioinorgânica

Orientado: Bruno Pereira Garcês

Orientador: Carlos Alberto de Oliveira

UBERLÂNDIA

2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 179/PPQUI.

DATA: 27/01/2014

DISCENTE: Bruno Pereira Garcês

MATRÍCULA: 11212QMI001

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo da fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando fotossensibilizadores naturais e sintéticos e sistemas de entrega de drogas.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química Bioinorgânica

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Avaliação da atividade de fotossensibilizadores sobre o crescimento de culturas de microorganismos utilizando-se lipossomos aditivados como sistema de entrega de drogas – Edital MCT/CNPq nº 14/2010 - Universal.

Às quinze horas do dia vinte e sete de janeiro do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Mirian Ribeiro Moreira, da UNIPAC, Wellington de Oliveira Cruz e Carlos Alberto de Oliveira, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Estudo da fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando lipossomos e proteínas de Moringa oleifera como sistema de entrega de fotossensibilizadores sintéticos naturais

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 18 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Mirian Ribeiro Moreira, Campo
Profª Dra. Mirian Ribeiro Moreira

UNIPAC

Wellington de Oliveira Cruz
Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz

IQUFU

Carlos Alberto de Oliveira

Orientador(a): Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira – IQUFU

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira por ser, além de orientador de iniciação científica e mestrado, um orientador de dança e uma referência profissional e pessoal durante estes quatro anos de muito trabalho, estudo e também diversão no Laboratório de Bioquímica e Fotobiologia.

A todos colegas de trabalho do LABIOFOT que me auxiliaram muito neste mestrado. Alberth, Renata, Marina, Senju, Marília, Gabriel, Thiago, Miguel, Ludmilla, Jacinta e principalmente Ana Caroline por ter sido uma grande parceira nesta fase.

Aos meus amigos Erick e Lucas por me ajudarem no LABIOFOT desde o início e ainda são grandes companheiros de atividades culturais.

A Thays e Vanessa, pessoas que conheci melhor em Outubro deste ano e já se tornaram tão importantes para mim.

Aos amigos do LAFIP, Ana Cristina, Heden e Renata por me aguentarem em seu laboratório enquanto trabalhavam.

A Mayta, secretária do Programa de Pós-Graduação em Química por me auxiliar tanto nestes dois anos de mestrado.

Ao Richard, companheiro de trabalhos, congressos, projetos, discussão de aulas, atividades culturais e até hospedagem em momentos difíceis, mesmo na Itália a amizade continua e muito.

A minha grande amiga Marcela que foi uma companheira de conversas, risadas e muita diversão durante este período.

Aos mestres e doutores que me ajudaram diretamente ou indiretamente a chegar nesta defesa de dissertação de mestrado.

Ao Prof. Dr. José Carlos Rende e Prof. Dra. Iranilde Mendes por terem sido meus principais incentivadores na escolha deste curso. Mesmo que um pouco ausente serei sempre grato a vocês pela minha formação profissional.

Aos integrantes e ex-integrantes da banda M.Conexx, Pablo, Victim, Benja, Luiz, Arroiz e Carlão, que por mais que esteve parada por muito tempo me deu alegrias durante a graduação, pós-graduação e me faz lembrar de bons momentos até hoje.

Ao meu grande amigo Pablo por estar sempre presente nas conversas, banda, projetos, especialização, viagens, festas e videogames.

A Ana Flávia minha amiga do colegial em Uberaba que toda vez tem uma história para contar e nunca escuta o que falo.

A todos amigos que conheci no IFMT – Campus Confresa que ainda estão no Campus ou já saíram, em especial William, Michael, Ana Paula, Manoel, Sandra e Elizabete por serem grandes companheiros.

A Inaê Vasconcellos, minha grande companheira que me ajudou tanto desde minha “turbulenta” posse no IFMT. Pessoa que posso contar a qualquer hora e sempre está do meu lado em Confresa nos momentos difíceis.

Ao diretor do Campus Confresa, Prof. Willian de Paula e à diretora de Ensino Profª Maria Auxiliadora por serem tão atenciosos, prestativos e solícitos sempre que precisei de qualquer coisa no Campus.

A meus pais, irmã, tia e avós que são as pessoas de onde tiro forças quando bate a vontade de voltar para casa. Pessoas que são o alicerce e a estrutura de minha vida.

A Deus por iluminar meu caminho permitindo todas as realizações que tive durante estes anos.

Muito Obrigado!!!

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo apoio incondicional durante todo o período de pós-graduação, pelo conhecimento transmitido, pelos valores passados, pelos momentos de alegria e diversão proporcionados e principalmente pelo amor sempre demonstrado em suas ações.

*”Tudo se pode realizar, quando se acredita.
Com fé, muita perseverança e boa vontade.
Estudar, ser paciente e ter dedicação infinita,
Redução do tempo livre e empenho de verdade.*

*É assim que se conquista um lugar ao sol,
Batalhando por seu espaço, com probidade,
Atuando de maneira justa, sem “besterol”,
Realizando seu trabalho com integridade.*

*Não é tão relevante a data de nascimento,
Conhecimento é que o fator em questão,
Provar que tem rico acervo de verdade,
A defesa de sua tese é a principal razão.*

*A área pretendida a ser escolhida
Tem que coadunar com o gosto pessoal,
Pois, por mais resistência que exista,
Haja paciência para ficar em ruim local!*

*Gostar do que se faz é fundamental,
Se não quiser ao seu futuro comprometer,
Pois, para se ter sucesso profissional,
Dedicação com paixão terá que ocorrer.”*

Autor Desconhecido

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento para câncer e certas patologias não malignas, que são geralmente caracterizadas por crescimento excessivo de células indesejáveis ou anormais. Esta técnica utiliza um fotosensibilizador, luz e o oxigênio para inativar células. Neste trabalho foram estudados os efeitos fotodinâmicos dos fotosensibilizadores sintéticos ftalocianina de cloroalumínio, ftalocianina de zinco, azul de metileno e azul de toluidina além do extrato bruto e parcialmente fracionado de *Bidens sulphurea*, conhecida como “picão laranja” sobre culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, pois esta levedura possui uma proximidade muito grande em termos energéticos e estruturais de células cancerígenas. Para potencializar a atividade dos fotosensibilizadores foram utilizados aditivos, como proteínas aglutinantes de *Moringa oleifera* e também houve o encapsulamento destes fotosensibilizadores em lipossomas de fosfatidilcolina contendo como aditivos o colesterol, polietilenoglicol e albumina. Foram padronizados também os tempos de incubação, irradiação, distância dos aparelhos de irradiação às células alvo, e concentração inibitória mínima dos fotosensibilizadores. Os resultados mostraram que as proteínas aglutinantes de *Moringa oleifera* Lam foram mais eficientes na entrega de drogas que os lipossomas. Os extratos de *Bidens sulphurea* se mostraram eficientes para a inativação fotodinâmica, sendo uma potencial fonte para a busca de novos fotosensibilizadores.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica, Fotosensibilizadores, Lipossomas.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment for cancer and certain non-malignant diseases, which are generally characterized by overgrowth of unwanted or abnormal cells. This technique uses a photosensitizer, light and oxygen to inactivate cells. In this work the photodynamic effects of synthetic photosensitizers chloroaluminum phthalocyanine, zinc phthalocyanine, methylene blue and toluidina blue and crude and partially fractionated extracts of *Bidens sulphurea*, known as "Picão laranja" over *Saccharomyces cerevisiae* cultures was studied, because this yeast has a great energetic and structural similarity to cancer cells. To enhance the activity of the photosensitizers were used additives as *Moringa oleifera* agglutinating protein and albumin and these drugs were also encapsulated in phosphatidylcholine liposomes with cholesterol, polyethyleneglicol and albumin. The times of incubation and irradiation, the distance between the irradiation systems and the cells and the minimum inhibitory concentration of the photosensitizers were also standardized. The results showed that the *Moringa oleifera* agglutinating proteins were more efficient than liposome as Drug Delivery Systems. The extracts of *Bidens sulphurea* showed to be efficient to the photodynamic inactivation, being a potential source for the search for new photosensitizers.

Keywords: Photodynamic Inactivation, Photosensitizers, Liposomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição eletrônica de spins no orbital externo de diferentes espécies reativas de oxigênio. Oxigênio (O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2)	01
Figura 2. Sequencia de EROs produzidas pelo ganho de elétrons ou próton.....	03
Figura 3. Mecanismos de ação fotodinâmica.....	06
Figura 4. Esquema de necrose.....	07
Figura 5. Esquema de apoptose.....	09
Figura 6. Esquema de autofagia.....	10
Figura 7. Estrutura das porfirinas.....	14
Figura 8. Estrutura do ácido aminolevulínico.....	15
Figura 9. Estrutura das ftalocianinas.....	16
Figura 10. Estrutura do azul de metileno.....	16
Figura 11. Estrutura da hipericina.....	17
Figura 12. Sistema de irradiação para Terapia fotodinâmica.....	19
Figura 13. Exemplo de estrutura de um lipossoma.....	20
Figura 14. Efeito do colesterol na membrana dos lipossomas.....	23

Figura 15. Tipos de lipossomas.....	24
Figura 16. Esquema PHLs.....	46
Figura 17. Esquema LED600.....	48
Figura 18. Esquema AMS-II.....	49
Figura 19. Ensaio de aglutinação de proteínas de <i>Moringa oleifera</i> Lam utilizando ouro coloidal.....	66
Figura 20. Eletroforese SDS-PAGE das proteínas de <i>Moringa oleifera</i> Lam. a) Padrão de peso molecular 50kDa; b) Extrato bruto sem purificação; c) Extrato bruto após purificação com sulfato de amônio; d) Fração após eluição em DEAE Celulose; e) Fração após eluição em carboximetilcelulose.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Natureza, geração e destino de espécies radicalares (ou seus intermediários) biologicamente importantes.....	02
Tabela 2. Materiais utilizados e seus respectivos graus de pureza.....	37
Tabela 3. Formulações lipossomais preparadas com seus respectivos fotosensibilizadores, componentes e aditivos.....	59
Tabela 4. Taxa de encapsulamento dos fotosensibilizadores em cada formulação lipossomal	60
Tabela 5. Unidades Formadoras de Colônia de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em cada formulação lipossomal de ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloro-alumínio.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Espectro de emissão do equipamento PHLS com e sem filtro.....	45
Gráfico 2. Espectro de emissão do equipamento WE-IV.....	47
Gráfico 3. Espectro de emissão dos equipamentos LED600 e AMS-II.....	48
Gráfico 4. Concentração mínima inibitória de azul de metileno variando o tempo de incubação do fotosensibilizador com as células.....	50
Gráfico 5. Concentração mínima inibitória de ftalocianina de zinco variando o tempo de incubação do fotosensibilizador com as células.....	50
Gráfico 6. Concentração mínima inibitória de azul de metileno variando o tempo de irradiação.....	52
Gráfico 7. Concentração mínima inibitória de ftalocianina de zinco variando o tempo de irradiação.....	52
Gráfico 8. Concentração mínima inibitória de azul de metileno frente à <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em diferentes distâncias da fonte luminosa.....	54
Gráfico 9. Concentração mínima inibitória dos diferentes fotosensibilizadores irradiados nos sistemas de irradiação PHLS e LED600. Tempo de incubação: 20 min; Tempo de irradiação 20 min; Distância da fonte luminosa: 11 cm (LED600) e 21 cm (PHLS); Concentração celular: 3×10^6 células/mL.....	55
Gráfico 10. Espectro de absorção molecular no UV-Vis das frações Hex, DCM, EtA e do EBL obtidos de <i>Bidens sulphurea</i>	57

Gráfico 11. Diluição mínima inibitória dos extratos de <i>Bidens sulphurea</i> frente à <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Tempo de incubação: 20 minutos; Tempo de Irradiação: 20 minutos; Equipamento de irradiação: PHLS; Distância da Fonte Luminosa: 21 cm.....	58
Gráfico 12. Unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após irradiação utilizando diferentes formulações lipossomais de ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloro-alumínio. Tempo de incubação: 20 minutos; Tempo de irradiação: 20 minutos; Equipamento de irradiação: LED600; Distância da fonte luminosa: 11 cm.....	61
Gráfico 13. Curva de calibração para dosagem de proteínas em extrato de <i>Moringa Oleifera Lam</i>	64
Gráfico 14. Concentração de proteínas no extrato de <i>Moringa oleifera Lam</i> em diferentes solventes e tempos de extração à temperatura de 25°C.....	64
Gráfico 15. Concentração de proteínas no extrato de <i>Moringa oleifera Lam</i> em diferentes solventes e tempos de extração à temperatura de 50°C.....	65
Gráfico 16. Concentração mínima inibitória dos fotosensibilizadores azul de metileno e ftalocianina de zinco com a presença de proteínas de <i>Moringa oleifera Lam</i> . Tempo de incubação: 20 min; Tempo de irradiação 20 min; Distância da fonte luminosa: 11 cm.....	68
Gráfico 17. Diluição mínima inibitória do extrato bruto liofilizado (EBL) de <i>Bidens sulphurea</i> com a presença de proteínas de <i>Moringa oleifera</i> (MO) na presença e ausência de irradiação luminosa. Tempo de incubação: 20 minutos; Tempo de irradiação: 20 minutos; Equipamento de Irradiação: PHLS; Distância da fonte luminosa: 21cm.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A – Molécula a ser oxidada
ADP – Difosfato de adenosina
ALA - Ácido 5-aminolevulínico
AlClPc - Ftalocianina de alumínio
AlPcS₂ – Ftalocianina de alumínio dissulfonato
Apaf-1 - Fator de ativação de protease apoptótica
ATP – Trifosfato de adenosina
Chol – Colesterol
DCM – Diclorometano
DEAE Celulose – Dietilaminoetil Celulose
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA - Ácido desoxiribonucleico
DPPC - Dipalmitoilfosfatidilcolina
EDTA - Àcido etilenodiamino tetra-acético
EBL – Extrato Bruto Liofilizado
ERN - Espécie reativa de nitrogênio
ERO - Espécie Reativa de Oxigênio
EtA – Acetato de Etila
EtOH - Etanol absoluto
FDA - Food and Drug Administration
FEA - Fosfatidiletanolamina
GUV - Lipossomas unilamelares gigantes
Hex - Hexano
IAP - Inibidor de proteínas da apoptose
LED - Diodos emissores de luz
LUV - Lipossomas unilamelares grandes
MAC - Canal mitocondrial da apoptose induzida
MLV - Lipossomas multilamelares
MB – Azul de Metileno
MO – *Moringa oleifera Lam*
MRSA - Staphylococcus aureus resistente à metilicina

MVL - Lipossomas multivesiculares
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidrogenase
 $\cdot\text{OH}$ - Hidroxil
 $\text{O}_2\cdot^-$ - Superóxido
 $^1\text{O}_2$ - Oxigênio Singlete
OLV - Lipossomas oligolamelares
PDI – Photodynamic Inactivation
PDT - Photodynamic Therapy
PEG – Polietilenoglicol
PS - Fotosensibilizador
PpIX - Protoporfirina IX
 $\text{RO}\cdot$ - Alcoxila
 $\text{RO}_2\cdot$ - Peroxila
ROS - Reactive Oxygen Species
S – Sensibilizador
SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate - Polyacrylamide gel electrophoresis
SER - Sistema reticuloendotelial
SFM - Sistema fagocitário mononuclear
SMAC - Pequenas mitocôndrias derivadas do ativador de caspases
SOD - Superoxidodismutase
SUV - Lipossomas unilamelares pequenos
TB - Azul de Toluidina
TFD - Terapia fotodinâmica
ZnPc - Ftalocianina de Zinco

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO e REVISÃO DE LITERATURA	1
1. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	1
2. Terapia fotodinâmica (TFD)	3
2.1. Histórico da TFD	3
2.2. Mecanismos de ação fotodinâmica	4
2.3. Mecanismos de morte celular	6
2.3.1. Necrose	6
2.3.2. Apoptose	8
2.3.3. Autofagia	9
2.4. Aplicações da TFD	10
2.5. Fotosensibilizadores para a TFD	13
2.6. Fontes de irradiação	17
3. Lipossomas	19
3.1. Histórico	19
3.2. Classificação	21
3.3. Métodos de preparo	24
3.4. Aplicações	27
3.5. Lipossomas na TFD	31
5. <i>Moringa oleifera</i> Lam	31
5.1. Classificação botânica	31
5.2. Constituintes químicos	31
5.3. Capacidade aglutinante	32
5.4. Atividade antibacteriana e antifúngica	32
6. <i>Bidens sulphurea</i>	33
7. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33

II. OBJETIVOS	36
1. Objetivo Geral.....	36
2. Objetivos Específicos	36
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
1. Materiais e reagentes.....	37
2. Preparo de soluções.....	38
2.1. Solução salina.....	38
2.2. Solução estoque de ftalocianina de cloroalumínio (AlClPc).	38
2.3. Solução estoque de ftalocianina de zinco (ZnPc).....	38
2.4. Solução estoque de azul de metileno (MB).	38
2.5. Solução estoque de azul de toluidina (TB).	38
2.6. Solução de fosfolipídeos	38
2.7. Solução de resazurina	39
3. Meios de cultura.....	39
4. Sistemas de irradiação.	39
5. Ensaios de Concentração Mínima Inibitória (CMI)	42
6. Preparo dos extratos de <i>Bidens sulphurea</i>	42
6.1. Coleta do material vegetal	42
6.2. Secagem do material vegetal.....	42
6.3. Preparo do extrato bruto liofilizado (EBL)	42
6.4. Preparo dos extratos parcialmente fracionados	43
7. Preparo de lipossomas contendo ftalocianina de cloroalumínio e ftalocianina de zinco.	43
7.1. Determinação da taxa de encapsulamento	43
8. Ensaios de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	43
9. Extração de proteínas de <i>Moringa oleifera</i> Lam.....	44
9.1. Coleta do material vegetal	44

9.2. Preparo do material vegetal	44
9.3. Preparo da solução de proteínas	44
9.4. Purificação das proteínas de <i>Moringa oleifera</i>	45
9.5. Testes de atividade aglutinante das proteínas de <i>Moringa oleifera</i>	45
IV – Resultados e Discussão	47
1. Padronização das condições experimentais	47
1.1. Fontes de irradiação	47
1.1.1. PHLS.....	47
1.1.2. WE-IV.....	48
1.2. Tempo de incubação do fotosensibilizador com as células	49
1.3. Tempo de irradiação das células	51
1.3. Distância da fonte de irradiação	53
2. Atividade fotodinâmica dos fotosensibilizadores não encapsulados	55
3. <i>Bidens sulphurea</i>	56
3.1. Extratos de <i>Bidens sulphurea</i>	56
3.2. Citotoxicidade e atividade fotodinâmica dos extratos.....	57
4. Lipossomas	59
4.1. Preparo das formulações lipossomais contendo ftalocianinas	59
4.2. Ensaios de atividade fotodinâmica das formulações lipossomais	60
5. <i>Moringa oleifera Lam</i>	63
5.1. Extração das proteínas de <i>Moringa oleifera Lam</i>	63
5.2. Efeito de proteínas de <i>Moringa oleifera Lam</i> na fotoinativação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
V. Conclusões	70
REFERÊNCIAS	71

I. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1. Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Grande parte dos organismos vivos atualmente são dependentes de oxigênio para desempenhar suas funções vitais devido a uma adaptação à superfície terrestre, rica em oxigênio e todos estes organismos utilizam oxigênio para gerar trifosfato de adenosina, mais conhecido como ATP, que é a fonte de energia química utilizada para realização de processos metabólicos (BUONOCORE; PERRONE e TATARANO, 2010). A otimização na produção de energia ocasionou a geração de subprodutos extremamente reativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO) (RIBEIRO, 2005). Estas espécies são conhecidas também como radicais livres que são substâncias altamente reativas capazes de dar início a reações em cadeia envolvendo diversos processos principalmente biológicos (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Além das espécies reativas de oxigênio existem as espécies reativas de nitrogênio (ERN), carbono e enxofre, porém estas possuem uma menor importância biológica por serem produzidas em baixíssimas quantidades (BUONOCORE; PERRONE e TATARANO 2010).

As espécies reativas de oxigênio apresentam normalmente orbitais vazios ou semipreenchidos, o que faz com que as mesmas reajam facilmente (Figura 1).

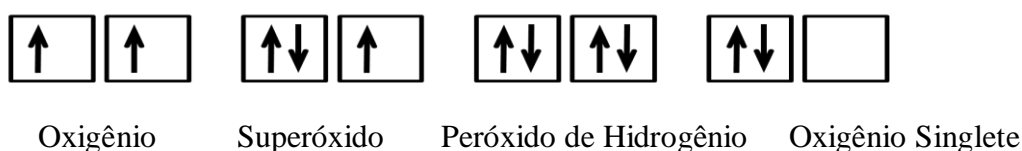


Figura 1. Distribuição eletrônica de spins no orbital externo de diferentes espécies reativas de oxigênio. Oxigênio (O_2), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2).

As principais espécies reativas de oxigênio estão descritas na Tabela 1 juntamente com a natureza, a geração e o destino de espécies radiculares (ou seus intermediários) biologicamente importantes.

Tabela 1 - Natureza, geração e destino de espécies radicalares (ou seus intermediários) biologicamente importantes.

Espécies derivadas do oxigênio	
Ânion-radical Superóxido - $O_2^{\bullet -}$	Gerado continuamente por diversos processos celulares ou pela redução monoeletrônica de O_2 . Rapidamente desaparece em solução aquosa por reação de dismutação. Sua habilidade em reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} pode acelerar a reação de Fenton. É um oxidante fraco, porém pode formar ERN. É permeável a membranas. Em fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, é um dos microbicidas mais importantes.
Peróxido de hidrogênio - H_2O_2	Intermediário formado pela reação de dismutação de $O_2^{\bullet -}$ catalisada pela enzima Superoxidodismutase (SOD), pela redução de $2e^-$ na molécula de O_2 e pela ação de diversas enzimas oxidases <i>in vivo</i> . É muito difusível em células <i>in vivo</i> . É um fraco agente oxidante quando comparado às outras espécies e um fraco agente redutor, reage lentamente com proteínas heme e peroxidases para iniciar reações radicalares.
Radical hidroxila $\bullet OH$	É o mais reativo e mais lesivo radical conhecido e para o qual, uma vez formado, o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa, reage com uma série de endobióticos, causa modificação no DNA, danos nas proteínas e inativação enzimática.
Radicais peroxila (RO_2^{\bullet}) alcoxila (RO^{\bullet})	Formados durante a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio, como na peroxidação lipídica.
Oxigênio singlete $^1O_2^*$	Estado eletronicamente excitado do oxigênio. Reage com um grande número de moléculas biológicas, incluindo lipídeos da membrana. $^1O_2^*$ pode ser gerado, entre outras reações, por transferência de energia a partir de um sensibilizador S, no estado excitado tripleto ($^3S^*$) para o oxigênio 3O_2 .
Ozônio O_3	Produzido no ar atmosférico poluído e por fonte de luz intensa de algumas fotocopiadoras e outros equipamentos. É extremamente danoso ao pulmão, oxidando rapidamente proteínas, DNA e lipídeos.

Fonte: VASCONCELOS et al, 2007.

Apesar de estas espécies serem citotóxicas e responsáveis pelo envelhecimento e desgaste celular (RIBEIRO et al, 2005), as EROs também podem desempenhar importante papel no organismo em relação ao funcionamento do sistema imunológico (LEITE e SARNI, 2003). Estas espécies também atuam como sinalizadores celulares e podem ser indicadores para ativação de células do sistema imune, ou interpretadas como sinal para o suicídio celular, chamado de apoptose (WANG e YOULE, 2009; GREEN e REED, 1998).

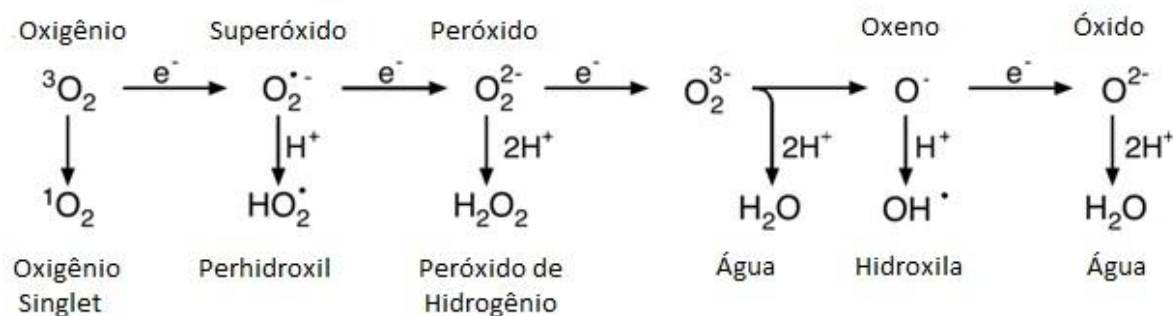


Figura 2. Sequencia de EROs produzidas pelo ganho de elétrons ou prótons.

2. Terapia fotodinâmica (TFD)

2.1. Histórico da TFD

A TFD, embora ainda pouco utilizada atualmente, tem registros de utilização milenares. Há mais de 4000 anos os egípcios começaram a utilizar esta terapia através de ingestão de plantas contendo psoralenos e luz solar para tratar doenças como o vitiligo (STERNBERG e DOLPHIN, 1998).

Em 1900, Raab observou a inativação de organismos do gênero *Paramecium* através da ação de corantes de acridina e luz, sendo a primeira vez que esta técnica foi descrita. Finsen, em 1901, demonstrou que a radiação solar poderia ser utilizada para controlar infecção por *Lupus vulgaris*, conhecida como *tuberculose cutânea*, que afeta principalmente pessoas que tiveram contato prévio com *Mycobacterium tuberculosis*, agente da tuberculose. Em 1903, Tappenier e Jesionek observaram a inativação fotodinâmica de protozoários. Em 1913 Meyer-Betz fez uma autoinjeção de 200 mg do que ele pensava ser hematoporfirina pura e não sentiu nenhum efeito, porém ao se expor à luz teve fotosensibilidade na pele por vários meses (STERNBERG e DOLPHIN, 1998). Em 1924, Policard mencionou a utilização potencial de porfirinas, combinada com a presença de oxigênio e aplicação de luz, no tratamento de tumores malignos. O que estes autores observaram veio, posteriormente, a se

constituir numa forma alternativa para o tratamento de alguns tipos de cânceres e de outras moléstias, conhecida como Terapia Fotodinâmica, do inglês “Photodynamic Therapy” (PDT) e também em um excelente método para inativação de micro-organismos, a inativação fotodinâmica (IFD), do inglês “Photodynamic Inactivation” (PDI) (SPESIA et al, 2009).

Em 1976, Weishaupt e colaboradores postularam que o oxigênio singlete, gerado por sensibilização, a partir da transferência de energia do agente fototerapêutico no estado triplete excitado para o oxigênio molecular no estado fundamental, era o agente citotóxico responsável pela inativação de células tumorais (WEISHAUPT; GOMER e DOUGHERTY, 1976). Em fins dos anos 70, a partir dos trabalhos de Dougherty e colaboradores, a TFD passou a ser reconhecida como uma alternativa para o tratamento de câncer, tendo sido empregada com sucesso no tratamento de tumores, além de outras condições clínicas (DOUGHERTY et al, 1978).

2.2. Mecanismos de ação fotodinâmica

O princípio básico da TFD é a geração de agentes citotóxicos através da interação dinâmica entre um fotosensibilizador (S) excitado por luz em comprimento de onda específico. A absorção de fótons pelo fotosensibilizador gera a ativação destes compostos, levando estas moléculas a uma instabilidade química, com a mudança do padrão de organização eletrônica normal. A tendência natural de qualquer composto em um estado excitado eletronicamente é retornar ao seu estado fundamental, pois ele é energeticamente mais favorável. Este retorno ao estado fundamental ocorre com emissão de energia na mesma intensidade da energia de absorção do fóton absorvido (LUKISIENE, 2003).

Os dois principais mecanismos envolvidos são os de transferência de elétrons ou transferência de energia frequentemente chamados de Tipo I e Tipo II, respectivamente.

Qualquer um dos dois mecanismos envolve a reação do fotosensibilizador no seu estado triplete:

Mecanismo Tipo I

O mecanismo do tipo I tem como característica a geração de um radical ou reação redox na qual o fotosensibilizador, excitado ao estado triplete (3S), reage com uma molécula vizinha (A) por transferência de elétron ou de um átomo de hidrogênio.



Uma alternativa, que também pode ocorrer nos mecanismos do Tipo I é descrita nas equações 2 e 3, onde o fotossensibilizador já no estado triplete excitado transfere energia e elétrons ao oxigênio molecular. Nesta situação tanto o íon-radical oxigênio formado, quanto o próprio fotossensibilizador que já executou a transferência de elétrons, pode reagir com o substrato A.



Assim, qualquer um dos produtos gerados são passíveis de promover a oxidação da molécula. A oxidação pode ocorrer por reação direta entre o radical da molécula vizinha e oxigênio molecular (equação 4). Essas oxidações ocorrem pela formação de complexos excitados. Podem ocorrer desativações das próprias, ou desativação do fotossensibilizador na reação com oxigênio molecular (equações 5 e 6).



A ocorrência de $S^{\bullet-}$ e $A^{\bullet+}$ ou $S^{\bullet+}$ e $A^{\bullet-}$ dependerá das propriedades redox de cada molécula (MACHADO, 2000; KAVARNOS e TURRO, 1986).

Mecanismo Tipo II

O mecanismo do tipo II é designado também por processos de transferência de energia. O processo pelo mecanismo de tipo II mais conhecido é a oxidação via formação oxigênio singlete (1O_2):



É observado que os processos do Tipo II devam ser predominantes, uma vez que os mecanismos do tipo I tendem a ser muito rápidos porque a sobreposição de orbitais

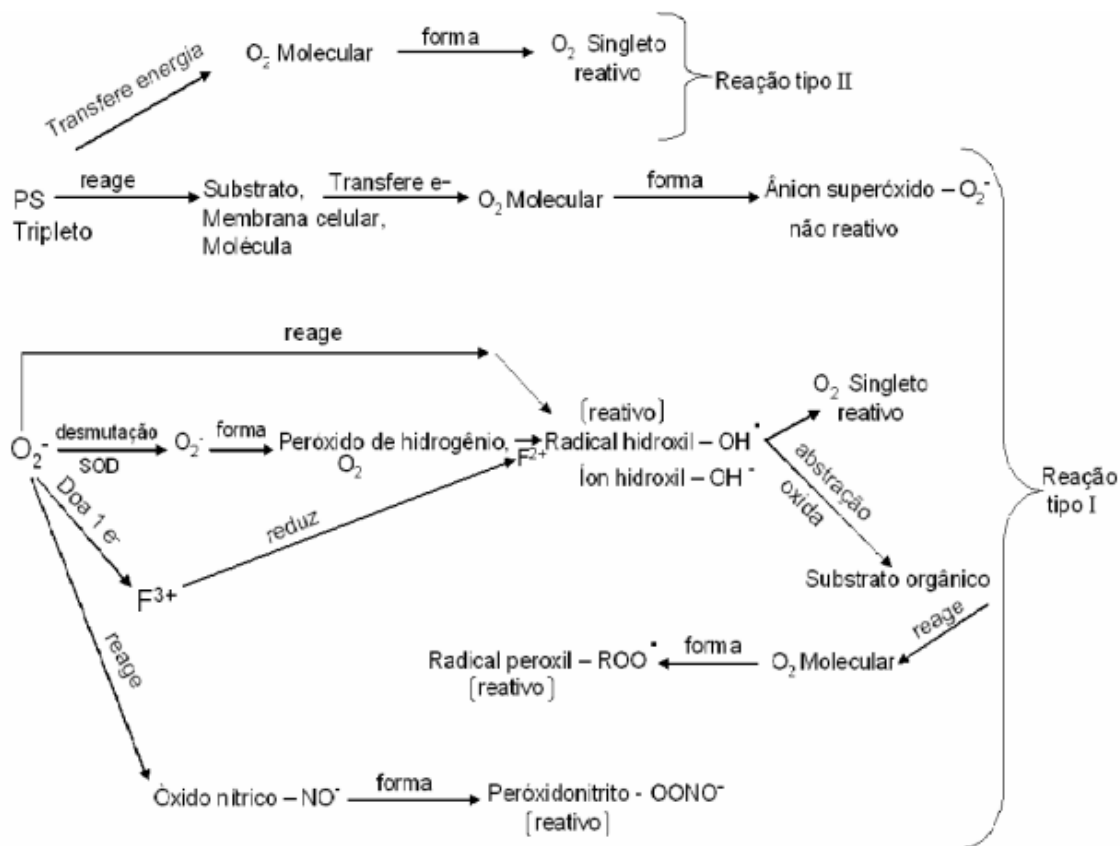


Figura 3. Mecanismos de ação fotodinâmica. (MÜLLER, 2006).

2.3. Mecanismos de morte celular

As células possuem diferentes formas de morte celular, algumas consideradas programadas, outras não. As principais formas de mortalidade celular são a necrose, a apoptose e a autofagia.

2.3.1. Necrose

Necrose é a morte prematura de células e tecido vivo. É causada por fatores externos à célula ou tecido como infecções, toxinas ou trauma. É considerada como contrária à apoptose que é uma morte programada da célula. Enquanto a apoptose proporciona efeitos benéficos ao organismo, a necrose na maioria das vezes é maléfica e pode ser fatal.

A necrose (Figura 4) pode ser induzida por um enorme número de fatores externos como pequenos machucados, infecções, câncer, infarto, envenenamento, EROs e inflamações (NELSON e COX, 2010).

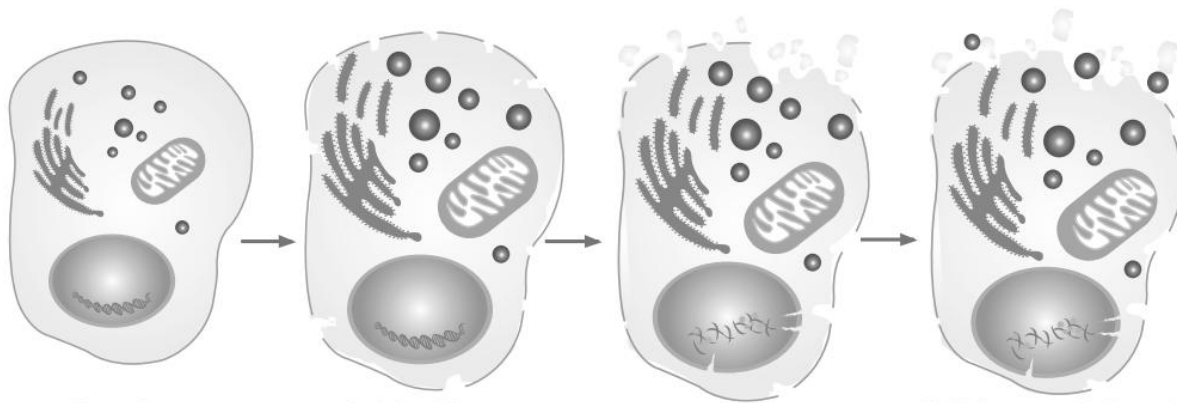


Figura 4. Esquema de necrose. Fonte: imagenex.com/

Tecido necrótico não sofre as mesmas reações químicas que normalmente o tecido apoptótico sofre. A falha repentina de uma parte da célula desencadeia uma cascata de eventos. Além da falta de sinais químicos para o sistema imunológico, células em necrose podem liberar substâncias químicas nocivas para o tecido circundante. Em particular, as células contêm organelas pequenas chamadas lisossomos, que são capazes de digerir material celular. Dano à membrana do lisossomo pode desencadear a liberação das enzimas contidas, destruindo outras partes da célula. Necrose normalmente começa com inchaço celular, a digestão da cromatina, e rompimento da membrana plasmática e das organelas. Necrose tardia é caracterizada por hidrólise extensa do DNA, vacuolização do retículo endoplasmático e lise celular. A liberação do conteúdo intracelular após a ruptura da membrana plasmática é a causa de inflamação em necrose (MAYNOR et al, 1997).

Recentemente tem se estudado uma nova forma de necrose, a necroptose, onde a célula se programa para fazer a necrose através de sinalizadores como os da apoptose (GALLUZZI e KROEMER, 2008).

2.3.2. Apoptose

O processo de apoptose (Figura 5) é controlado por uma gama diversificada de sinais celulares, que podem ser extracelulares (indutores extrínsecos) ou intracelulares (indutores intrínsecos). Sinais extracelulares podem incluir toxinas, hormônios, fatores de crescimento, o óxido nítrico ou de citocinas, que deve ou atravessar a membrana plasmática ou realizar uma transdução para efeito de uma resposta. Estes sinais podem afetar a apoptose positivamente ou negativamente (BRÜNE, 2003).

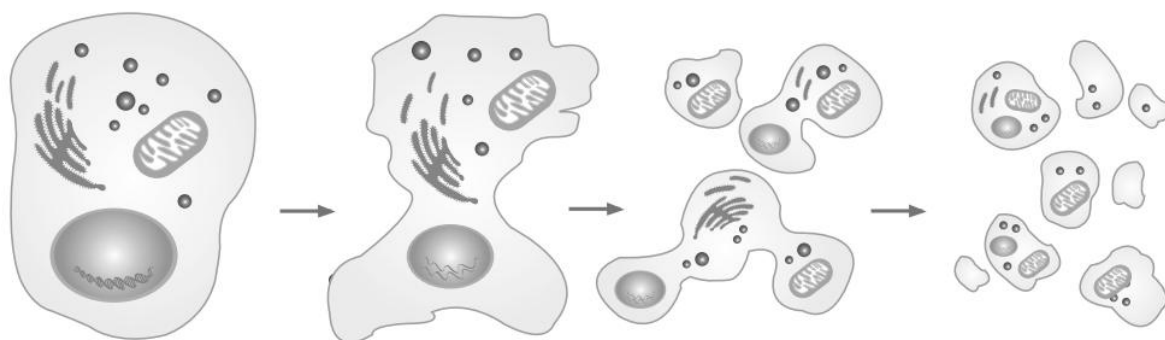


Figura 5. Esquema de apoptose. Fonte: imagenex.com/

Uma célula inicia sinalização intracelular de apoptose em resposta a um estresse, o que pode provocar o suicídio celular. A ligação de receptores nucleares de glicocorticóides, calor, radiação, a privação de nutrientes, a infecção viral, hipóxia e o aumento da concentração de cálcio intracelular, por exemplo, dano à membrana, pode desencadear a liberação de sinais intracelulares apoptóticos por uma célula danificada (MATTSON e CHAN, 2003). Uma série de componentes celulares, tais como poli ribose polimerase ADP, também pode ajudar a regular a apoptose (COLLINS, 1998).

Os sinais apoptóticos devem ativar proteínas reguladoras da via para iniciar a apoptose. Este passo permite que os sinais apoptóticos possam causar ou parar o processo de morte celular, caso a célula não precise mais morrer. Várias proteínas estão envolvidas, mas dois principais métodos de regulação foram identificados: a segmentação funcionalizada de mitocôndrias, ou diretamente pela transdução do sinal via proteínas adaptadas para os mecanismos apoptóticos. Outra via extrínseca para o início identificado em estudos de toxinas diversas é um aumento na concentração de cálcio dentro da célula causado pela atividade da

droga, que também pode causar apoptose através de uma protease calpaína vinculada ao cálcio (POPOV et al, 2002).

As mitocôndrias são essenciais para a vida multicelular. Sem elas, uma célula deixa de respirar aerobicamente e rapidamente morre, fato explorado por algumas vias apoptóticas. Proteínas apoptóticas que visam mitocôndrias afetam-na de diferentes maneiras. Elas podem causar inchaço mitocondrial através da formação de poros da membrana, ou elas podem aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial e causar a liberação de proteínas pró-apoptóticas. Estes estão intimamente relacionados com a via intrínseca, e os tumores surgem com mais frequência através de via intrínseca que a via extrínseca por causa da sensibilidade. Há também um crescente corpo de evidências indicando que o óxido nítrico é capaz de induzir apoptose, ajudando a dissipar o potencial de membrana da mitocôndria e, portanto, torná-la mais permeável.

Proteínas mitocondriais conhecidas como SMACs (pequenas mitocôndrias derivadas do ativador de caspases) são liberadas no citoplasma após um aumento de permeabilidade. SMAC liga-se a inibidor de proteínas da apoptose (IAPs) e desativa-os, impedindo o IAP de deter o processo de apoptose e, portanto, permitindo a ocorrência da mesma. O IAP também normalmente suprime a atividade de um grupo de proteases cisteína chamadas caspases, que realizam a degradação da célula, portanto, as enzimas de degradação reais podem ser vistas por serem indiretamente reguladas pela permeabilidade mitocondrial (CHARUGI, 2002).

Citocromo c também é liberado a partir da mitocôndria devido à formação de um canal, o canal mitocondrial da apoptose induzida (MAC), na membrana externa da mitocôndria, e serve uma função reguladora, uma vez que precede mudanças morfológicas associadas com apoptose. Uma vez que o citocromo C é liberado, ele se liga com fator de ativação de protease apoptótica - 1 (Apaf-1) e ATP, que em seguida, vincula-se a 9-pro-caspase para criar um complexo de proteínas conhecida como apoptossomo (CHIARUGI e MOSKOWITZ, 2002).

2.3.3. Autofagia

Em biologia celular, autofagia, ou autofagocitose (Figura 6), é um processo catabólico que envolve a degradação de componentes próprios de uma célula através do mecanismo lisossômico. É um processo estritamente regulado que desempenha um papel normal no crescimento celular, desenvolvimento e homeostase, ajudando a manter um equilíbrio entre a

síntese, degradação e posterior reciclagem de produtos celulares. É um importante mecanismo pelo qual uma célula realoca nutrientes de processos desnecessários a processos mais essenciais (NELSON e COX, 2010).

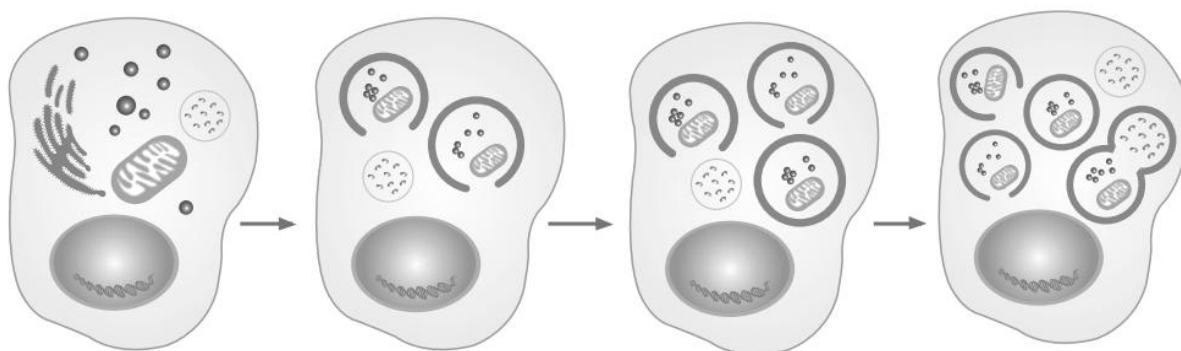


Figura 6. Esquema de autofagia. Fonte: imagenex.com/

Existe uma variedade de processos autofágicos, todos tendo em comum a degradação de componentes intracelulares através do lisossomo. O mecanismo mais conhecido de autofagia envolve a formação de uma membrana ao redor de uma região de destino da célula, separando o conteúdo do resto do citoplasma. A vesícula resultante, em seguida, se funde com um lisossomo e, posteriormente, degrada o conteúdo (KUNDU e THOMPSON, 2008).

Foi descrita pela primeira vez na década de 1960 (STROMHAUG e KLIONSKY, 2001), mas muitas perguntas sobre os processos reais e mecanismos envolvidos ainda precisam ser elucidadas. Seu papel na doença não está bem classificado, que pode ajudar a prevenir ou impedir a progressão de algumas doenças, como alguns tipos de neurodegeneração e câncer (MIZUSHIMA e KLIONSKY, 2007), e desempenhar um papel protetor contra a infecção por patógenos intracelulares, no entanto, em algumas situações, ele pode realmente contribuir para o desenvolvimento de uma doença (LING et al, 2005). A Figura 6 apresenta o esquema da autofagia.

2.4. Aplicações da TFD

A principal aplicação da TFD é no tratamento de diferentes tipos de câncer em substituição às técnicas como quimioterapia e cirurgia. Alguns tratamentos já são autorizados por órgãos de regulamentação e são amplamente utilizados, alguns estão em fase de testes clínicos e outros ainda não são utilizados.

Segundo Machado (2000):

“Clinicamente, a TFD já vem sendo empregada no tratamento dos seguintes casos de câncer: bexiga, pulmão, pele (primário e metastático do seio), intestino, trato digestivo superior, bexiga, dentre outros, assim como também na detecção e delineamento de lesões por fluorescência. O câncer superficial de bexiga, por exemplo, é frequentemente difícil de ser detectado. No entanto, considerando-se a retenção preferencial de agentes fototerapêuticos, esses casos de podem ser detectados pela medida de fluorescência do tecido, após a administração do agente fototerapêutico. Vários países já aprovaram a utilização da terapia fotodinâmica para o tratamento de tumores, inclusive o Brasil que autoriza a utilização da técnica para tratamento de câncer de pele. Nos Estados Unidos: tratamento paliativo para pacientes com tumores totalmente obstrutivos e cânceres de esôfago parcialmente obstrutivos onde a terapia a laser, seja considerada imprópria; também, certos tipos específicos de câncer de pulmão (submetido à FDA em fevereiro de 1997); Na França e Holanda: tratamento de câncer de pulmão e esôfago; No Canadá: câncer de esôfago, câncer recorrente de bexiga, redução de tumores obstrutivos e tratamento paliativo de disfagia em pacientes com câncer de esôfago completamente ou parcialmente obstrutivos; No Japão: câncer de pulmão em estágio inicial, cânceres gástricos superficiais e em estágio inicial, câncer cervical em estágio inicial, displasia cervical; Na Holanda: câncer de pulmão obstrutivo e em estágio inicial, câncer gástrico e cervical (incluindo displasia cervical), e cânceres superficiais gástrico e de esôfago.”

Além da aplicação para tratamento de tumores, outra aplicação bastante importante da TFD é na inativação fotodinâmica de micro-organismos. Neste tipo de aplicação a técnica é mais chamada de Inativação fotodinâmica ou Fotoinativação.

Assim como a TFD, a IFD é um processo no qual a ativação de compostos fotoreativos (fotosensibilizantes) por energia luminosa (na presença de oxigênio molecular) produz oxigênio singlete e radicais livres que são citotóxicos (IBBOTSON, 2010). Tais

espécies reativas são capazes de atacar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, inviabilizando células, similarmente ao processo observado inicialmente por Raab (RAAB, 1900).

Devido à baixa difusibilidade dos radicais formados neste processo, a atividade da TFD é confinada imediatamente no local onde se ligou o fotosensibilizador (OCHSNER, 1997).

O problema crescente de resistência bacteriana ilustra bem a necessidade de se desenvolver novas drogas ou novos procedimentos de tratamento antimicrobiano. Wainwright e seus colaboradores demonstraram que a combinação de fotosensibilizadores fenotiazínicos, com luz vermelha possui considerável potencial para utilização clínica em desinfecção de pele, queimaduras esterilização de sangue e água, etc (WAINWRIGHT et al, 1997).

Um trabalho de Soukos e colaboradores, utilizando azul de toluidina (TB), um fotosensibilizador fenotiazínico da classe do azul de metileno, demonstrou que TB é ativo em membranas e seu efeito fototóxico observado em bactérias é negligenciável contra queratinócitos e fibroblastos (SOUKOS et al, 2006).

Minnock e colaboradores utilizando um derivado hidrofílico de ftalocianina (AlPcS_2 = ftalocianina de alumínio dissulfonato), conseguiram com êxito eliminar 16 cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) epidêmica com baixas doses do sensibilizador e usando curtos tempos de irradiação (120s) (MINNOCK et al, 1996). Tal evento pode ser bloqueado pela adição de antioxidantes, implicando a participação de espécies reativas do oxigênio no processo (STOCKERT e HERKOVITS, 2003). A mortalidade celular microbiana é dependente da concentração empregada do fotosensibilizador e do tempo de irradiação (ARENAS et al, 2013).

Estes resultados enfatizam o uso da fotoinativação como um procedimento alternativo aos antimicrobianos tradicionais, permitindo uma eliminação do micro-organismo de regiões de pele infectadas ou de locais do corpo que possam veicular e disseminar estes micro-organismos resistentes à antibioticoterapia. E, também, pode ser uma alternativa para a inativação de micro-organismos exógenos, como os coliformes fecais.

A vantagem da fotoinativação de micro-organismos é que o efeito bactericida é rápido, altamente localizado, não interferindo com a microflora de outros sítios corpóreos. Como o evento citotóxico é dependente da produção de oxigênio singlete e radicais livres, o desenvolvimento de resistência ao procedimento é bem pouco provável (KASHEF; BORGHEI e DJAVID, 2007).

O dano fotoquímico induzido por fotosensibilizadores sobre bactérias gram-positivas ocorre principalmente em nível da membrana citoplasmática (BUYTAERT; DEWAELE e AGOSTINIS, 2007). Entretanto, os mesmos autores também enfatizam que o DNA microbiano pode ser um alvo secundário da TFD, após períodos longos de irradiação.

É conhecido que bactérias gram-positivas são geralmente mais suscetíveis à TFD quando comparado com bactérias gram-negativas. Esta diferença é atribuída à composição da parede celular. Bactérias gram-negativas têm uma estrutura complexa da membrana externa formada por duas bicamadas lipídicas enquanto gram-positivas possuem uma única bicamada e uma camada externa relativamente permeável (CHO e SALTON, 1964). Fotosensibilizadores neutros ou negativamente carregados não são hábeis em penetrar a barreira da bactéria gram-negativa, entretanto fotosensibilizadores catiônicos se ligam fortemente e conseguem exercer o efeito fotodinâmico (MERCHAT et al, 1996).

Outras aplicações conhecidas da TFD são no combate à psoríase, uma doença autoimune onde os pacientes têm feridas em todo o corpo e a terapia fotodinâmica trata estas feridas, degeneração macular da retina, arteriosclerose, restenose, remoção de verrugas internas, tratamento de infecções fúngicas, tratamento de infestações bacterianas multiresistentes, herpes, onicomiose, odontologia entre outras aplicações (MACHADO, 2000).

2.5. Fotosensibilizadores para a TFD.

Diversos tipos de fotosensibilizadores podem ser utilizados na IFD, podemos citar as porfirinas (HUDSON; SAVOIE e BOYLE, 2005), protoporfirinas (TYRRELL; CAMPBELL e CURNOW, 2010), ftalocianinas (BUYTAERT; DEWAELE e AGOSTINIS, 2007), eosinas (FEHR et al, 1996), fenotiazínicos (TARDIVO et al, 2005), clorinas (HARVEY et al, 2005), feofitinas (LI et al, 2011), hipericina (THONG et al, 2006) entre outros. Estes compostos podem ser usados se possuírem as seguintes características (MACHADO, 2000):

- i) características fotofísicas favoráveis;
- ii) baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade);
- iii) fotosensibilidade não prolongada;
- iv) simplicidade na formulação, reprodutibilidade e alta estabilidade do formulado (tempo mínimo de 2 anos) que, geralmente, é mantido seco, bastando ao médico adicionar água ou soro fisiológico e agitar;

- v) farmacocinética favorável (rápida eliminação do corpo);
- vi) facilidade de manuseio sintético que permita efetuar modificações para otimizar as propriedades desejáveis;
- vii) facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos e com boa reprodutibilidade;
- viii) facilidade de análise total dos componentes da fórmula, inclusive com fornecimento de roteiros de validação e
- ix) alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento do tecido saudável (seletividade).

A seguir serão descritas as principais classes de fotosensibilizadores disponíveis atualmente para utilização em terapia fotodinâmica e inativação fotodinâmica.

2.5.1. Porfirinas:

As porfirinas (Figura 7) são pigmentos de cor púrpura e de origem natural. A estrutura em anel da porfirina é a razão pela qual todos os derivados porfíricos absorvem luz a um comprimento de onda próximo dos 410 nm, dando-lhes a sua cor característica. São moléculas orgânicas com estrutura geral de macrociclo tetrapirrólico mostrada na Figura 7 (HUDSON; SAVOIE e BOYLE, 2005).

Os fotosensibilizadores mais utilizados em TFD do câncer são os derivados de hematoporfirina, sendo Photofrin® (Canadá) o mais conhecido, tendo sido autorizado para uso clínico em 1998 nos Estados Unidos, seguido por Canadá, Holanda, França, Alemanha, Japão etc (MACHADO, 2000). Os fotosensibilizadores correspondentes produzidos na Alemanha e Rússia são, respectivamente, Photosan® e Photogem® (PANKAU et al, 1998).

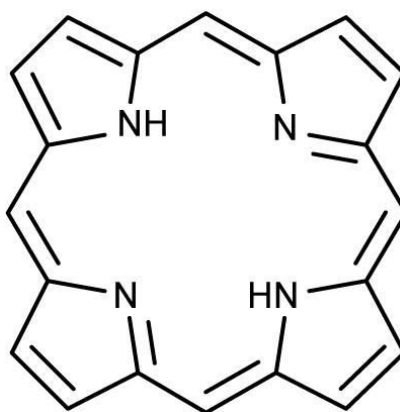


Figura 7. Estrutura geral das porfirinas.

2.5.2. Ácido 5-aminolevulínico (ALA):

ALA (Figura 8) é um precursor da protoporfirina IX que é um fotosensibilizador. Embora formação altamente regulada de protoporfirina IX (PpIX) exista em quase todas as células nucleadas, PpIX acumula preferencialmente em tecidos com alta atividade celular (TYRRELL; CAMPBELL e CURNOW, 2010).

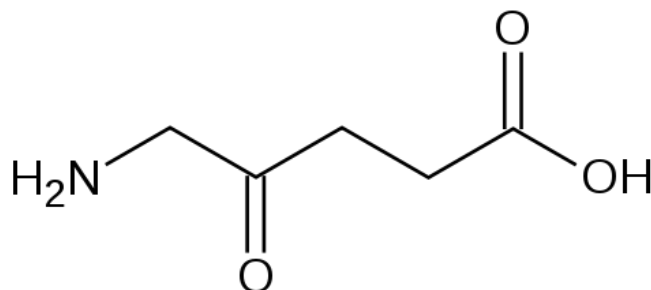


Figura 8. Estrutura do ácido aminolevulínico

A PpIX pode ser sintetizada em todas as células contendo mitocôndria (BARTSOSOVÁ e HRKAL, 2000). O fenômeno de acumulação do fotosensibilizador em tecidos doentes não é específico para doenças neoplásicas ou pré-neoplásicas. A síntese do ALA é normalmente controlada com rigor pela enzima ALA-sintetase, provavelmente através do nível intracelular de heme. ALA, quando fornecido para a célula, subverte esse controle e resulta na acumulação da PpIX, que é convertida em heme pela ferroquelatase pela adição de ferro ao núcleo da PpIX. Uma vez que essa conversão é um processo lento, altos níveis de PpIX são encontrados no tecido, embora para produzir um efeito fotodinâmico necessite da exposição à luz (TYRRELL; CAMPBELL e CURNOW, 2010). Há várias vantagens na fotosensibilização por PpIX induzida pelo ALA, uma delas é que o organismo elimina PpIX rapidamente, o que limita o risco da fotosensibilidade a 1-2 dias.

2.5.3. Ftalocianinas:

Ftalocianinas (Figura 9) são corantes sintéticos semelhantes às porfirinas e estruturalmente consideradas azoporfirinas (LAIA; COSTA e FERREIRA, 2006). São classificadas como fotosensibilizadores de segunda geração, cuja lipofilicidade contribui para sua localização nas membranas plasmáticas, nos microsomos e nas mitocôndrias, e, conseqüentemente, para a ação fotodinâmica (SPIKES, 1996). O metal central possui influência considerável em sua

propriedade fotosensibilizante, e as ftalocianinas de zinco (ZnPc) estão entre os sensibilizadores mais promissores deste grupo. Estudos mais recentes têm comprovado a eficiência das ftalocianinas como agentes fotosensíveis para uso em TFD, que já tem seu emprego clínico aprovado na Rússia (BROWN; BROWN e WALKER, 2004).

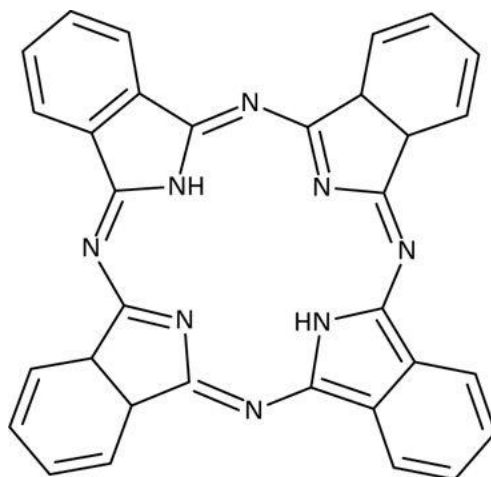


Figura 9. Estrutura geral das ftalocianinas

2.5.4. Fenotiazínicos:

Os corantes fenotiazínicos exibem intensa absorção de 600-660 nm, região do espectro útil em TFD por estar na "janela terapêutica" requerida para a eficiente penetração da luz nos tecidos (TARDIVO et al, 2005). Azul de metileno (Figura 10) tem sido usado clinicamente no tratamento de câncer de bexiga e, recentemente, contra tumores de esôfago inoperáveis, virulências da pele, psoríase e adenocarcinomas (MACHADO, 2000).

Um estudo comparativo da citotoxicidade do MB no escuro em células normais e tumorais verificou que esse corante é mais citotóxico em células tumorais (TARDIVO et al, 2005).

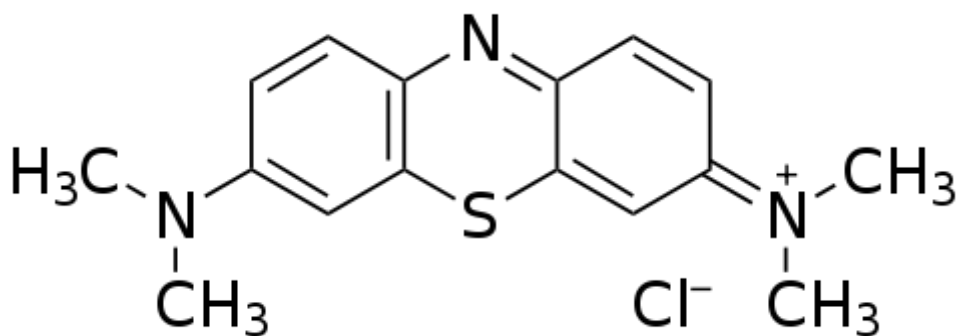


Figura 10. Estrutura do azul de metileno.

2.5.5. Fotosensibilizadores naturais:

Desde o advento do oxigênio no planeta, o processo fotodinâmico tornou-se bastante difundido na natureza, representando procedimentos de defesa a predação e sinalizadores intracelulares de eventos metabólicos de plantas e animais. A maior parte das plantas, que produzem flores, está entre a família das *Asteraceae*, e este grupo imenso de plantas produzem compostos orgânicos que possuem inúmeras atividades biológicas, tais como atividades anti-inflamatória, imunossupressiva, antitumoral, bactericida, etc (PARIMALAKRISHNAN et al, 2006). Dentre os membros desta família, destacam-se as plantas do gênero *Bidens*, sendo a *Bidens pilosa* L. uma das espécies mais estudadas destas plantas. Dentre as atividades fotoquímicas documentadas em *Bidens pilosa* L., destacam-se os trabalhos de Yang, e colaboradores, onde foi demonstrado a presença de antioxidantes nos extratos etanólicos e orgânicos desta planta (YANG et al, 2006). Trabalhos realizados no Brasil evidenciaram a presença de terpenos e poliacetilenos em extratos de *Bidens pilosa* (GUARATINI et al, 2005) com atividade antitumoral em ensaios utilizando células tumorais humanas em cultura. Um dos fotosensibilizadores naturais relatados na literatura é a hipericina (Figura 11), que pode ser extraída do *Hypericum perforatum* conhecida como erva de São João.

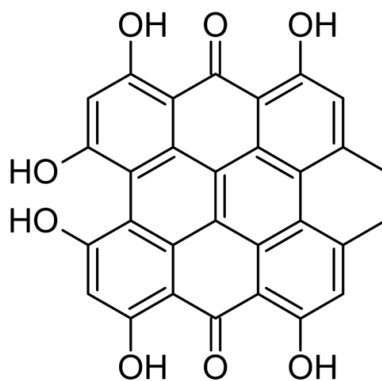


Figura 11. Estrutura da hipericina.

2.6. Fontes de irradiação

Nas fontes de irradiação empregadas na TFD e IFD, o intervalo do espectro eletromagnético mais significativo está na região entre 600 e 800 nm, onde a membrana celular apresenta baixa absorvibilidade. Nesta região é possível magnitudes na penetração da luz próximas a 3 centímetros em tecidos dotados de baixa pigmentação (OCSHNER, 1996). Deste modo é

possível evitar destruições desnecessárias causadas às demais organelas presentes no meio que não possui a droga sensibilizadora.

Nas primeiras aplicações da TFD as fontes empregadas na ativação de agentes fotodinâmicos baseavam-se em radiações policromáticas não coerentes, como lâmpadas de arco voltaico (e.g., lâmpadas de arco de xenônio) ou mesmo lâmpadas incandescentes. Por meio de filtros ópticos, essas lâmpadas são capazes de fornecer radiações no comprimento de onda apropriado para a maioria dos fotosensibilizadores. Esse tipo de sistema, infelizmente, exibe um aquecimento relevante, dificilmente permite um controle preciso na dosagem de luz, e normalmente apresenta baixa intensidade luminosa (BEYER, 1996). Têm se observado no mercado vários aperfeiçoamentos no sentido da minimização dessas desvantagens por meio de cuidadosos projetos na engenharia e design.

Diodos emissores de luz (LED) são também empregados em sistemas de irradiação voltados a TFD e IFD. Os LED além de constituírem uma alternativa de baixo custo, possuem grande homogeneidade luminosa (LIM, 2011), permitindo que a radiação seja facilmente dosada e calculada em diversas aplicações. A emissão de um LED é bem definida e normalmente específica para um determinado comprimento de onda. Esse fator, associado à relativa intensidade (como os modelos chamados alto brilho), dispensa o aparato de filtragem encontrado nos sistemas baseados em lâmpadas policromáticas. Além destes fatores, a baixa dissipação térmica, combinada à emissão monocromática de moderada intensidade, em sistemas simples, robustos e diminutos, qualificam atraentemente o uso de LED em dispositivos para aplicações de TFD e IFD (RIOS et al, 2011).

Paula e colaboradores (PAULA et al, 2010), realizaram um estudo comparativo in vivo entre sistemas de irradiação baseados em lâmpadas halógenas filtradas e sistemas dotados de tecnologia LED. O estudo, que empregou ácido 5-aminolevulínico para aplicação de TFD em níveis dérmicos, revelou uma superioridade do sistema LED em diversos aspectos. O sistema apresentava vantagens como maiores profundidades de atuação no tecido, baixo calor incidente no tecido, redução na intensidade de dor e boa eficiência em inativação de células in vitro. As aplicações de TFD empregando luz emitida por diodos, não são restritas apenas a aplicações superficiais: relatos demonstram aplicações no tratamento de tumores cerebrais por meio de sondas de LED ajustados em uma ponta cilíndrica e acoplados num cateter balão (DAVIES e WILSON, 2007). Essa sonda, pequena e flexível, emite luz permitindo baixíssimas invasões aos demais tecidos.

Atualmente, espécies reativas de oxigênio geradas na TFD são ativadas principalmente por lasers. As vantagens dos lasers estão no caráter da luz monocromática e na alta intensidade obtida nesse dispositivo (YUAN et al, 2008). Entretanto, a coerência de um laser não é necessária em aplicações na TFD e IFD (MACHADO et al, 2009). Esse fator justifica a construção de fontes não coerentes, as quais são normalmente muito mais acessíveis, estáveis e versáteis. A figura 12 apresenta um exemplo de sistema de irradiação para a Terapia Fotodinâmica.



Figura 12. Sistema de irradiação para Terapia fotodinâmica. Fonte: itechnalk.com

3. Lipossomas

3.1. Histórico

Ao longo dos tempos, a utilização da maioria dos compostos terapêuticos tem sido sempre limitada pela impossibilidade de aumento da sua dosagem. A retenção ou degradação do agente terapêutico, baixa solubilidade e, em especial, os efeitos colaterais perniciosos inerentes à sua utilização em concentrações elevadas, tornam muitas vezes difícil a utilização da dosagem necessária para que este cumpra a sua função. Este problema levou a que, durante o século XX, e em especial no decorrer das últimas décadas, tenha sido levado a cabo um grande esforço no sentido de desenvolver um sistema capaz de transportar um composto terapêutico (drogas, em especial as dirigidas a tumores, antibióticos, enzimas, hormônios, agentes quelantes ou compostos modificadores da célula) até um alvo específico (órgão, tecido ou célula).

A primeira proposta de um sistema direcionado de transporte de fármacos data do início do século XX (EHRLICH, 1906), quando Paul Ehrlich propôs o seu modelo, que ficou conhecido por “Bala Mágica de Ehrlich” (Ehrlich’s Magic Bullet). Neste modelo, o fármaco é ligado ao transportador direcionado, e idealmente exibirá a sua atividade farmacológica apenas no tecido alvo (mecanismos de especificidade, como a ligação entre antígeno e

anticorpo, eram já conhecidos). Assim, os efeitos indesejáveis resultantes da sua ação em outros tecidos são largamente diminuídos, enquanto o aumento da eficiência permite o decréscimo da dose administrada.

As primeiras tentativas para a obtenção de um sistema transportador eficaz tiveram como base o encapsulamento das biomoléculas a transportar em vesículas de nylon e outros polímeros sintéticos (CHANG, 1964; 1971; CHANG e POZNANSKY 1968). Contudo, esta abordagem mostrou-se totalmente inadequada, visto estas vesículas de material artificial se acumulam no organismo.

O primeiro grande passo a frente nesta área deu-se em 1965, com a publicação por Alec Bangham e colaboradores de um trabalho de investigação fundamental acerca da difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, embora sem qualquer ligação imediata aos estudos de sistemas transportadores de fármacos (BANGHAM; STANDISH e WEISSMAN, 1965). Neste trabalho foi feita a caracterização de um sistema de vesículas fosfolipídicas ao qual, três anos mais tarde, seria dado o nome de lipossomas (Figura 13). No entanto, estas estruturas multilamelares obtidas da hidratação de fosfolípidos já eram anteriormente conhecidas, sendo denominadas “figuras de mielina”. Imediatamente após o trabalho de Bangham, os lipossomas impuseram-se como um sistema modelo simples para o estudo de membranas biológicas. O sucesso na incorporação de enzimas em lipossomas despertou também o interesse da comunidade científica para a sua aplicação médica e farmacológica. Em 1971, Gregory Gregoriadis propôs pela primeira vez a utilização dos lipossomas como sistema transportador de fármacos, mantendo desde então um papel preponderante no desenvolvimento desta área (GREGORIADIS e RYMAN, 1971).

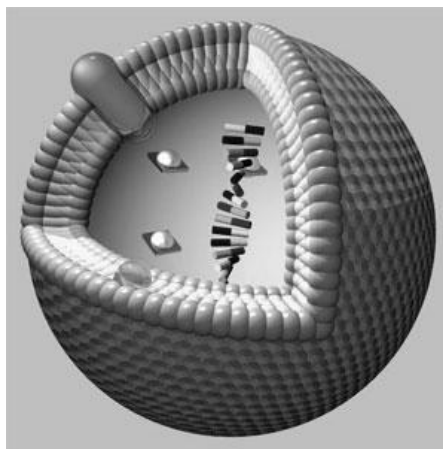


Figura 13. Exemplo de estrutura de um lipossoma. Fonte: quimicaparatodosuevora.blogspot.com/

Os lipossomas são um caso claro de um sistema que teve uma passagem extremamente rápida do campo da investigação para a aplicação comercial (especialmente na área da cosmética), sem mesmo as suas propriedades e eficácia estarem completamente estudadas. Este fato ficou a dever-se, fundamentalmente, à euforia desencadeada na década de 70 e início da década de 80 pelo potencial de aplicação dos lipossomas nas indústrias médica e farmacêutica, o que veio mesmo a lançar sérias dúvidas sobre o rigor de alguns resultados da época (LASIC e NEEDHAM, 1995).

Nos anos seguintes e até aos nossos dias, com a mesma finalidade, foi também estudada a aplicação de niossomas, nanopartículas, copolímeros, lipoproteínas, emulsões, lectinas, hormônios, peptídeos, anticorpos, e sistemas mais complexos como vírus e eritrócitos, no desenvolvimento de um transportador específico. O objetivo de todos estes transportadores é aumentar o potencial terapêutico de um composto, impedindo que este se perca no trajeto para um alvo específico, evitando simultaneamente a ocorrência de efeitos secundários nocivos noutra parte do organismo. Contudo, até hoje, poucos sistemas estudados conseguiram cumprir eficazmente este objetivo, de modo a ser largamente aceitos pela indústria farmacêutica (YANG et al, 2011).

3.2. Classificação

Existem vários tipos de lipossomas no que diz respeito à composição molecular, estrutura e tamanho. Lipossomas convencionais são aqueles formados por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas diferenciando-se entre si pelo tamanho e disposição destas bicamadas. Os lipossomas mais comuns são (SANTOS e CASTANHO, 2002):

- a. Lipossomas unilamelares pequenos (Small Unilamellar Vesicles - SUVs): a membrana é formada por uma única bicamada fosfolipídica; são os menores na escala de tamanhos, com diâmetro variando entre 20 e 80 nm.
- b. Lipossomas unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles - LUVs): a membrana é formada por uma única bicamada fosfolipídica; são intermediários na escala de tamanhos, com diâmetro entre 80 nm e 1000 nm, sendo os mais utilizados atualmente devido ao seu diâmetro ser pequeno suficiente para a absorção celular e grande o suficiente para encapsular compostos inclusive macromoléculas.

- c. Lipossomas multilamelares (Multilamellar Vesicles - MLVs): a membrana é formada por várias bicamadas fosfolipídicas dispostas de forma concêntrica; apresentam um diâmetro médio que varia entre 400 nm e alguns micrômetros.
- d. Lipossomas multivesiculares (Multivesicular Liposomes - MVLs): são semelhantes aos MLVs, porém as bicamadas não são concêntricas, o que torna a vesícula uma estrutura mais complexa, com um lipossoma que contém vários lipossomas encapsulados de forma aleatória e inclusive com membranas bastante curvadas ou deformadas; também podem ser chamados de sistemas de vesícula em vesícula e normalmente são estruturas mal formadas nos processos de obtenção dos outros tipos; a faixa de diâmetros também varia de 400nm a alguns micrômetros.
- e. Lipossomas unilamelares gigantes (Giant Unilamellar Vesicles - GUVs): são formados por uma única bicamada fosfolipídica; são os maiores com diâmetros superiores a 1µm podendo chegar a dezenas de micrômetros.
- f. Lipossomas oligolamelares (Oligolamellar vesicles - OLVs): são similares aos MLVs, porém as bicamadas internas estão bem próximas à externa, deixando uma grande área hidrofílica dentro do lipossoma.

Outra forma de classificação dos lipossomas é pelos constituintes de sua bicamada. São os aditivos lipossomais que alteram a estrutura desta bicamada tornando-o mais específico. Desta forma os lipossomas podem ser:

- a. Convencionais: São lipossomas que possuem apenas um fosfolípdeo, normalmente a fosfatidilcolina e colesterol como aditivo para aumentar a fluidez na fase gel e diminuir a fluidez na fase cristal-líquida (SANTOS e CASTANHO, 2002).

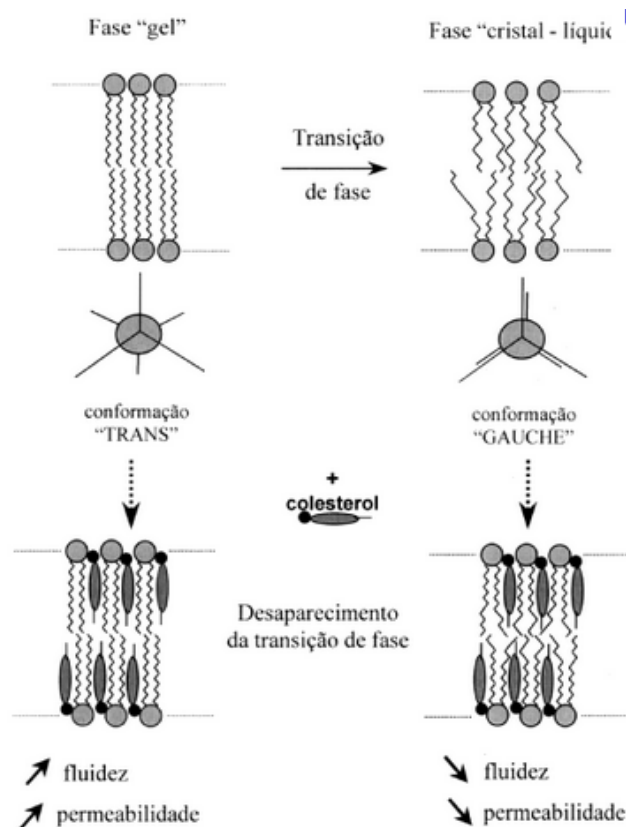


Figura 14. Efeito do colesterol na membrana dos lipossomas. Fonte: FREZARD et al, 2005.

Setas indicam aumento ou diminuição da fluidez e permeabilidade.

- b. Furtivos (Stealth): São sistemas lipídicos modificados com um tempo de meia vida em circulação alta. Isto se obtém normalmente pela adição de um polímero hidrofílico na estrutura do lipossoma, sendo o mais utilizado o polietilenoglicol (PEG). São os lipossomas mais utilizados para transporte de fármacos dentro do organismo (SANTOS e CASTANHO, 2002).
- c. Catiônicos: São lipossomas onde são adicionados fosfolípidos que conferem um caráter catiônico ao mesmo, para facilitar a entrega das drogas para células como macrófagos (SANTOS e CASTANHO, 2002).
- d. pH-sensíveis: são lipossomas que liberam a droga em um intervalo bem específico de pH, sendo bastante utilizado para liberação de drogas no intestino, em tumores, no estômago entre outras (BATISTA; CARVALHO e MAGALHÃES, 2007).
- e. Imunolipossomas: São lipossomas que possuem um revestimento com imunoglobinas, anticorpos, lipídeos imunogênicos, glicoproteínas ou glicolipídeos. Estes lipossomas são

utilizados principalmente pra direcionar as drogas para locais bem específicos como determinados órgãos ou tecidos (SANTOS e CASTANHO, 2002).

f. Fotosensíveis: são lipossomas constituídos de fosfolipídeos que em determinado comprimento de onda muda sua conformação E/Z e consequentemente libera a droga de interesse (BUDAI et al, 2008).

g. Neutron-sensível: são lipossomas que liberam a droga conforme há a interação do mesmo com nêutrons. São utilizados no transporte de radiocompostos (AKAMATSU, 2009).

h. Termosensíveis: são lipossomas que liberam a droga em temperaturas diferentes, são utilizados para a liberação de drogas em tecidos onde há hipertermia, como tecidos tumorais (BATISTA; CARVALHO e MAGALHÃES, 2007).

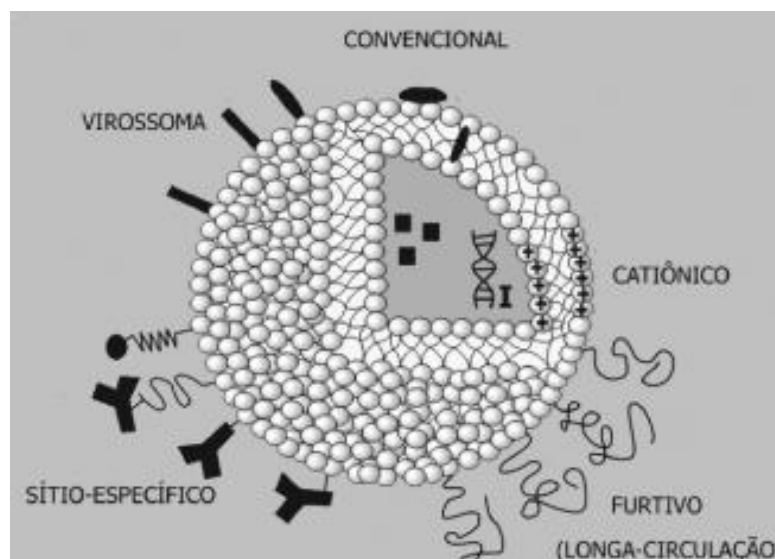


Figura 15. Tipos de lipossomas. Fonte: BATISTA, CARVALHO E MAGALHÃES, 2007.

3.3. Métodos de preparo

Existem diferentes métodos para o preparo de lipossomas descritos na literatura, a utilização destes métodos depende das características do lipossoma a ser preparado e da droga a ser encapsulada. O princípio básico da maioria destes métodos é a secagem dos fosfolipídeos a partir de soluções em solventes orgânicos e a sua posterior dispersão em solução aquosa (RIAZ, 1996).

3.3.1. Hidratação do filme lipídico

Este método é o mais utilizado para o preparo de lipossomas. Ele consiste na secagem de lipídeos em um balão formando um filme fino em suas paredes, em seguida é adicionada uma solução aquosa enquanto se mistura a solução. Os compostos a serem encapsulados são dissolvidos ou na solução de fosfolipídeos ou na solução aquosa, dependendo da solubilidade da mesma. Os lipossomas formados por este método são chamados de lipossomas grandes multilamelares (MLV) com grande diferença entre os diâmetros.

3.3.2. Gotas de solvente

Este método não é tão descrito na literatura, pois exige mais do manipulador que a hidratação do filme lipídico. Forma MLV de diâmetros próximos. Consiste na dispersão de pequenas gotas de solvente hidrofóbico volátil onde os lipídeos foram dissolvidos em uma solução aquosa. Em seguida o solvente orgânico é evaporado em um banho maria.

3.3.3. Método de saneamento

Este método consiste na sonicação dos MLV em atmosfera inerte. Dessa forma os MLV se tornam Lipossomas pequenos unilamelares (SUV). Este método tem uma desvantagem na pequena taxa de encapsulamento e possível degradação do fosfolipídeo.

3.3.4. Método da célula de pressão francesa

O método envolve a extrusão dos MLV em altas pressões e baixas temperaturas por um pequeno orifício. Ele é bem mais vantajoso que o método de saneamento pois é mais simples, rápido e reprodutível. Os lipossomas formados podem ser pequenos (SUV) ou grandes (LUV), ambos unilamelares.

3.3.5. Injeção etérea

Consiste na dissolução dos lipídeos em éter e essa mistura é injetada lentamente em uma solução aquosa do material a ser encapsulado em temperaturas próximas a 60°C. A posterior remoção do éter leva à formação dos lipossomas. Forma vesículas de diâmetros entre 70 e 190 nm, e é mais adequado para o encapsulamento de substâncias hidrofílicas.

3.3.6. Injeção etanólica

É o mesmo processo da injeção etérea, porém os fosfolipídeos são dissolvidos em etanol ao invés de éter. Autores demonstraram grandes desvantagens sobre o uso desta técnica como a baixa taxa de encapsulamento e a grande heterogeneidade do diâmetro das vesículas, entretanto, um estudo recente mostra que a taxa de encapsulamento é bastante alta e a variação no diâmetro dos lipossomas é baixa, mostrando a grande eficiência do método para o encapsulamento de drogas hidrofóbicas (OLIVEIRA et al, 2005).

3.3.7. Remoção de detergente

Detergentes em concentração micelar crítica são utilizados para solubilizar fosfolipídeos. Conforme o detergente é removido, os fosfolipídeos se combinam formando LUVs. Normalmente os detergentes são removidos por diálise. Esta técnica forma lipossomas com tamanhos bem definidos, porém pode restar detergente dentro dos lipossomas.

3.3.8. Evaporação em fase reversa

Este método consiste da formação inicial de uma emulsão de água em óleo pela sonicação de um sistema de duas fases contendo os fosfolipídeos em um solvente orgânico e uma solução aquosa. O solvente é removido sob pressão reduzida resultando na formação de um gel viscoso. Os lipossomas então são formados quando o solvente residual é removido pela evaporação rotativa contínua sob pressão reduzida. Este método é bastante utilizado para encapsular moléculas maiores como estruturas de DNA.

3.3.9. Método de fusão cálcio-induzida

Este método é baseado na adição de cálcio a SUV, que induz estes a formarem MLV em configuração espiral. A adição de EDTA neste meio forma os LUVs. Este método só pode ser utilizado para fosfolipídeos ácidos.

3.3.10. Outros métodos

Outros métodos de preparo de lipossomas foram descritos na literatura, porém sua utilização é muito pequena como o método de microfluidização e o de congelamento e descongelamento.

3.4. Aplicações

Os lipossomas atualmente são amplamente empregados em diferentes áreas, principalmente no transporte de fármacos. Também são utilizados como modelos de membrana, sangue artificial, aplicações cosméticas e agrícolas.

3.4.1. Lipossomas no tratamento de câncer

Embora a indústria farmacêutica seja bem sucedida no descobrimento de novos fármacos citotóxicos que são candidatos em potencial para o tratamento do câncer, esta doença causa mais de seis milhões de mortes por ano em todo o mundo e este número continua crescente (ANDRESEN; JENSEN e JORGENSEN, 2005). A terapia com fármacos anti-neoplásicos causa toxicidade sistêmica, resultando em citotoxicidade para as células normais. Parte das células cancerígenas tem características muito comuns com as células normais, das quais foram originadas. Deste modo, torna-se difícil encontrar um alvo único contra o qual os fármacos possam ser direcionados. Os efeitos colaterais associados à quimioterapia limitam a dose ou doses cumulativas administradas aos pacientes que podem, entretanto, levar a metástases do tumor e, muitas vezes, o desenvolvimento de resistência contra os fármacos (SAPRA e ALLEN, 2003).

Uma estratégia alternativa para estes inconvenientes é o uso de lipossomas como carreadores de fármacos anti-neoplásicos, para alcançar a acumulação seletiva do fármaco no tecido, onde se encontra o tumor ou nas células tumorais. Carreadores lipossômicos têm sido aceitos clinicamente no tratamento do câncer, visto que eles alteram a farmacocinética e biodistribuição dos fármacos antineoplásicos (MAMOT et al, 2003).

Yang e colaboradores (2011) realizaram um artigo de revisão recente listando vários fármacos encapsulados em lipossomas para o tratamento de câncer no pâncreas. Outros estudos mostraram a eficiência dos lipossomas na entrega de drogas para o tratamento de câncer no pulmão em pacientes com tumores malignos neste órgão (WANG, 2010). Akamatsu desenvolveu um lipossoma sensível a neutrons para entrega de drogas visando a radioterapia, onde os mesmos liberam a droga na presença de nêutrons (AKAMATSU, 2009).

Chang e colaboradores avaliaram em 2010 a eficiência de radioterápicos encapsulados em lipossomas no tratamento do câncer de colo de útero que se mostraram mais eficientes que a droga não encapsulada (CHANG et al, 2010).

Uma experiência clínica realizada em 2010 por Gavila e seus colaboradores mostrou a eficiência da doxorubicina juntamente com outras duas drogas no tratamento de 35 pacientes com câncer de mama (GAVILA, 2010).

Outros compostos encapsulados em lipossomas que auxiliam no tratamento do câncer são os imunomoduladores, um estudo de Killion e Fidler mostrou a eficiência no controle da metástase em macrófagos utilizando estes imunomoduladores encapsulados em lipossomas, ou seja, inibiu que fossem geradas novas células com características tumorais em outros tecidos (KILLION e FIDLER, 1998).

Vários estudos já são realizados para o tratamento de câncer utilizando formulações lipossomais de drogas já conhecidas, porém nestas formulações a biodisponibilidade é aumentada e a toxicidade é diminuída, além de ser uma entrega controlada das drogas.

3.4.2. Lipossomas no desenvolvimento de vacinas

A proteção limitada fornecida pela maioria das estratégias de vacinação direcionou as pesquisas para a investigação de vacinas alternativas, focadas no desenvolvimento de adjuvantes efetivos e sistemas de liberação controlada. Os lipossomas têm sido propostos como veículos de liberação de antígenos em razão de sua utilidade como adjuvante imunológico, apresentando vantagens como sua fácil preparação, baixa toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade, assim como a liberação lenta de antígenos encapsulados (BEN-YEHUDA et al, 2003; MAZUMDAR et al, 2004).

Uma estratégia para aumentar o efeito da vacina é liberar especificamente o antígeno no órgão alvo. A conjugação de proteínas virais na membrana de lipossomas (virossomas) oferece a oportunidade para explorar o direcionamento e propriedades fusogênicas de membranas de proteínas virais. Esta propriedade dribla o inconveniente da degradação pelos lisossomas antes de alcançarem o citoplasma, pois os virossomas são usados como o próprio vírus, introduzindo o material dentro do citoplasma (KANEDA, 2000).

Dois estudos mais recentes mostram primeiramente a eficiência dos lipossomas na vacina para o HPV (DAFTARIAN et al, 2006) e uma tentativa de vacina para o câncer, baseada na atividade de espécies reativas de oxigênio atuando sobre lipossomas catiônicos (YAN et al, 2008).

Mazumdar e seus colaboradores desenvolveram uma vacina lipossômica contendo antígenos na membrana de promastigota de *Leishmania donovani*. O estudo concluiu que a

imunização com este antígeno em lipossomas induziu a produção de anticorpos específicos, como também a resistência contra uma infecção progressiva causada pela *Leishmania donovani* (MAZUMDAR et al, 2004).

3.4.3. Lipossomas na terapia gênica

Durante os últimos anos, a entrega de genes por meio de lipossomas progrediu bastante, saindo do laboratório e indo para as aplicações médicas. Os principais avanços e contribuições dos lipossomas para a terapia gênica é a condensação dos plasmídeos em partículas menores, promoção da entrega do DNA intracelular pelos endossomos e a facilitação da entrada do plasmídeo no núcleo por um sinal de localização nuclear. Os lipossomas também são extremamente importantes para o transporte extracelular dos genes, e esta área é a mais importante, pois este gene deve ser entregue a alvos específicos, fato que pode ser facilitado pelo uso de diferentes aditivos nos lipossomas.

Os lipossomas catiônicos, por exemplo, interagem com o DNA através de interações eletrostáticas, já que a molécula de DNA é carregada negativamente. A carga total, no entanto, mantém-se com valor positivo. Isto vai permitir a interação eficiente do carreador com a carga negativa da membrana celular, penetrando na célula, principalmente através de endocitose (EL-ANEED, 2004).

Os lipossomas ideais são aqueles que têm uma estabilidade suficiente para proteger o DNA no meio extracelular e uma instabilidade para facilitar a liberação do DNA intracelular (TSENG e HUANG, 1998).

3.4.4. Lipossomas no tratamento de doenças infecciosas

A tendência dos lipossomas de serem capturados pelo sistema fagocitário mononuclear (SFM) pode ser uma vantagem no tratamento de variedade de doenças infecciosas intracelulares.

Podem-se citar diversas infecções causadas por micro-organismos onde os lipossomas auxiliam na entrega da droga aumentando a eficiência do tratamento como tuberculose (LABANA et al, 2002), leishmaniose (FRÉZARD et al, 2005), esquistossomose (MELO et al, 2003) entre outras doenças.

3.4.5. Lipossomas em dermocosmética

Os lipossomas constituem, atualmente, uma tecnologia de ponta em cosmetologia, que vem, de certa forma consolidar as bases da biocosmética. Sabe-se que a membrana celular é composta, entre outros constituintes, de fosfolipídeos, proteínas e pequena quantidade de colesterol. Com o envelhecimento há um aumento progressivo de colesterol, que vai provocando o enrijecimento da membrana e tornando mais lento o intercâmbio celular com o exterior. Por exemplo, quando os fibroblastos diminuem sua atividade, o colapso na síntese de colágeno e elastina determina o aparecimento de rugas e flacidez. Por isso, a utilização de lipossomas como transportadores de substâncias "rejuvenescedoras" é muito intensa em formulações cosméticas, pois além de serem capazes de encapsular compostos biologicamente ativos, eles interagem com a membrana celular restituindo sua fluidez. Esquemas de rejuvenescimento progressivo tem sido propostos, envolvendo o uso de retinol (Vitamina A), alfa-tocoferol (Vitamina E) e timo, veiculados em lipossomas de fosfatidilcolina. Estas etapas englobam fases de hidratação, regeneradora (proteção contra processos oxidativos) e estimulante (o timo é órgão linfóide com papel na proteção imunológica) (OLIVEIRA, 1993).

Eles têm sido empregados na prevenção da queda de cabelos, promoção do crescimento capilar, desaceleração do processo de envelhecimento da pele, clareamento da pigmentação cutânea e prevenção e tratamento da lipodistrofia ginóide. As principais vantagens do emprego de lipossomas para a administração de agentes dermocosméticos são o fato de que podem transportar substâncias hidro e lipossolúveis; apresentam alta afinidade pelas membranas biológicas, são constituídos de anfifílicos naturais biocompatíveis e biodegradáveis, além de acentuarem a hidratação natural da pele e cabelo.

Devido à sua estrutura de bicamada, semelhante à estrutura das membranas celulares, eles são capazes de interagir profundamente com as células do organismo. Vários tipos de interações de lipossomas com células da corrente circulatória foram descritas, tais como transferência ou troca de lipídios, endocitose, fusão, etc (CHORILLI et al, 2004).

3.4.6. Outras aplicações

Outras aplicações dos lipossomas incluem os modelos de membrana (FÉLIX et al, 2004), no estudo de mecanismos de ação de antibióticos (WONG et al, 2003), em imunologia no transporte de anticorpos e antígenos (CHORILLI et al, 2004), transporte de hormônios (GYSIN e SCHWYZER, 1983) e proteínas (LOUGHREY et al, 1990) entre outras aplicações.

3.5. Lipossomas na TFD

Drogas para a TFD são normalmente hidrofóbicas, sendo um grande problema, pois possuem uma alta agregação. Isto faz com que se utilizem métodos para tornar estas drogas mais biodisponíveis. Uma das formas mais utilizadas para transportar estes fármacos e torná-los mais disponíveis no organismo é pela utilização de lipossomas.

São relatadas na literatura diversas aplicações dos lipossomas no transporte de drogas para a TFD, podemos descrever, por exemplo, um estudo feito com magnetolipossomas para tratamento de Tumor ascítico de Ehrlich em camundongos (BARBOSA, 2008). Longo (2008) utilizou lipossomas para transportar ftalocianina de cloro-alumínio para tratamento de câncer bucal.

Derycke mostra em seu artigo de revisão uma gama de aplicações de lipossomas em terapia fotodinâmica, e trata de diferentes tipos como os convencionais, de direcionamento passivo e ativo, com anticorpos, termo-sensíveis, pH-sensíveis, furtivos entre outros (DERYCKE e WITTE, 2004).

Como os principais fotosensibilizadores para a TFD são hidrofóbicos, grande parte das aplicações desta técnica são feitas com a utilização de um sistema de transporte para melhorar a biodisponibilidade da droga, e este transporte é feito, na maioria das vezes por lipossomas.

5. *Moringa oleifera* Lam

5.1. Classificação botânica

A *Moringa oleifera* pertence à família *Moringaceae*. É composta apenas de um gênero e quatorze espécies conhecidas sendo a *oleifera* a mais cultivada. Nativa do Norte da Índia, cresce atualmente em vários países dos trópicos. É um arbusto ou árvore de pequeno porte, de crescimento rápido, que alcança 12m. de altura. Possui uma copa aberta, em forma de sombrinha e usualmente um único tronco. As flores que emergem em panículas são de cor creme, perfumadas, muito procuradas pelas abelhas (ANWAR et al, 2007).

No Brasil ela é conhecida como acácia branca, cedro moringueiro e quiabo de quina.

5.2. Constituintes químicos

Na literatura encontram-se alguns artigos de análise da composição química da *M. oleifera*, são descritos a presença de carotenos (VERMA et al, 2009), carbamatos e

tiocarbamatos (FAIZI et al, 1995), isoglicosinalbina (GUEYRARD et al, 2000), compostos antitumorais (GUEVARA et al, 1999), compostos anti colesterol (MEHTA et al, 2003) e principalmente glicosídeos (CHEENPRACHA et al, 2010). Além disto é muito rica em proteínas e lipídeos, sendo uma excelente fonte nutricional (ANWAR et al, 2007).

5.3. Capacidade aglutinante

A capacidade aglutinante de *M. oleifera* foi primeiramente descrita em 1981 (GASSENSCHMIDT et al, 1981) e vem sendo estudada e aperfeiçoada desde então. Inicialmente foi descoberto que a capacidade aglutinante desta planta é devido à peptídeos catiônicos de peso molecular variando entre 6 e 16 kDa e ponto isoelétrico 10 (GASSENSCHMIDT et al, 1995). Alguns autores indicam que o composto aglutinante da planta é um polieletrólito natural de peso molecular aproximado 3 kDa (OKUDA et al, 2000). Outros estudos demonstraram que a proteína aglutinante é um dímero (SANTOS et al, 2009). Após análise e sequenciamento dos aminoácidos, foi detectada uma grande quantidade de glutamina, arginina e prolina, além de outros 60 resíduos de aminoácidos (DONGMEZA et al, 2006). A *M. oleifera* é mais eficiente para águas com turbidez elevada, não sendo muito eficiente para baixos índices de turbidez (GHEBREMICHEAL et al, 2005). A coagulação com *M. oleifera* demonstrou-se cinco vezes mais rápida que a coagulação por alumínio comum.

5.4. Atividade antibacteriana e antifúngica

Em 1991, Cáceres e seus colaboradores descreveram a atividade antibacteriana do extrato aquoso de *Moringa oleifera* frente à *P. aeruginosa* quando extraído a uma temperatura de 37°C a 56°C, sendo que a 56°C também há a inibição do crescimento de *S. aureus*. (CÁCERES, 1991).

Chuang e colaboradores avaliaram a atividade antifúngica dos extratos de *Moringa oleifera* e de seu óleo essencial e ambos apresentaram atividade frente a *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* e *M. canis* (CHUANG et al, 2007).

A atividade antibacteriana dos extratos aquosos e etanólicos de *Moringa oleifera* é mais intensa frente a bactérias Gram-positivas que Gram-negativas (PEIXOTO et al, 2011).

Recentemente foi descrita a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos extraídos das sementes de *Moringa oleifera* (SINGH; NEGI e RADHA, 2013).

6. *Bidens sulphurea*

Bidens sulphurea ou *Cosmos sulphureus* (Asteraceae - Compositae) é uma planta nativa do México, conhecida vulgarmente por cosmo-amarelo, picão, picão-grande, áster-do-méxico. É herbácea anual, ereta, muito ramificada e intensamente disseminada e adaptada no território brasileiro.

As flores do cosmo-amarelo são reunidas em capítulos grandes, simples ou dobrados, muito vistosos, geralmente alaranjados, surgindo ocasionalmente a variedade de flores amarelas. É muito agressiva em sua multiplicação por sementes, sendo até citada como planta invasora tal é o seu vigor de disseminação e crescimento (LORENZI e SOUZA, 2008).

Apesar de ser, provavelmente um dos exemplares mais difundidos em boa parte do planeta, juntamente com o dente-de-leão (*Taraxacum sp.*), são consideradas como espécies invasivas, mas relativamente pouco estudada (SILVA, 2007; SILVA, 2008). O gênero *Bidens* possui aproximadamente 200 espécies descritas na literatura (GANDERS; BERRBEE e PIRSEYEDI, 2000).

No gênero *Bidens* (do latim bi (dois) + dens (dente) dois-dentes, uma alusão às duas protuberâncias aciculares de seu aquênio, que adere em pelos, plumas, roupas etc. É possivelmente a espécie mais comum de seu gênero, sendo encontrada mais facilmente do que o exemplar mais conhecido do gênero, *Bidens pilosa*, ou picão-preto ou simplesmente picão.

A espécie é extremamente rústica, tolerando facilmente solos pobres, e longos períodos de seca, dispersando-se muito rapidamente, devido a sua característica de florescer o ano todo e, portanto, produzir seus aquênios que se dispersam facilmente por meio dos mecanismos de transporte como ar, animais entre outros (NETO, 2011).

Neto em 2011 descreveu a atividade fotodinâmica do extrato bruto de *Bidens sulphurea* frente à *Artemia salina*, eritrócitos de carneiro e *E. coli* (NETO, 2011).

7. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é a espécie de levedura mais utilizada comercialmente no mundo para a produção de vinhos, pães, cervejas e outros produtos alimentícios.

É um dos modelos de organismos mais estudados em biologia celular e molecular, assim como a *E. coli* é o modelo de bactéria Gram-negativa mais estudada.

Muitas proteínas importantes na biologia humana foram descobertas inicialmente em estudos com *Saccharomyces cerevisiae*, como proteínas envolvidas no ciclo celular, proteínas de sinalização e algumas enzimas (SANTOS; GUSMÃO e GOUVEIA, 2010).

Esta levedura atualmente é utilizada para diversas aplicações como produção de pão, cerveja e vinho, rações para animais, probióticos para animais e humanos, biocatalisadores em química orgânica, sequestrantes de íons metálicos e fonte de nutrientes residuais.

Alguns produtos de seus extratos celulares também possuem ampla utilização como meio de cultura para micro-organismos, aromatizantes e produtos farmacêuticos, suplementos alimentares e dietéticos, bioemulsificantes, invertase ou lactase para uso alimentar e proteínas terapêuticas (FELDMANN, 2010).

Leveduras têm similaridades marcantes com células de mamíferos em níveis de macromoléculas e organelas. Tem sido mostrado que um grande número de proteínas de leveduras possuem funcionalidade altamente conservada com proteínas homólogas humanas. Assim, é valioso o uso de leveduras como sistema modelo que tem dado uma contribuição relevante para o entendimento de diversos mecanismos moleculares em células humanas (FERREIRA, 2006).

Outras vantagens no uso de *S. cerevisiae* como modelo de estudo se baseia na grande facilidade de obtenção de mutantes através de genética clássica e molecular, devido ao conhecimento de todo seu genoma. O fácil cultivo em meio de cultura de composição simples, além de um tempo de geração pequeno quando comparado com as células animais também é um ponto positivo na utilização destas células como modelo de célula eucariótica (PEREIRA, 2003).

É crescente a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular para testes de drogas anticancerígenas, pois esta levedura apresenta uma grande similaridade metabólica com a glicólise (principal fonte de energia das células cancerígenas), sendo o processo praticamente idêntico (DIAZ-RUIZ; RIGOLET e DEVIN, 2011).

Esta similaridade metabólica é devido principalmente aos efeitos Warburg e Crabtree (DIAZ-RUIZ, RIGOLET e DEVIN, 2011), que consistem na utilização da glicólise como mecanismo preferencial de obtenção de energia.

Foi observado que a maioria das células cancerígenas produzem energia predominantemente por glicólise, seguida por fermentação do ácido láctico no citoplasma, ao

contrário das células normais em que o piruvato formado na glicólise é seguido para oxidação na mitocôndria dando continuidade ao ciclo de Krebs e com a produção de mais ATP. Esta é a definição mais simples do efeito Warburg.

Já o efeito Crabtree é caracterizado pela supressão da respiração celular, onde células utilizam apenas a glicólise para a produção de energia, e este efeito foi observado em células tumorais, algumas células proliferativas não tumorais, algumas bactérias e leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae* (OLIVEIRA, 2010).

Especificamente em relação a estudos relacionados a estresse oxidativo as células de levedura são capazes de detectar o aumento de oxidação, causado pelas EROs, e desencadear uma elaborada resposta de adaptação que ativa os dois sistemas de defesa antioxidante: enzimático e não-enzimático. A adaptação celular causado pelo aumento dos níveis de EROs consiste na ativação de enzimas pré-existentes bem como na indução da expressão de genes de proteção que promovem o aumento da tolerância celular (COSTA e MORADAS-FERREIRA, 2001). Portanto este organismos é bastante resistente à EROs, assim como células tumorais, justificando sua utilização como modelo celular para a terapia fotodinâmica.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Estudar a atividade fotosensibilizadora de fotosensibilizadores sintéticos e naturais na presença ou ausência de sistemas de entrega de drogas para a inativação fotodinâmica.

2. Objetivos Específicos

- Estudar a interação entre diferentes formulações lipossomais de ftalocianina de cloro-alumínio e ftalocianina de zinco através da fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Comparar a eficiência da ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloro-alumínio e suas respectivas formulações lipossomais na inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Avaliar a eficiência de quatro diferentes sistemas de irradiação na fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Analisar a atividade citotóxica e fotodinâmica de extratos brutos e parcialmente fracionados de *Bidens sulphurea* frente à *Saccharomyces cerevisiae* a fim de encontrar um possível composto fotoativo para posterior utilização como fotosensibilizador para a terapia fotodinâmica e inativação fotodinâmica diminuindo os custos do processo.
- Avaliar a interação de fotosensibilizadores com proteínas de *Moringa oleifera* Lam na inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae*.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais e reagentes.

Tabela 2. Materiais utilizados e seus respectivos graus de pureza

Reagente	Pureza
Acetato de Etila	99,8%
Ágar	BACTERIOLÓGICO
Azul de metileno (MB)	>99%
Azul de toluidina (TB)	>99%
Caseína	BACTERIOLÓGICO
Cloreto de sódio (NaCl)	>95%
Colesterol (Chol)	>94%
DEAE Celulose	MICROGRANULAR
Dextrose	BACTERIOLÓGICO
Diclorometano	>99%
Dimetilformamida (DMF)	>99%
Dimetilsulfóxido (DMSO)	>99,7%
Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC)	>99%
Etanol absoluto (EtOH)	>99,9%
Ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc)	>99%
Ftalocianina de zinco (ZnPc)	>99%
Hexano	95%
NaClO	10-15%
Peptona	BACTERIOLÓGICO
Polietilenoglicol 3000 (PEG)	PADRÃO
Resazurina	>99%
Albumina Sérica Bovina	>96%

2. Preparo de soluções

2.1. Solução salina

Solução salina foi preparada através da dissolução de 9 g de NaCl para 1 litro de solução aquosa.

2.2. Solução estoque de ftalocianina de cloroalumínio (AlClPc).

Foi preparada uma solução estoque de AlClPc na concentração de 1 mmol L^{-1} em DMSO. A solução foi mantida a 4°C na ausência de luz até o momento do uso.

2.3. Solução estoque de ftalocianina de zinco (ZnPc).

Foi preparada uma solução estoque de ZnPc na concentração de 1 mmol L^{-1} em DMSO.. A solução foi mantida a 4°C na ausência de luz até o momento do uso.

2.4. Solução estoque de azul de metileno (MB).

Foi preparada uma solução estoque de MB na concentração de 1 mmol L^{-1} em água destilada. A solução foi mantida a 4°C na ausência de luz até o momento do uso.

2.5. Solução estoque de azul de toluidina (TB).

Foi preparada uma solução estoque de TB na concentração de 1 mmol L^{-1} em água destilada. A solução foi mantida a 4°C na ausência de luz até o momento do uso.

2.6. Solução de fosfolipídeos

As soluções de fosfolipídeos foram preparadas utilizando DPPC e os aditivos de interesse com a dissolução de 150 mg de lipídeos/aditivos para 5 mL de etanol. As soluções foram mantidas em congelador até o momento do uso.

2.7. Solução de resazurina

A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana ou antifúngica. A solução de resazurina foi preparada na concentração de 0,01% em água destilada.

3. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados para as culturas de *Saccharomyces cerevisiae* nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foram o meio sólido ágar Sabouraud dextrose (ASD) e o meio líquido caldo Sabouraud dextrose (CSD) e preparados de acordo com as instruções do fabricante. Seguem-se as descrições das formulações de cada meio de cultura utilizado:

- Ágar Sabouraud Dextrose

Peptona	5g
Caseína	5g
Dextrose	40g
Ágar	15g
Água destilada q.s.p	1000mL

- Caldo Saouraud Dextrose

Peptona	5g
Caseína	5g
Dextrose	20g
Água destilada q.s.p	1000mL

4. Sistemas de irradiação.

Foram utilizados quatro sistemas de irradiação desenvolvidos no próprio laboratório: o PHLS, LED600, WE-IV e AMS-II.

- PHLS → Uma lâmpada halógena utilizada em retroprojetores (marca OSRAM, modelo ENH, potência de 250W), foi acoplada a uma caixa metálica proveniente de uma fonte de alimentação ATX. Nessa estrutura foi inserido um “cooler” de fonte de alimentação. Uma lupa de leitura de vidro cristal 100% (marca DFV, modelo LL-P100, com 100 mm de diâmetro, 175 mm de foco, armação plástica, aumento de 1,5

vezes) foi fixada à uma distância de 7 cm da lâmpada. A uma distância de 22,5 cm, colocou-se uma cuba de refrigeração de vidro oca de formato retangular, com 5 cm de percurso. Nas extremidades laterais da cuba, foi soldado um bocal permitindo a fixação de mangueiras de silicone para circulação de água em seu interior. Essa cuba permite a passagem de fluxo de água visando a refrigeração da região próxima à amostra. A luz emitida pela lâmpada foi então filtrada para a eliminação de comprimentos de onda desnecessários pelo uso de um filtro óptico vermelho. O filtro foi obtido comercialmente e é composto de poliéster pigmentado. Este equipamento foi utilizado com e sem o filtro. O PHLS é representado na Figura 16.

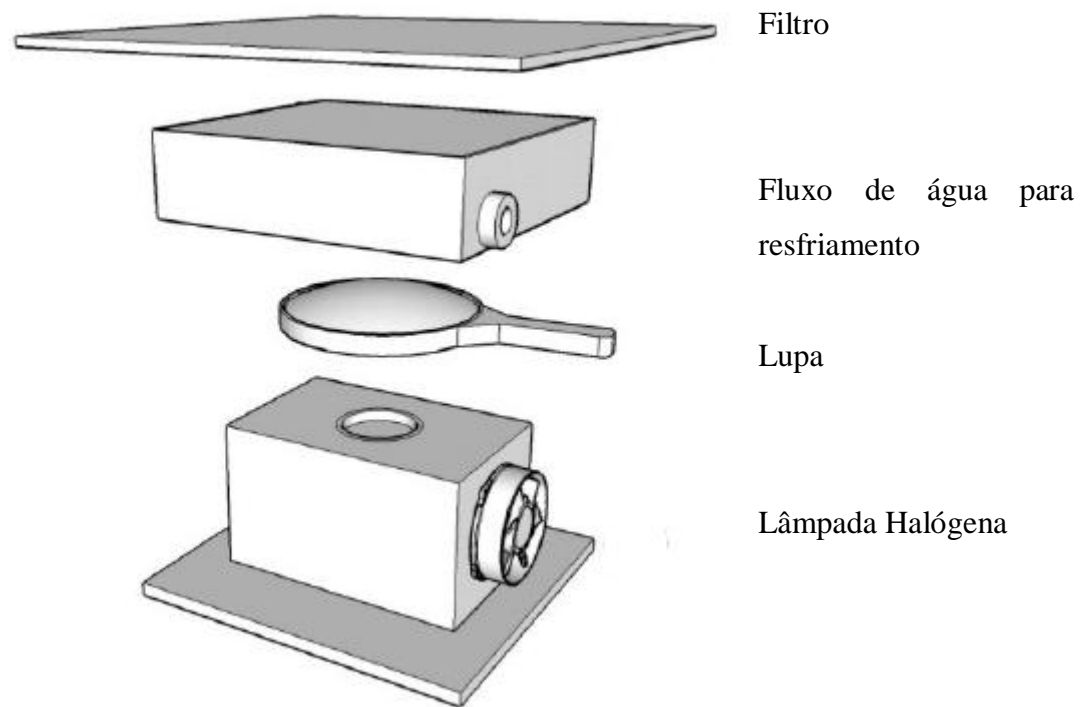


Figura 16. Esquema PHLS

- LED600 → Sob uma placa de fenolite, fez-se o arranjo para 600 LED vermelhos de alto brilho (marca ZX, 8000 mcd). O arranjo foi organizado em 150 clusters de 4 LED em série, ligados em paralelo. A placa foi fixada em uma caixa metálica retangular, de 21 cm² de área, por 51 cm de altura. Foi soldado na estrutura metálica, em seu interior, alguns suportes que permitiram a fixação de amostras.

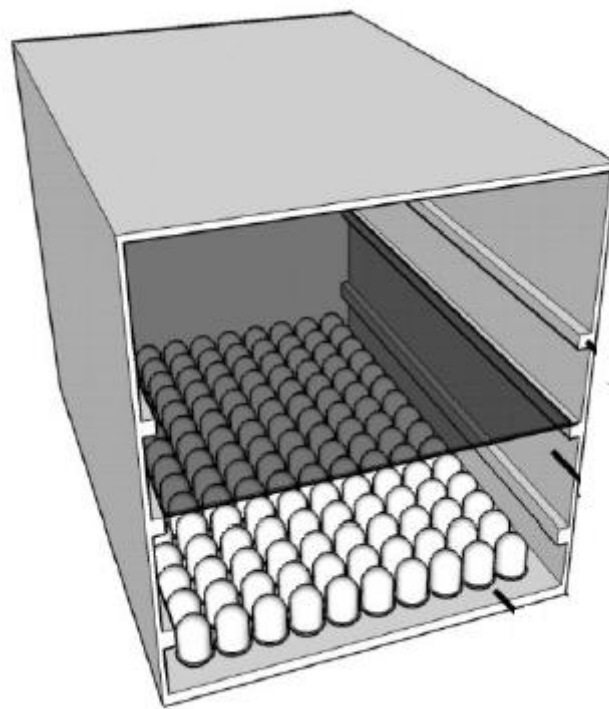


Figura 17. Esquema LED600

- AMS-II → Arranjou-se em série 7 LED de alta potência (Edison, modelo IR Edixeon). Os LED foram ligados através de um conversor construído pelo nosso grupo de pesquisa. O equipamento opera sob tensão 100 – 240 V, e mantém fixa a corrente de saída para cerca de 350 mA.

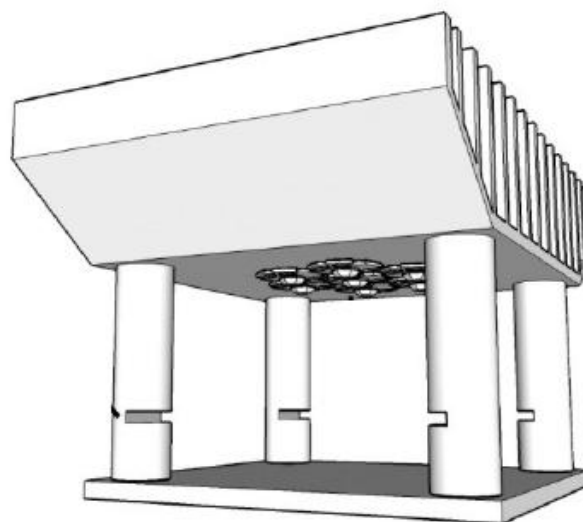


Figura 18. Esquema AMS-II

- WE-IV → Consiste em um arranjo de 4 lâmpadas fluorescentes de 20W cada fixadas em uma caixa metálica retangular, de 63cm² de área por 51cm de altura. Foi soldado na estrutura metálica, em seu interior, alguns suportes que permitiram a fixação de amostras.

5. Ensaios de Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os ensaios de concentração mínima inibitória foram realizados em placas de microdiluição com 96 poços de fundo chato utilizando o fotosensibilizador em diluições sucessivas, o aditivo (quando necessário), a suspensão celular de *Saccharomyces cerevisiae* e o meio de cultura. Após o preparo das placas, as mesmas foram colocadas em estufa a 37°C durante 48 horas. A leitura foi feita visualmente utilizando Resazurina como corante vital, ou seja, há a diferenciação da coloração das células vivas e mortas, onde as células vivas apresentam coloração rósea.

6. Preparo dos extratos de *Bidens sulphurea*

6.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal foi colhido no mês de Março de 2012 nas imediações do Campus Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia (-18° 55' 07"; -48° 16' 38"). Todo o material foi colhido por volta de 04:00 as 05:00 horas evitando que o mesmo sofresse incidência de luz solar no dia da coleta.

6.2. Secagem do material vegetal

O material fresco (989 g) foi seco em estufa à temperatura de 37°C na ausência de luz durante 3 semanas e o material seco (182,96 g) foi armazenado em frasco escuro, envolvido com papel alumínio.

6.3. Preparo do extrato bruto liofilizado (EBL)

Após a coleta, o material vegetal (182,96g) foi macerado e submetido à extração sob agitação ocasional sem renovação do líquido extrator com etanol a frio durante uma semana.

Em seguida o extrato foi filtrado e o solvente foi evaporado à pressão reduzida em um evaporador rotativo e, após redução de volume o extrato foi liofilizado para a obtenção do chamado Extrato Bruto Liofilizado (EBL).

6.4. Preparo dos extratos parcialmente fracionados

A partir do EBL foram coletadas frações parcialmente purificadas utilizando como solventes o Hexano (Hex), Acetato de Etila (EtA) e Diclorometano (DCM). O fracionamento foi realizado por extração líquido/líquido seguindo a ordem de polaridade.

7. Preparo de lipossomas contendo ftalocianina de cloroalumínio e ftalocianina de zinco.

Lipossomas foram preparados pelo método de injeção etanólica como descrito por Oliveira e seus colaboradores em 2005 (OLIVEIRA, 2005). 1000 µL de solução de fosfolípídeos foram misturados com 72 µL de solução de fotosensibilizador em um microtubo. Em seguida foi retirada uma alíquota de 750 µL desta solução resultante que foi colocada em uma seringa de insulina. A injeção foi realizada em 10 mL de solução salina a uma velocidade aproximada de 1-2 µL.s⁻¹. Após completa injeção os lipossomas foram dialisados para retirada de ftalocianina não encapsulada, DMSO e EtOH.

7.1. Determinação da taxa de encapsulamento

A taxa de encapsulamento foi realizada através de absorção molecular na região do visível no pico máximo de absorção de cada droga encapsulada.

A membrana dos lipossomas foi rompida com EtOH e foi realizada a leitura em espectrofotômetro dos lipossomas não dialisados (LND) e dos lipossomas dialisados (LD). A taxa de encapsulamento foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\% = (\text{ABS}_{\text{LD}}/\text{ABS}_{\text{LND}})*100 \quad (1)$$

8. Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Os ensaios para determinação de unidades formadoras de colônia de *Saccharomyces cerevisiae* foram feitos utilizando 100µL do inóculo em contato com 100µL da droga na

escala nefelométrica de Mc Farland, que é utilizada para a padronização da concentração bacteriana em uma suspensão através da turbidez. Após o tempo de incubação e irradiação previstos no protocolo, 10µL da suspensão celular foram colocados em placas de petri e foram cobertas com Agar Sabouraud Dextrose.

As placas foram colocadas em estufa à 37°C durante 48 horas e a contagem das Unidades Formadoras de Colônia foi realizada com o auxílio de um contador de colônias.

9. Extração de proteínas de *Moringa oleifera* Lam

9.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal foi colhido nos meses de Março, Abril e Maio de 2012 nas imediações do Campus Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia (-18° 55' 07"; -48° 16' 38").

9.2. Preparo do material vegetal

As sementes de *Moringa oleifera* foram retiradas da vagem e passaram por um processo de tratamento com NaClO 1% para esterilização. Após este processo as sementes foram colocadas em estufa à 37° para secagem e, em seguida, trituradas em liquidificador industrial para a obtenção do material de trabalho.

9.3. Preparo da solução de proteínas

As proteínas de *Moringa oleifera* foram extraídas utilizando diferentes soluções extratoras (água destilada, NaCl 0,15 mol L⁻¹ e NaCl 1,0 mol L⁻¹) em duas temperaturas (25°C e 50°C) durante tempos predeterminados (15 min, 1 h, 4 h e 24 h). 150 mL de solvente foi adicionado à 30 g do material de trabalho e colocados sob agitação durante os tempos predeterminados às temperaturas de 25°C e 50°C. Em seguida as soluções foram filtradas em papel de filtro quantitativo e estocadas para quantificação.

As soluções preparadas com água ou NaCl 1,0 mol L⁻¹ foram dialisadas em membranas de celulose utilizando NaCl 0,15 mol L⁻¹ durante 2 horas à temperatura ambiente.

9.4. Purificação das proteínas de *Moringa oleifera*

A purificação parcial do extrato bruto das sementes se deu a partir da precipitação pela adição de sulfato de amônio sólido até uma saturação de 100%. O precipitado da proteína foi ressuspenso em água destilada e filtrada para remover os materiais insolúveis. O extrato parcialmente purificado foi colocado em membranas semipermeáveis de diálise. A solução foi então vertida para dentro de uma coluna de DEAE celulose equilibrada com água para eluir as proteínas aglutinantes, seguido de uma solução de cloreto de sódio 1 mol L^{-1} para remoção das proteínas aderidas à coluna. As frações eluídas que obtiveram maior concentração de proteínas foram agrupadas em um só recipiente e superconcentradas pelo processo de piroevaporação. Essa fração de proteína superconcentrada foi vertida para uma coluna de carboximetilcelulose equilibrada em solução de cloreto de sódio 1 mol L^{-1} para a remoção das proteínas aglutinantes. A solução eluída foi dialisada em membranas semipermeáveis e quantificadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Foi realizada uma eletroforese SDS-PAGE a fim de verificar o grau de pureza da proteína.

9.5. Testes de atividade aglutinante das proteínas de *Moringa oleifera*

Os testes de atividade aglutinante foram realizados utilizando uma metodologia desenvolvida no LABIOFOT através de nanopartículas de ouro (ouro coloidal).

9.5.1. Preparo das nanopartículas de ouro.

As nanopartículas de ouro foram preparadas de acordo com o descrito em MELO JR (2012).

Aqueceu-se até a ebulição 100,0 mL de uma solução $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de HAuCl_4 em um Erlenmeyer, com agitação. Adicionou-se rapidamente 5,0 mL de solução 1% de citrato de sódio e manteve-se a solução em ebulição, tampada com um vidro de relógio, por 10 min, mantendo-se a agitação. Decorrido esse tempo, o aquecimento do sistema foi suspenso e a agitação mantida por mais 15 min em outra placa de agitação, porém sem aquecimento. A barra magnética foi, então, removida e a solução foi resfriada à temperatura ambiente sem a utilização de banho de gelo.

9.5.2. Ensaios de atividade aglutinante.

A atividade hemaglutinante, foi avaliada segundo Todorov e colaboradores (2003), utilizando eritrócitos humanos não tratados e eritrócitos de coelhos tratados com glutaraldeído. A papa de hemácia foi obtida centrifugando-se o sangue (coletado com anticoagulante) e lavando-se o precipitado três vezes com salina (NaCl 0,15 mol L⁻¹). Em seguida foi preparada a suspensão de eritrócito 3% (v/v) em salina. Realizou-se a diálise no tempo de 2 horas. Após a diálise, foram realizadas diluições seriadas em placas para microtitulação, em salina, seguido pela adição de um mesmo volume (100 µl) de eritrócitos. As amostras foram incubadas por 45 minutos para avaliação da atividade hemaglutinante.

A análise do método de aglutinação foi avaliada utilizando nanopartículas de ouro coloidal 15nm, extrato bruto de proteínas da folha de *Moringa oleifera* e proteína purificada de *Moringa oleifera*. O teste foi realizado em placas de microdiluição sendo realizadas diluições seriadas da proteína de *Moringa oleifera* com a posterior adição do ouro coloidal. Após a microdiluição, a amostra foi incubada por 45 minutos para avaliação da atividade aglutinante.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Padronização das condições experimentais

1.1. Fontes de irradiação

1.1.1. PHLS

O gráfico 1 mostra que o espectro do equipamento PHLS é bem amplo, percorrendo de 400 nm a 800 nm portanto não é homogêneo na irradiação, não sendo específico para drogas como ftalocianina de zinco ou azul de metileno, porém este sistema pode ser utilizado para os extratos de *Bidens sulphurea*, que possuem um espectro de absorção mais amplo. Assim a eficiência fotodinâmica do processo será melhor.

Ao adicionar o filtro no equipamento, o mesmo passa a emitir fótons em uma faixa menor de comprimento de onda, tornando-se mais específico, principalmente na região de absorção dos fotosensibilizadores utilizados no trabalho (ZnPc, MB, TB, AlClPc).

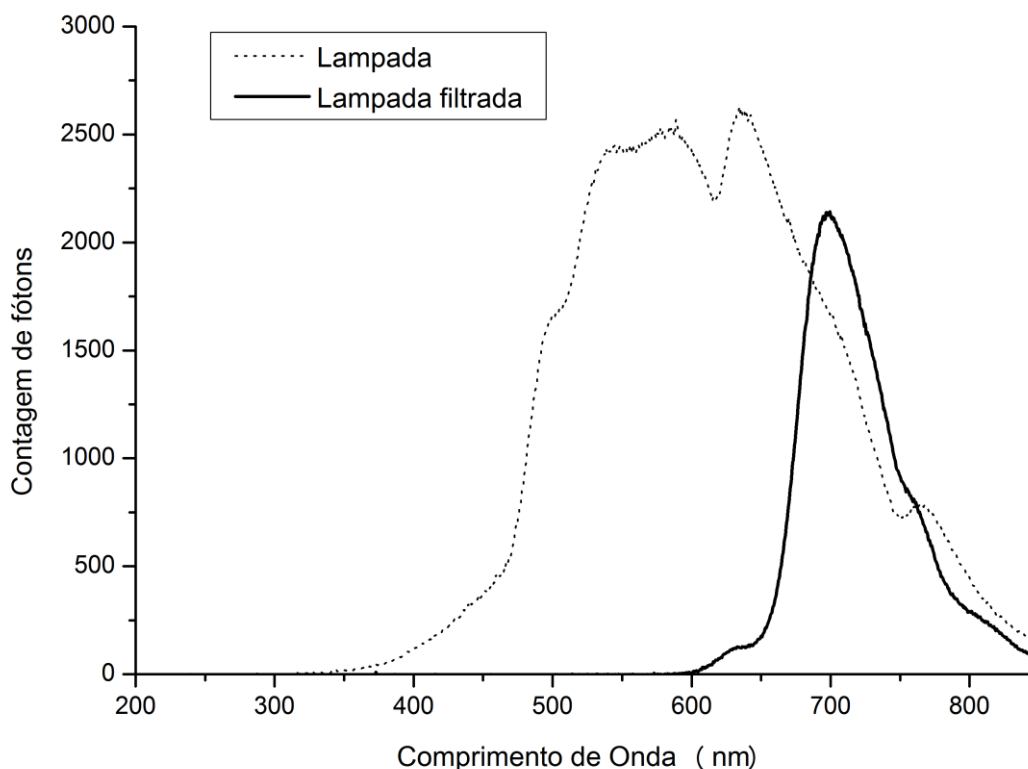


Gráfico 1. Espectro de emissão do equipamento PHLS com e sem filtro.

1.1.2. WE-IV

O espectro do WE-IV (Gráfico 2) é bastante amplo, porém pouco eficiente na região de maior interesse, chamada de janela terapêutica (600 nm a 700 nm). Este equipamento também será mais utilizado para a sensibilização dos componentes do extrato de *Bidens sulphurea*.

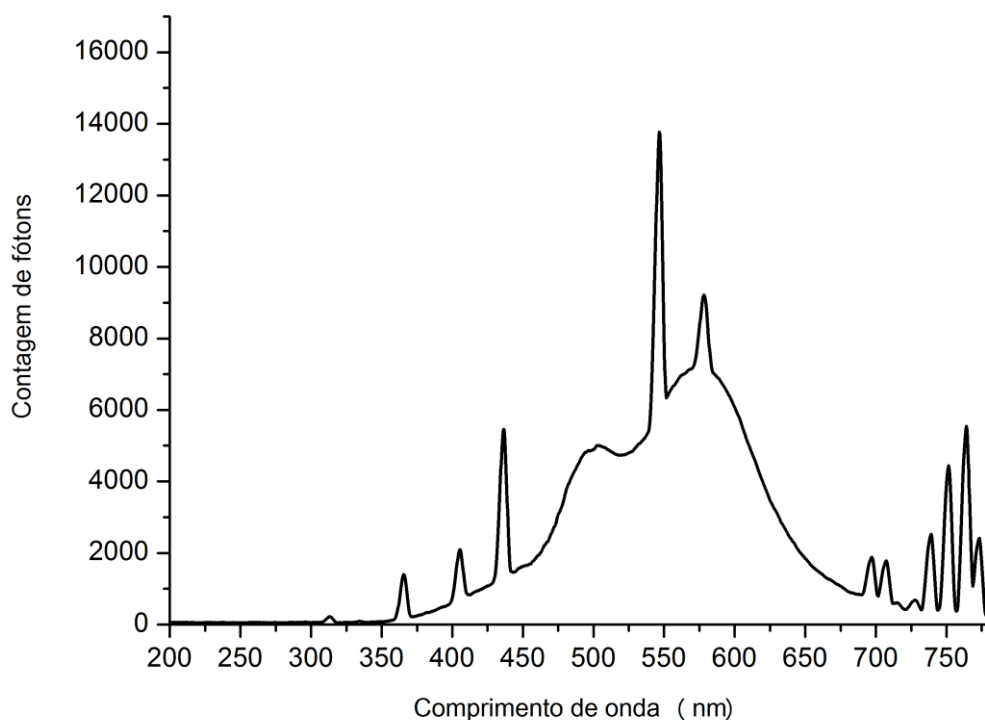


Gráfico 2. Espectro de emissão do equipamento WE-IV

1.1.3. LED600 e AMS-II

Ambos os equipamentos possuem como fonte de irradiação os diodos emissores de luz, sendo o LED 600 com diodos de alto brilho e o AMS-II de alta potência. O espectro de emissão destes equipamentos é apresentado no gráfico 3.

O espectro mostra que ambos os equipamentos emitem na janela terapêutica com bastante eficiência. O LED600 possui uma maior intensidade de emissão com comprimento de onda máximo de emissão em aproximadamente 640 nm e o AMS-II possui menor intensidade com comprimento máximo de emissão em aproximadamente 670 nm. Isto mostra

que o AMS-II pode ser mais eficiente para a excitação das ftalocianinas que possuem comprimento máximo de absorção próximo de 670 nm.

Porém, ambos os equipamentos, por serem bastante homogêneos com uma pequena faixa de comprimento de onda de emissão podem ser bastante eficientes para utilização como fonte de irradiação para a terapia fotodinâmica e inativação fotodinâmica.

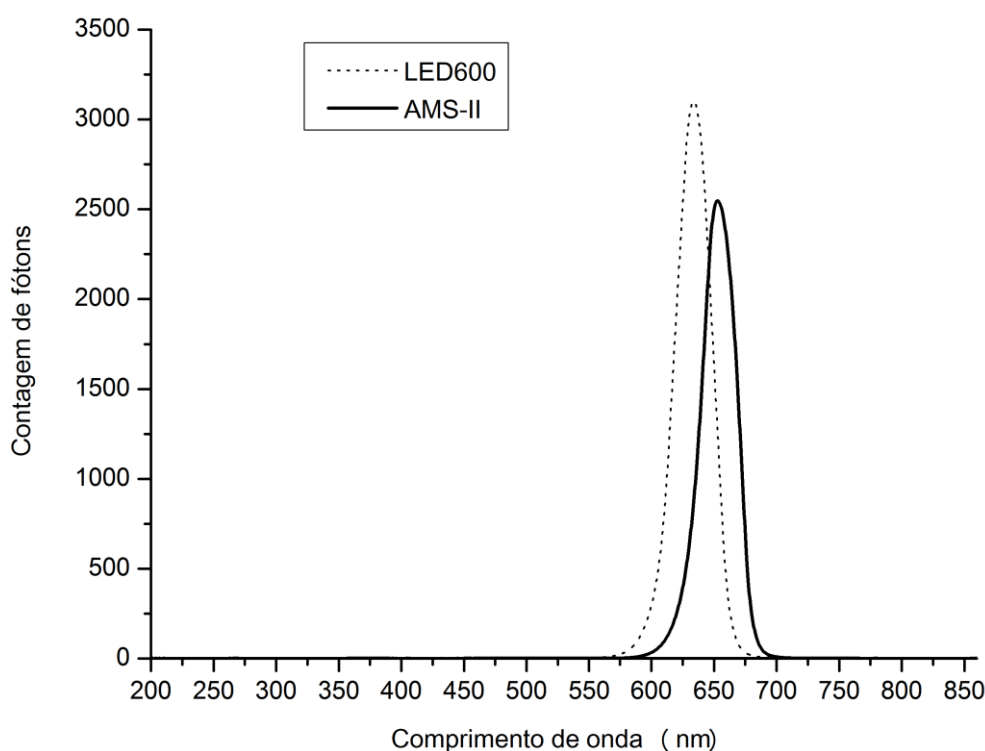


Gráfico 3. Espectro de emissão dos equipamentos LED600 e AMS-II

1.2. Tempo de incubação do fotosensibilizador com as células

A variação da concentração mínima inibitória de fotosensibilizador foi feita utilizando variação de 0 a 40 minutos de tempo de incubação. Para este teste, o tempo de irradiação foi constante em 20 minutos (tempo utilizado baseado em trabalhos anteriores do próprio laboratório com outros modelos celulares como macrófagos, eritrócitos e bactérias) e a distância entre a fonte luminosa e as células durante a irradiação também foi constante (PHLS: 21 cm; WE-IV: 11 cm; LED600: 11 cm; AMS-II: 5 cm).

Os gráficos 4 e 5 mostram a concentração mínima inibitória de azul de metileno e ftalocianina de zinco variando o tempo de incubação do fotosensibilizador com as células.

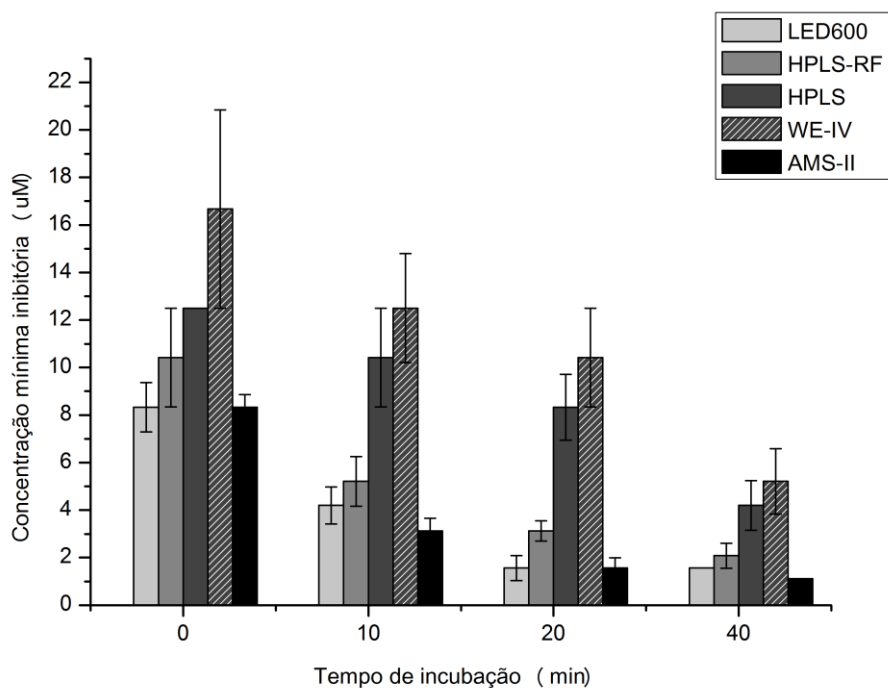


Gráfico 4. Concentração mínima inibitória de azul de metileno variando o tempo de incubação do fotosensibilizador com as células (3×10^6 células/mL).

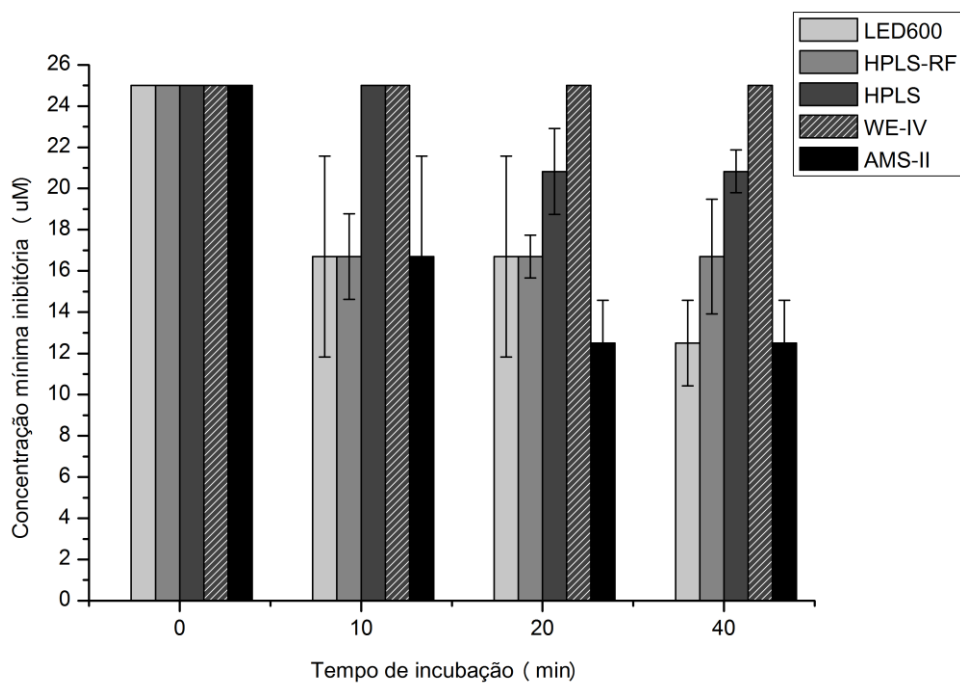


Gráfico 5. Concentração mínima inibitória de ftalocianina de zinco variando o tempo de incubação do fotossensibilizador com as células (3×10^6 células/mL).

Os gráficos mostram que quanto maior o tempo de incubação do fotossensibilizador com as células, menor a concentração mínima de inibição, pois há um maior tempo de interação entre eles. Para o azul de metileno, os equipamentos LED600 e AMS-II não apresentaram grandes variações na concentração inibitória mínima de 20 minutos para 40 minutos, enquanto os outros equipamentos apresentaram uma diferença considerável.

Para a ftalocianina de zinco, apenas o equipamento LED600 apresentou uma diferença de concentração inibitória mínima entre os tempos de 20 minutos e 40 minutos, porém não é uma diferença muito expressiva, principalmente se o desvio padrão for considerado.

A partir destes resultados foi definido um tempo de 20 minutos de incubação para a inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae*, pois praticamente não há diferenças consideráveis entre a concentração mínima inibitória para o tempo de 20 minutos e 40 minutos.

1.3. Tempo de irradiação das células

A variação da concentração mínima inibitória de fotossensibilizador foi feita utilizando variação de 0 a 40 minutos de tempo de irradiação. Para este teste, o tempo de incubação foi constante em 20 minutos (tempo utilizado baseado em trabalhos anteriores do próprio laboratório com outros modelos celulares como macrófagos, eritrócitos e bactérias) e a distância entre a fonte luminosa e as células durante a irradiação também foi constante (PHLS: 21 cm; WE-IV: 11 cm; LED600: 11 cm; AMS-II: 5 cm).

Os gráficos 6 e 7 mostram a concentração mínima inibitória de azul de metileno e ftalocianina de zinco variando o tempo de incubação do fotossensibilizador com as células.

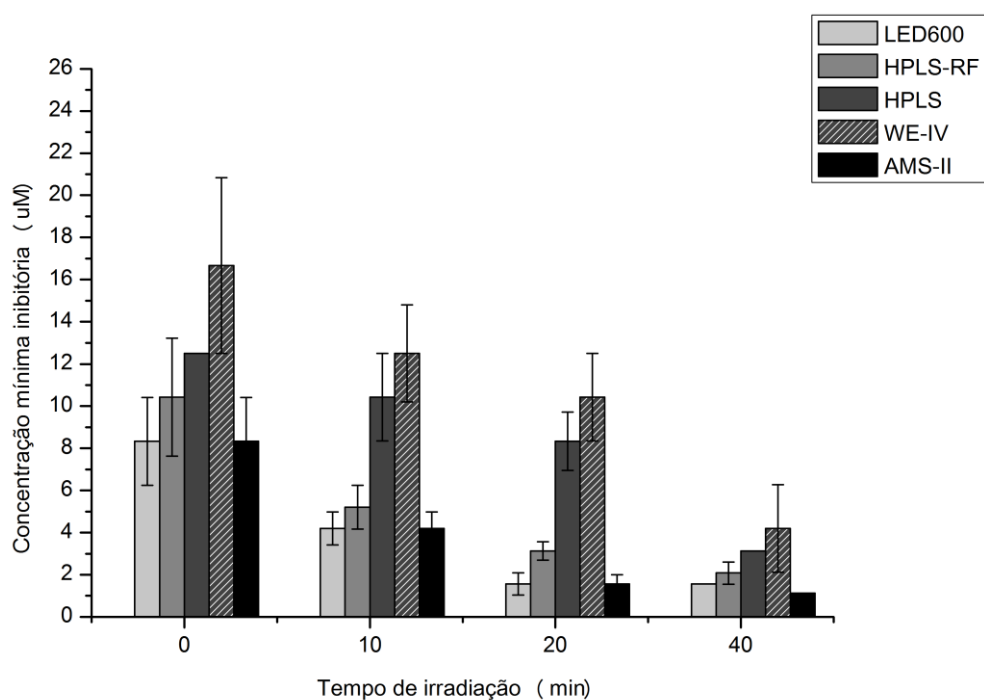


Gráfico 6. Concentração mínima inibitória de azul de metileno variando o tempo de irradiação.

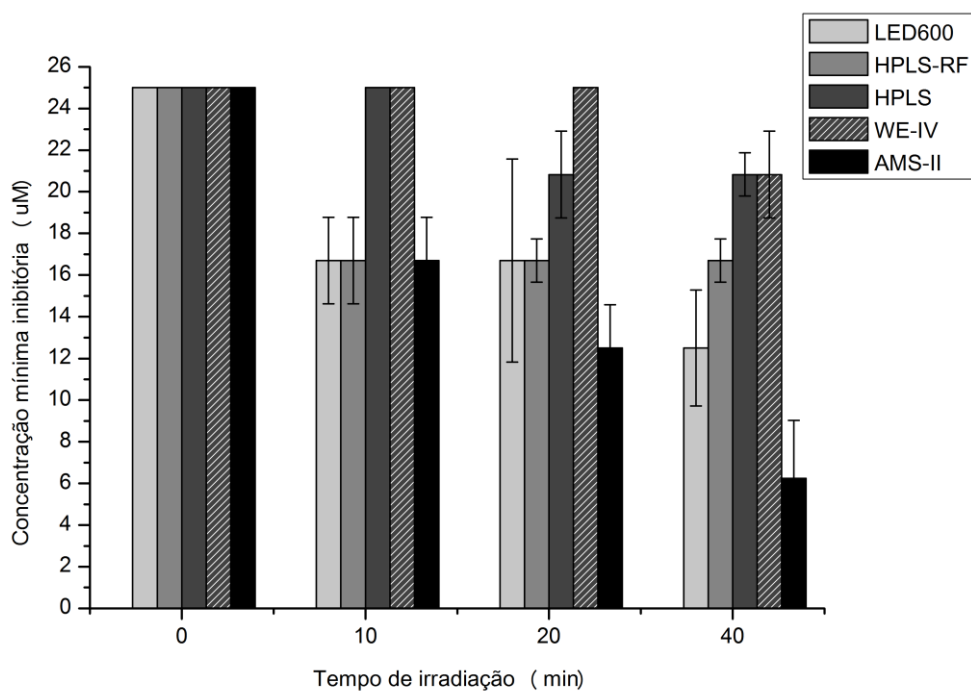


Gráfico 7. Concentração mínima inibitória de ftalocianina de zinco variando o tempo de irradiação.

Os gráficos mostram que quanto maior o tempo de irradiação das células após incubação com o fotosensibilizador, menor a concentração mínima de inibição, pois há um maior tempo de excitação do fotosensibilizador, permitindo a geração de uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio que irão atuar na inativação celular.

Para o azul de metileno, a concentração mínima inibitória não apresentou grandes variações entre 20 minutos e 40 minutos nos equipamentos LED600 e AMS-II. Já na ftalocianina de zinco, há uma grande diminuição da concentração mínima inibitória para estes dois equipamentos.

Apesar da eficiência com 40 minutos de irradiação ser maior, foi definido um tempo de 20 minutos de irradiação para a inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae*, pois este tempo de irradiação mostra as diferenças entre a excitação do azul de metileno e ftalocianina de zinco.

1.3. Distância da fonte de irradiação

A distância da fonte luminosa para as células foi determinada para os equipamentos LED600 e WE-IV, pois o PHLS não permite a alteração desta distância e o AMS-II possui uma área de irradiação pequena, o que não permite que esta distância seja alterada, pois iria diminuir a homogeneidade da irradiação.

Para estudo do efeito da distância na fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae* foi padronizado um tempo de incubação de 20 minutos e tempo de irradiação de 20 minutos, previamente padronizados.

O gráfico 8 mostra a concentração mínima inibitória de azul de metileno e ftalocianina de zinco frente à *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes distâncias da fonte luminosa.

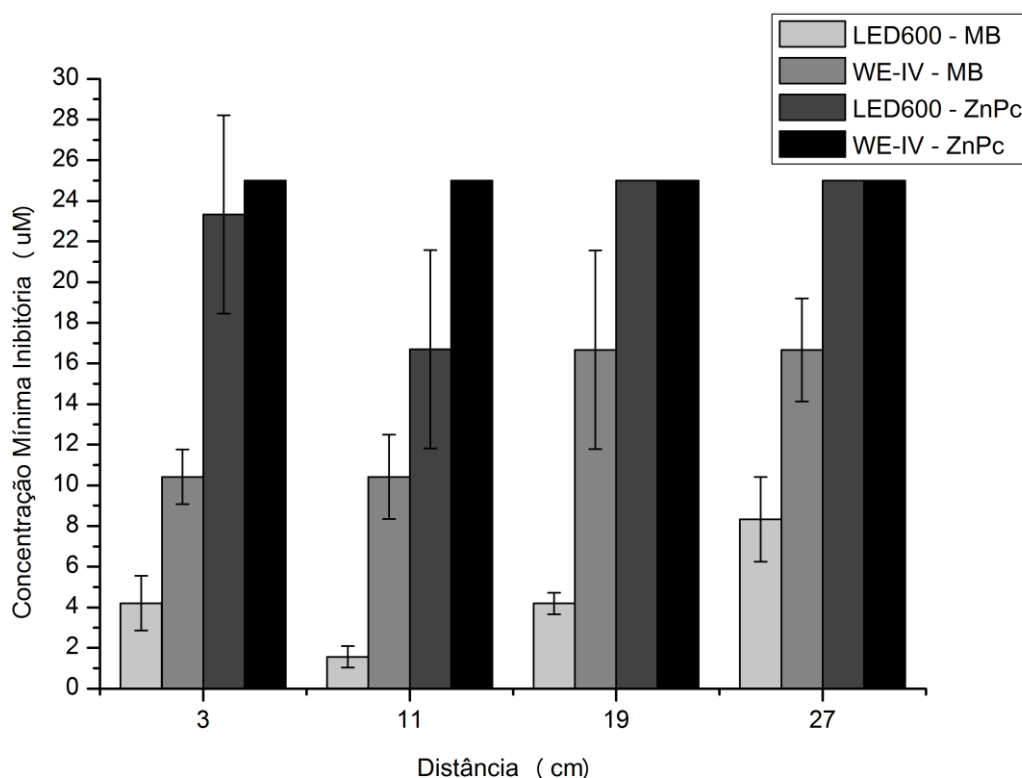


Gráfico 8. Concentração mínima inibitória de azul de metileno e ftalocianina de zinco frente à *Saccharomyces cerevisiae* (3×10^6 células/mL) em diferentes distâncias da fonte luminosa.

O gráfico 8 mostra que no equipamento LED600 a concentração mínima inibitória para ambos os fotosensibilizadores foi menor na distância de 11 cm da fonte luminosa. Já no equipamento WE-IV, a concentração mínima inibitória foi a mesma para as distâncias de 3 cm e 11 cm, evidenciando que quanto mais próximo à fonte luminosa, menor a concentração mínima inibitória.

Para o LED600, a concentração mínima inibitória foi maior na distância de 11 cm devido à ótica de distribuição da luz dos diodos. Na distância de 11 cm, a homogeneidade da irradiação provavelmente seja maior, causando uma diminuição na concentração mínima inibitória.

2. Atividade fotodinâmica dos fotosensibilizadores não encapsulados

A atividade fotodinâmica dos fotosensibilizadores não encapsulados em lipossomas e sem a presença de aditivos é mostrada no gráfico 9.

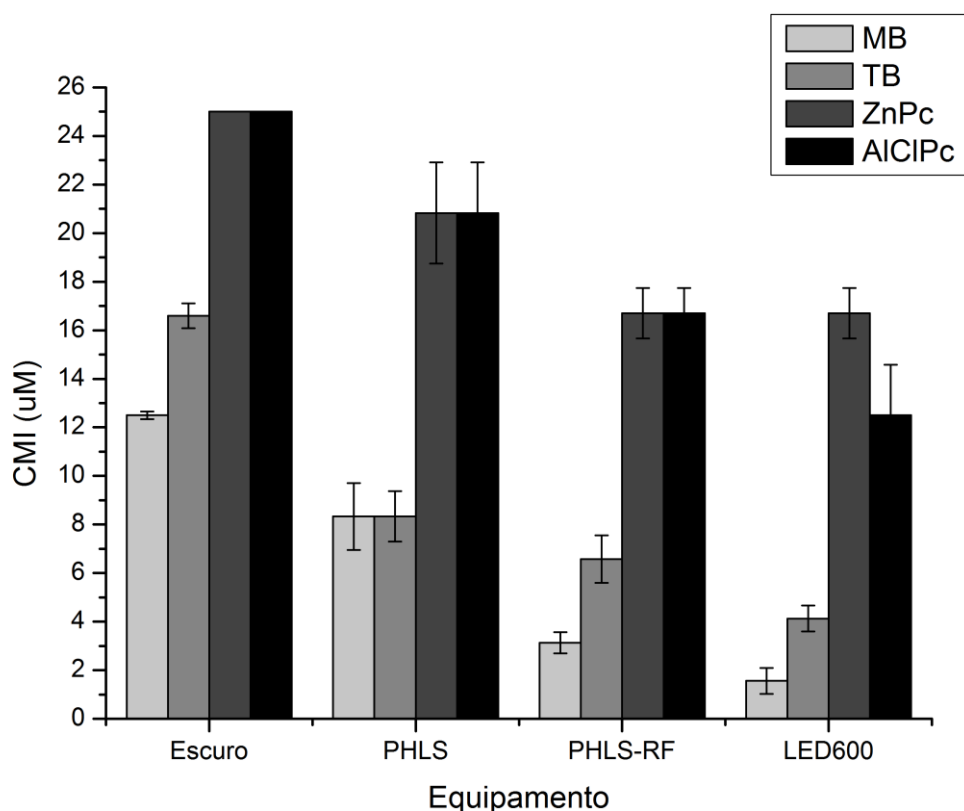


Gráfico 9. Concentração mínima inibitória dos diferentes fotosensibilizadores irradiados nos sistemas de irradiação PHLS e LED600. Tempo de incubação: 20 min; Tempo de irradiação 20 min; Distância da fonte luminosa: 11 cm (LED600) e 21 cm (PHLS); Concentração celular: 3×10^6 células/mL.

O gráfico 9 mostra que, entre os fotosensibilizadores testados, o mais eficiente nestas condições foi o azul de metileno, que é pouco mais eficiente que o azul de toluidina, estruturalmente muito semelhante e também é predominantemente hidrofílico.

A ftalocianina de cloro-alumínio se mostrou mais eficiente que a ftalocianina de zinco na fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae*. Este aumento da eficiência pode ser devido a uma maior interação entre esta droga e a membrana das células. Este aumento não é devido ao

rendimento quântico de geração de oxigênio singlete, pois estudos anteriores mostraram que este rendimento é maior para a ftalocianina de zinco do que para a ftalocianina de cloro-alumínio (IDOWU e NYOKONG, 2007).

O equipamento PHLS quando utilizado com o filtro é mais eficiente do que o mesmo equipamento sem o filtro, porém o LED600 ainda é mais eficiente para a inativação fotodinâmica.

Neste teste não foram utilizados os equipamentos WE-IV e AMS-II pois o primeiro se mostrou ineficiente para a inativação fotodinâmica nas condições padronizadas e o segundo equipamento, que é um protótipo, não se encontrava em perfeito funcionamento para utilização.

3. *Bidens sulphurea*

3.1. Extratos de *Bidens sulphurea*

Os extratos de *Bidens sulphurea* foram utilizados como possíveis fotosensibilizadores naturais para a inativação fotodinâmica. Outros produtos naturais já apresentaram esta característica como o *Hypericum perforatum*, conhecido como “Erva de São João”, de onde foi extraída a hipericina.

Para a utilização dos extratos, foi preparado um extrato bruto e, a partir deste, foi realizado um fracionamento com solventes (hexano, diclorometano e acetato de etila) para analisar em quais frações estão localizadas as substâncias com potencial atividade fotodinâmica.

Após o fracionamento, foi realizado um espectro de absorção molecular das três frações e do extrato bruto liofilizado obtidos (Gráfico 10).

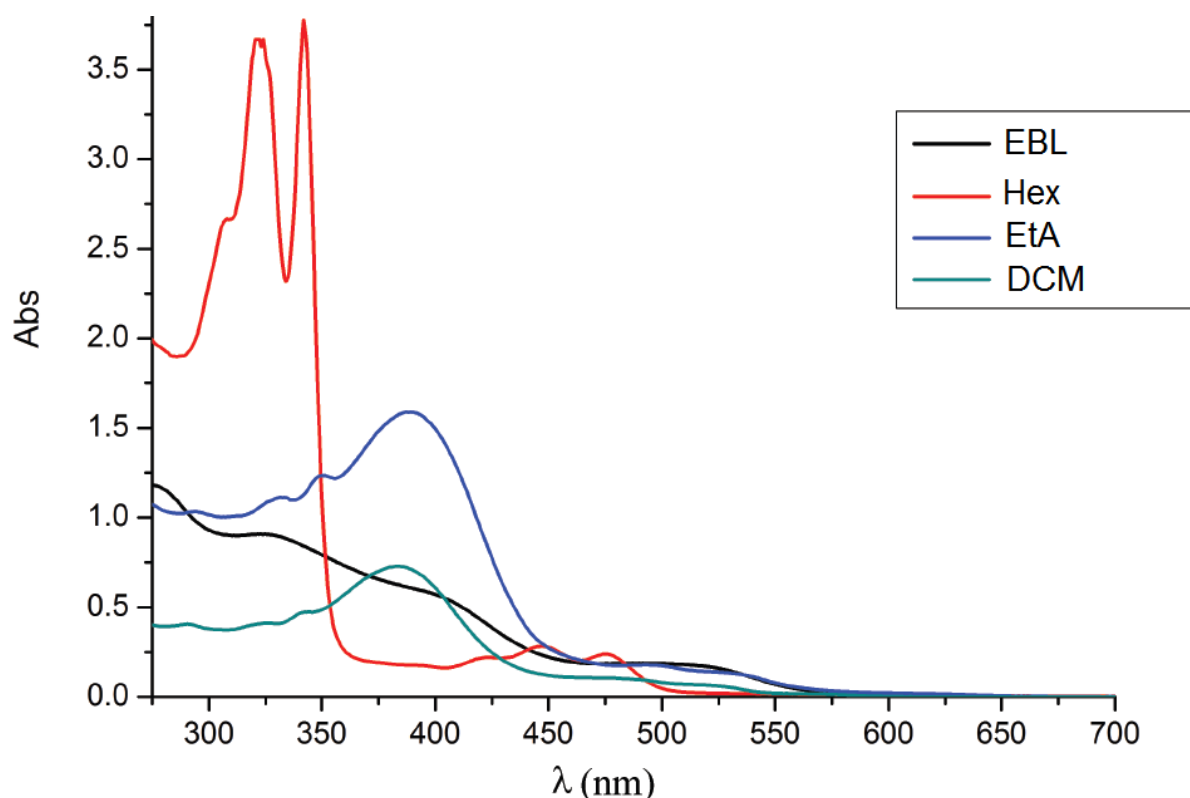


Gráfico 10. Espectro de absorção molecular no UV-Vis das frações Hex, DCM, EtA e do EBL obtidos de *Bidens sulphurea*.

O espectro de absorção molecular mostra que as frações acetato de etila e diclorometano possuem um comportamento muito próximo, com pico de absorção próximo a 400 nm. Já a fração hexano apresenta absorção molecular bem diferente das demais frações, tendo picos intensos em 330 e 350 nm, que pode caracterizar a presença de poliacetilenos, porém é necessário um estudo fitoquímico completo para comprovar a existência destas substâncias em sua constituição. O extrato bruto liofilizado apresenta um espectro com absorção decrescente entre 300 e 550 nm.

3.2. Citotoxicidade e atividade fotodinâmica dos extratos

Para avaliar a atividade fotodinâmica dos extratos de *Bidens sulphurea* frente à *Saccharomyces cerevisiae* o gráfico 11 apresenta a mortalidade celular das células na presença e ausência de irradiação luminosa.

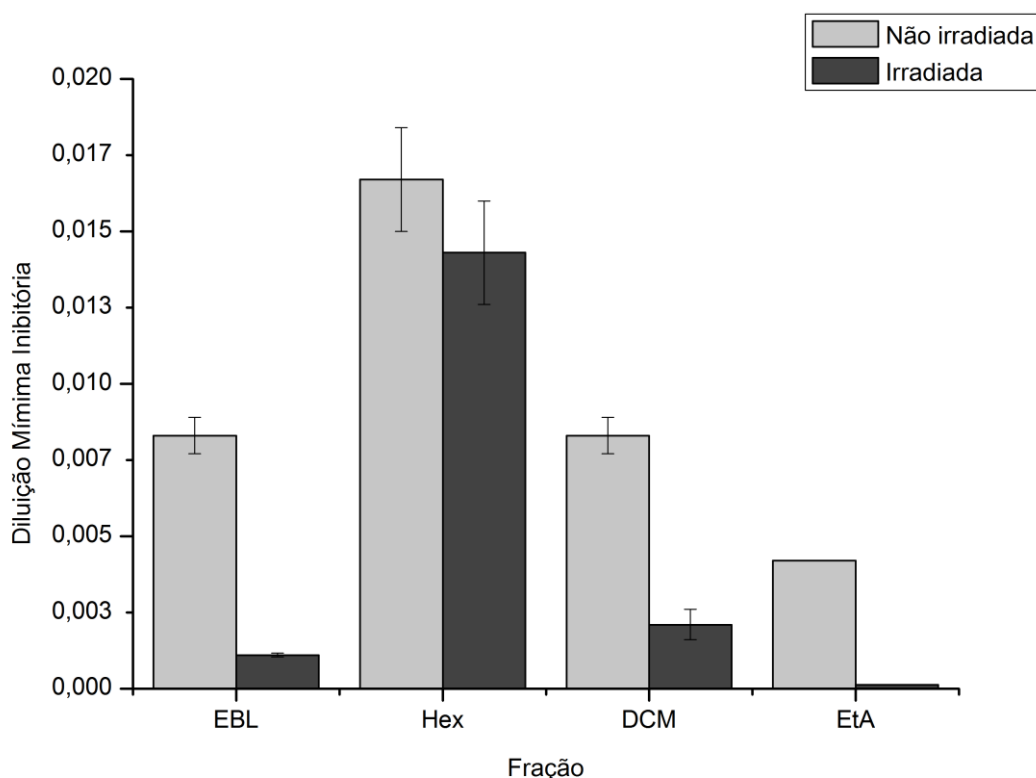


Gráfico 11. Diluição mínima inibitória dos extratos de *Bidens sulphurea* frente à *Saccharomyces cerevisiae* (3×10^6 células/mL). Tempo de incubação: 20 minutos; Tempo de Irradiação: 20 minutos; Equipamento de irradiação: PHLS; Distância da Fonte Luminosa: 21 cm.

O gráfico 11 mostra que a fração acetato de etila foi a mais eficiente na inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae* com uma diluição mínima inibitória de 1/7680, enquanto o mesmo extrato apresentou uma citotoxicidade de 1/240. A fração hexano não apresentou uma atividade fotodinâmica eficiente, sendo praticamente a mesma diluição inibitória mínima para sua citotoxicidade. O extrato bruto liofilizado também apresentou uma grande atividade fotodinâmica, pois os mesmos compostos presentes na fração acetato de etila estão presentes neste extrato, porém pode haver um número maior de antioxidantes que diminuem os efeitos fotodinâmicos para as células. Nenhum solvente nas concentrações utilizadas causou mortalidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*.

4. Lipossomas

4.1. Preparo das formulações lipossomais contendo ftalocianinas

As formulações lipossomais preparadas estão representadas na tabela 3.

Tabela 3. Formulações lipossomais preparadas com seus respectivos fotosensibilizadores, componentes e aditivos.

Formulação	Fotosensibilizador	Aditivos
LZ ₁	Ftalocianina de Zinco	-
LZ ₂	Ftalocianina de Zinco	Chol (2:1)
LZ ₃	Ftalocianina de Zinco	Chol (3:1)
LZ ₄	Ftalocianina de Zinco	Chol (5:1)
LZ ₅	Ftalocianina de Zinco	PEG3000 + Chol (3:1)
LZ ₆	Ftalocianina de Zinco	Albumina
LZ ₇	Ftalocianina de Zinco	Albumina + Chol (3:1)
LA ₁	Ftalocianina de Cloro-Alumínio	-
LA ₂	Ftalocianina de Cloro-Alumínio	Chol (3:1)

Todos os lipossomas puderam ser preparados pelo método da injeção etanólica.

Não foram preparados lipossomas utilizando como fotosensibilizadores o azul de metileno e o azul de toluidina, pois estudos anteriores do laboratório mostraram que a eficiência de encapsulamento destas drogas em lipossomas unilamelares produzidos pelo método de injeção etanólica é baixa.

A concentração final das ftalocianinas de zinco e cloro-alumínio nos lipossomas é de aproximadamente 5,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A taxa de encapsulamento dos fotosensibilizadores nos lipossomas preparados pode ser observada na tabela 4.

Tabela 4. Taxa de encapsulamento dos fotosensibilizadores em cada formulação lipossomal.

Formulação	Taxa de Encapsulamento(%)
LZ ₁	86 ± 2
LZ ₂	92 ± 4
LZ ₃	94 ± 4
LZ ₄	91 ± 3
LZ ₅	97 ± 1
LZ ₆	87 ± 3
LZ ₇	91 ± 2
LA ₁	85 ± 6
LA ₂	94 ± 2

Pode-se observar que a proporção entre o fosfolipídeo e o colesterol na composição da membrana não demonstra alterações significantes na taxa de encapsulamento das drogas, pois a ftalocianina é encapsulada entre a bicamada fosfolipídica, não sofrendo interferência direta do colesterol na taxa de encapsulamento, porém estudos computacionais são necessários para comprovar esta hipótese. Também não há diferença significativa entre a taxa de encapsulamento da ftalocianina de zinco e a ftalocianina de cloro-alumínio, o que era esperado, pois a fórmula estrutural das duas substâncias é bastante similar, com alteração apenas no elemento central. A presença de polietilenoglicol aumenta levemente a taxa de encapsulamento. Este aumento provavelmente seja devido ao revestimento que o polietilenoglicol faz na membrana fosfolipídica. De acordo com Lehtinen e colaboradores, este revestimento pode auxiliar no encapsulamento das drogas e dificultar a posterior saída das vesículas (LEHTINEN et al, 2012).

4.2. Ensaios de atividade fotodinâmica das formulações lipossomais

Os testes com lipossomas foram realizados utilizando unidades formadoras de colônia, pois os resultados em placas de microdiluição não foram satisfatórios, pois não foi possível observar diferenças significativas na concentração mínima inibitória. Assim o teste em placas de petri se mostrou mais eficiente para a avaliação da atividade fotodinâmica dos fotosensibilizadores encapsulados em diferentes formulações lipossomais.

Foram utilizadas as formulações lipossomais descritas na tabela 3 e também a ftalocianina de zinco e a ftalocianina de cloro-alumínio livres para comparação da eficiência do sistema de entrega de drogas utilizado.

Os resultados são apresentados no Gráfico 12 e Tabela 5.

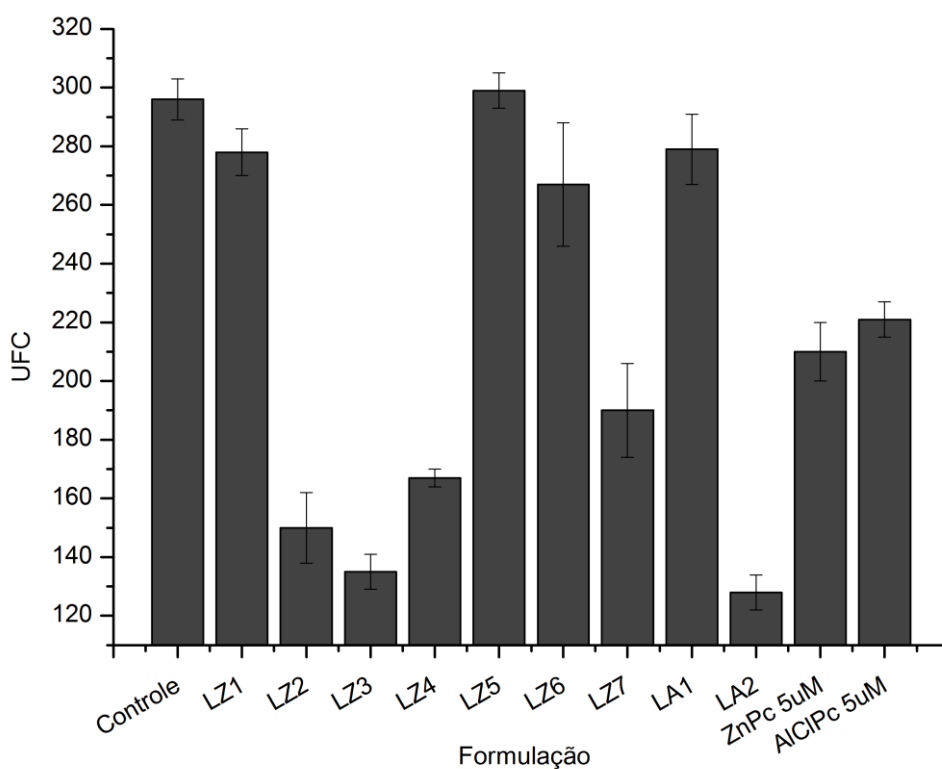


Gráfico 12. Unidades formadoras de colônia (UFC) de *Saccharomyces cerevisiae* após irradiação utilizando diferentes formulações lipossomais de ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloro-alumínio. Tempo de incubação: 20 minutos; Tempo de irradiação: 20 minutos; Equipamento de irradiação: LED600; Distância da fonte luminosa: 11 cm.

Tabela 5. Unidades Formadoras de Colônia de *Saccharomyces cerevisiae* em cada formulação lipossomal de ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloro-alumínio.

Formulação	UFC
Controle	296
LZ ₁	278
LZ ₂	150
LZ ₃	135
LZ ₄	167
LZ ₅	299
LZ ₆	267
LZ ₇	190
LA ₁	279
LA ₁	128
ZnPc 5 uM	210
AlClPc 5 uM	221

Os resultados mostram que lipossomas sem colesterol (LZ₁ e LA₁) não provocam uma mortalidade celular eficiente, provavelmente devido a uma baixa eficiência na entrega da droga. Esta baixa eficiência pode ser explicada pelo grande diâmetro dos lipossomas sem colesterol já descritos na literatura (OLIVEIRA, 2005). Este efeito também pode ocorrer pois o colesterol diminui a rigidez entre os fosfolípidos da membrana facilitando a entrega das drogas (FRÉZARD, 2005). Lipossomas convencionais contendo colesterol na proporção de 3:1 (LZ₃ e LA₂) inativam aproximadamente 45% das células, mostrando uma boa eficiência da técnica para as drogas de interesse, sendo que lipossomas contendo ftalocianina de zinco e ftalocianina de cloro-alumínio apresentaram praticamente a mesma mortalidade celular.

A variação da concentração de colesterol nos lipossomas também influenciou na mortalidade celular. Lipossomas contendo colesterol na proporção DPPC/Chol 3:1 (LZ₃) foram os mais eficientes. Provavelmente esta proporção seria a mais estável para as vesículas. Para confirmar esta hipótese são necessários estudos de dinâmica molecular para avaliar a influência do colesterol na estabilidade da vesícula e, principalmente na entrega das drogas.

Lipossomas contendo polietilenoglicol (LZ₅) não apresentam mortalidade celular efetiva, isto pode ocorrer, pois o PEG forma uma camada protetora na parte externa dos lipossomas, tornando-os “invisíveis” para as células, são chamados lipossomas furtivos, como

as células não o reconhecem, a interação célula/droga não é eficiente para este tempo de incubação. Lipossomas contendo albumina (LZ₆ e LZ₇) inativam um menor número de células que lipossomas sem albumina, provavelmente a albumina forma uma camada protetora externa nos lipossomas que é similar à camada criada pelo polietilenoglicol, diminuindo a interação dos mesmos com as células.

Os resultados mostram que as drogas encapsuladas em lipossomas apresentam uma mortalidade celular maior que as drogas livres, evidenciando que os lipossomas facilitam a entrega destas drogas para as células, sendo assim mais eficientes para a inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae*.

5. *Moringa oleifera* Lam

Neste trabalho, as proteínas extraídas de *Moringa oleifera* Lam são utilizadas como sistema de entrega de drogas para a inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae*, em substituição aos lipossomas, que já são descritos na literatura.

5.1. Extração das proteínas de *Moringa oleifera* Lam

As proteínas de *Moringa oleifera* foram extraídas conforme metodologia descrita e a dosagem de proteínas foi realizada através do método de Lowry e colaboradores (1951). Foi realizada uma curva de calibração com albumina sérica bovina com concentrações de 0,6025 mg/mL a 10 mg/mL.

O resultado apresenta a concentração de proteínas em mg de proteína por mL de extrato.

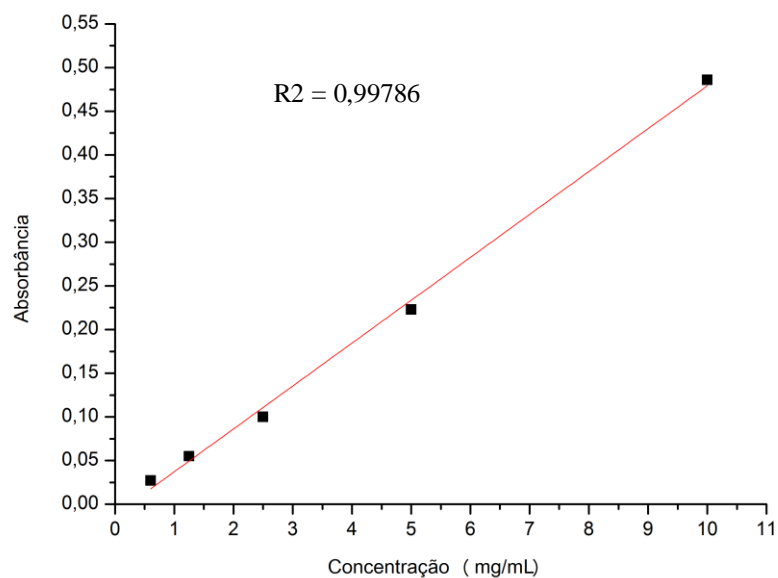


Gráfico 13. Curva de calibração para dosagem de proteínas em extrato de *Moringa oleifera* Lam.

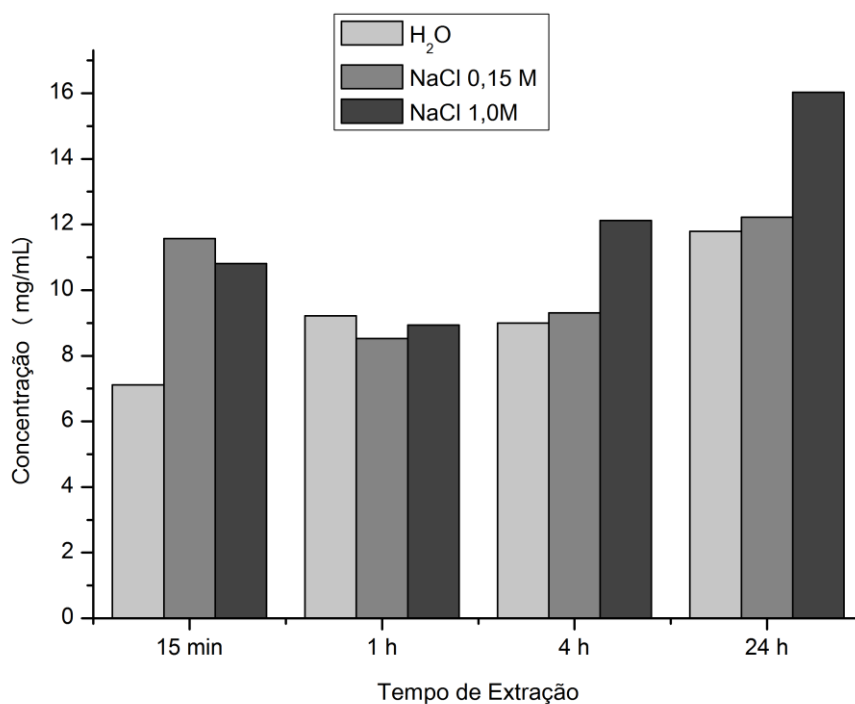


Gráfico 14. Concentração de proteínas no extrato de *Moringa oleifera* Lam em diferentes solventes e tempos de extração à temperatura de 25°C.

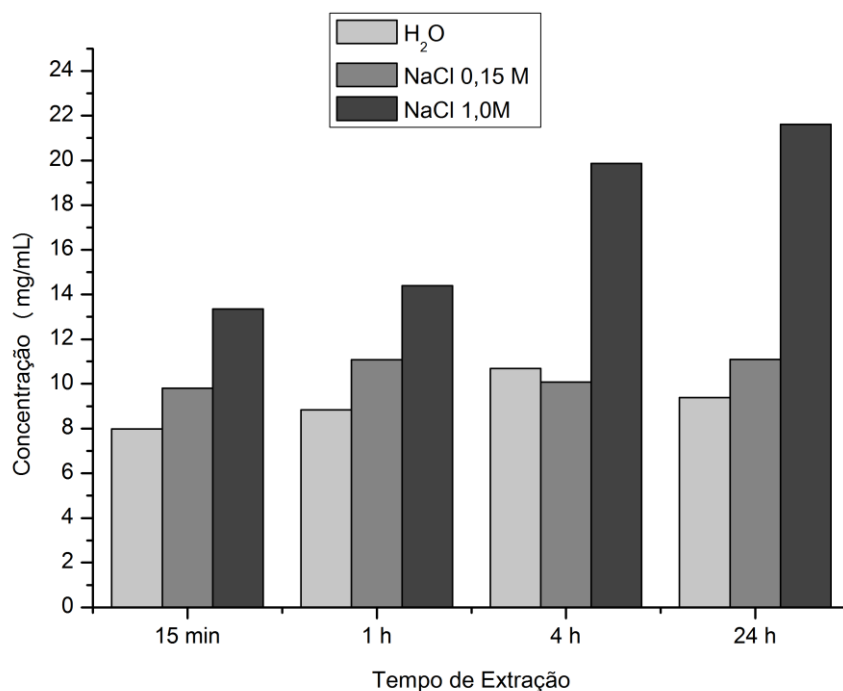


Gráfico 15. Concentração de proteínas no extrato de *Moringa oleifera* Lam em diferentes solventes e tempos de extração à temperatura de 50°C.

Pode se observar que com o aumento da temperatura, a quantidade de proteína extraída é maior. Além disto, em NaCl 1,0M a concentração de proteínas em mg/mL é bem superior aos outros solventes, isto se deve ao processo de “*salting in*” que consiste em um aumento da solubilidade de determinados solutos com o aumento da força iônica do meio, fazendo com que a extração seja mais eficiente, porém este efeito começa a diminuir com o aumento excessivo da concentração de sal no meio. Nos tempos de 24 horas a extração foi mais eficiente, mostrando que quanto maior o tempo de extração, maior a concentração de proteínas na solução final.

Após a extração das proteínas, foi desenvolvido um método para avaliação da atividade aglutinante das proteínas. O método de hemaglutinação não foi eficiente para este tipo de proteína, portanto foi feito o teste utilizando ouro coloidal. A partir do teste pôde-se observar que as proteínas extraídas pelo método proposto possui atividade aglutinante. O resultado pode ser observado na figura 19.

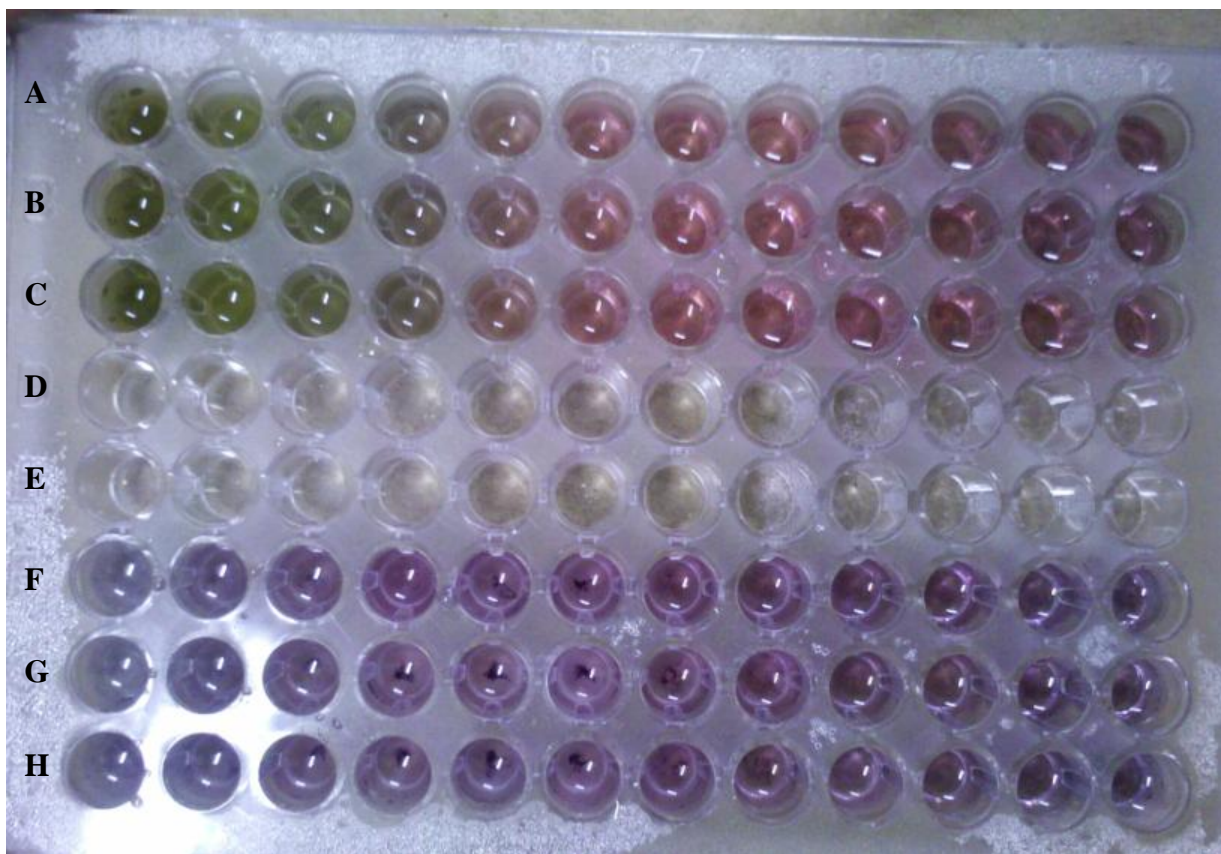


Figura 19. Ensaio de aglutinação de proteínas de *Moringa oleifera* Lam utilizando ouro coloidal. Linhas A, B e C: Folhas; Linhas F, G, H: Sementes.

Após a extração, foi iniciado um processo para a purificação das proteínas aglutinantes de *Moringa oleifera* Lam através da precipitação com Sulfato de Amônio, eluição em coluna de DEAE celulose e em seguida carboximetilcelulose (cromatografia por afinidade). A proteína aglutinante não pôde ser purificada devido à homogeneidade das mesmas. Seria necessária uma coluna com quitina modificada para realizar tal purificação, porém a mesma não foi obtida. O resultado da eletroforese mostra que a cada passo da purificação, a quantidade da proteína de maior peso molecular diminui, enquanto a proteína de menor massa permanece praticamente constante (figura 20).

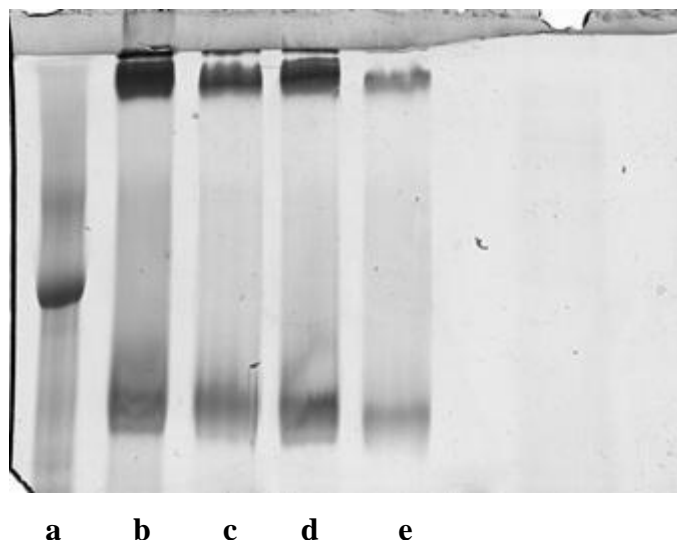


Figura 20. Eletroforese SDS-PAGE das proteínas de *Moringa oleifera* Lam. a) Padrão de peso molecular 50kDa; b) Extrato bruto sem purificação; c) Extrato bruto após purificação com sulfato de amônio; d) Fração após eluição em DEAE Celulose; e) Fração após eluição em carboximetilcelulose.

5.2. Efeito de proteínas de *Moringa oleifera* Lam na fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae*

Foram realizados os testes para avaliar o efeito das proteínas de *Moringa oleifera* Lam apenas com os fotosensibilizadores azul de metileno e ftalocianina de zinco no equipamento LED600. Os resultados são apresentados no gráfico 16.

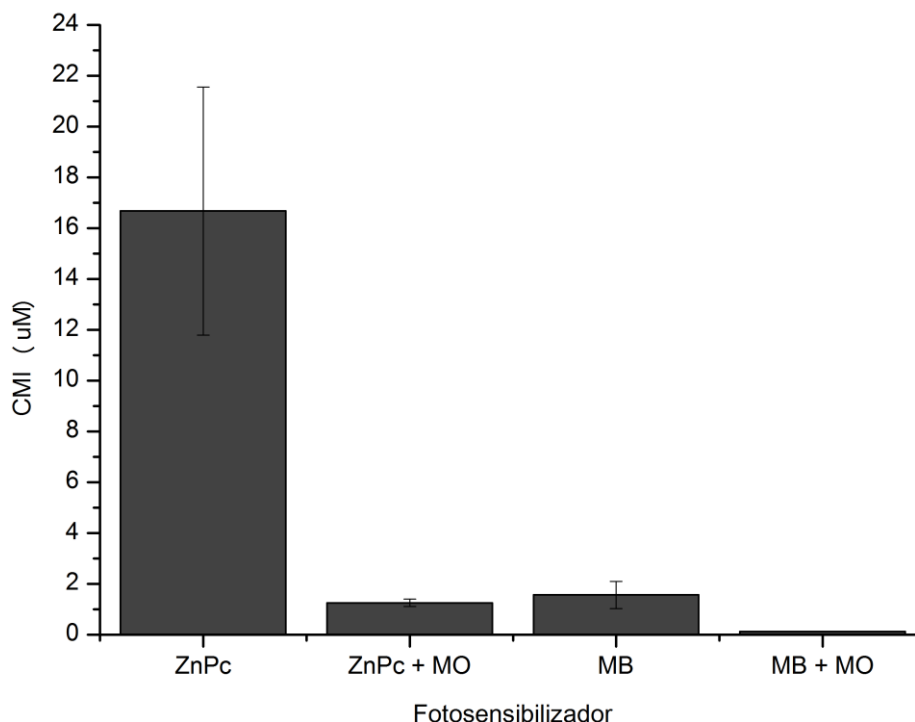


Gráfico 16. Concentração mínima inibitória dos fotossensibilizadores azul de metileno e ftalocianina de zinco com a presença de proteínas de *Moringa oleifera* Lam. Tempo de incubação: 20 min; Tempo de irradiação 20 min; Distância da fonte luminosa: 11 cm. Quantidade de células: 3×10^6 células/mL.

O gráfico 16 mostra que as proteínas de *Moringa oleifera* Lam potencializam a atividade dos fotossensibilizadores frente à *Saccharomyces cerevisiae*. A concentração mínima inibitória diminui consideravelmente tanto para a ftalocianina de zinco quanto para o azul de metileno. A proteína provavelmente facilita a interação entre as drogas e a membrana das células, o que aumenta a mortalidade celular.

As proteínas de *Moringa oleifera* não apresentam mortalidade celular sobre *Saccharomyces cerevisiae* na ausência do fotossensibilizador, o que evidencia que ela apenas auxilia no processo de entrega da droga para as células.

Os efeitos das proteínas de *Moringa oleifera* Lam sobre a diluição mínima inibitória do extrato bruto liofilizado de *Bidens sulphurea* é mostrado no gráfico 17.

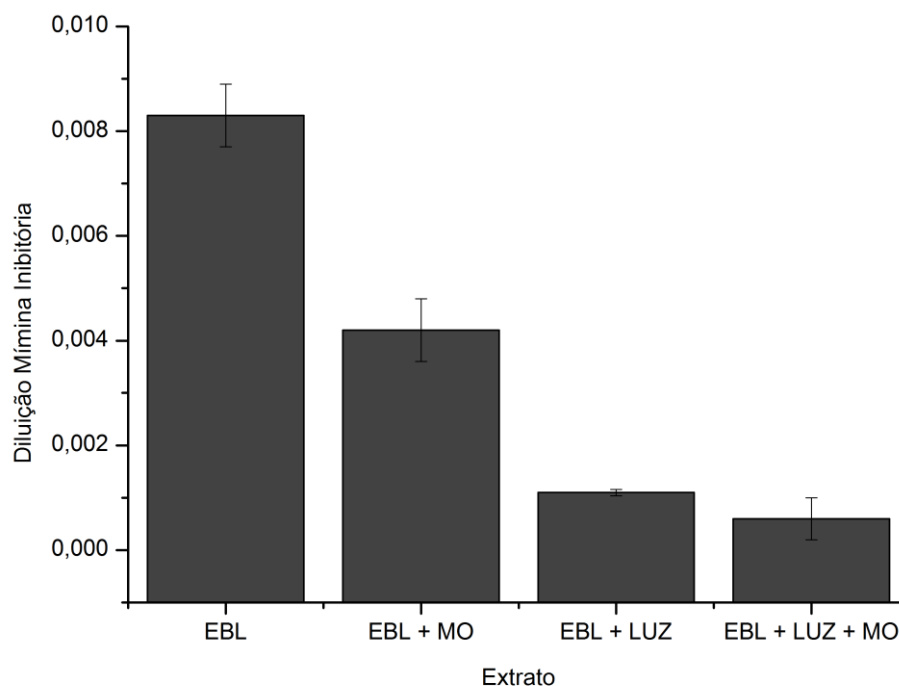


Gráfico 17. Diluição mínima inibitória do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Bidens sulphurea* com a presença de proteínas de *Moringa oleifera* (MO) na presença e ausência de irradiação luminosa. Tempo de incubação: 20 minutos; Tempo de irradiação: 20 minutos; Equipamento de Irradiação: PHLS; Distância da fonte luminosa: 21cm.

O gráfico 17 mostra que, assim como nos fotosensibilizadores sintéticos, as proteínas de *Moringa oleifera* Lam contribuíram para a diminuição da diluição mínima inibitória do extrato bruto liofilizado de *Bidens sulphurea* frente à *Saccharomyces cerevisiae*.

As proteínas de *Moringa oleifera* aumentam a interação entre as substâncias presentes no extrato bruto e as células, facilitando a ação citotóxica ou fotodinâmica.

V. CONCLUSÕES

Lipossomas são excelentes veículos transportadores de fotosensibilizadores hidrofóbicos para utilização em inativação fotodinâmica, assim podemos concluir que podem ser utilizadas na terapia fotodinâmica.

O extrato bruto de *Bidens sulphurea* já havia apresentado uma atividade fotodinâmica no trabalho de NETO (2011), porém neste trabalho, com o fracionamento do extrato bruto liofilizado pôde-se observar que este produto natural é muito promissor na possível busca por novos fotosensibilizadores para a terapia fotodinâmica, de forma a diminuir ainda mais os custos da técnica.

Para potencializar o efeito de drogas sintéticas hidrofóbicas como a ftalocianina de zinco, foi descrita neste trabalho a utilização de proteínas de *Moringa oleifera* Lam. Estas macromoléculas se comportaram como um sistema de entrega de drogas (“*Drug Delivery System*”) que foi mais eficiente que os lipossomas para as condições testadas. O que mostra ser um resultado bastante promissor no que se trata a entrega de drogas, pois estas proteínas são facilmente obtidas e são atóxicas, sendo utilizadas inclusive em alimentação humana.

Um novo método para verificação da atividade aglutinante de proteínas também pôde ser desenvolvido com a utilização de nanopartículas de ouro e testes para a avaliação da presença destas proteínas poderão ser realizados a partir desta metodologia.

Os sistemas de irradiação se mostraram eficientes para a inativação fotodinâmica utilizando ftalocianina de zinco, ftalocianina de cloro-alumínio, azul de metileno e azul de toluidina, além dos extratos de *Bidens sulphurea*.

Ainda são necessárias diferentes otimizações no processo para possível utilização na terapia fotodinâmica, como na caracterização da proteína de *Moringa oleifera* responsável pela entrega das drogas, o desenvolvimento de sistemas que sejam possíveis para utilização in vivo e o isolamento da substância ou substâncias que possuem a atividade fotodinâmica em *Bidens sulphurea*, porém este trabalho abre inúmeras possibilidades para uma possível aplicação da terapia fotodinâmica com um baixo custo.

REFERÊNCIAS

AKAMATSU, K., Development of a thermal neutron-sensitive liposome for a novel drug delivery system aiming for radio-chemo-concurrent cancer therapy, **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, n. 12, p. 1179-1183, 2009.

ANDRESEN, T. L.; JENSEN, S. S.; JORGENSEN, K. Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release. **Progress on Lipid Research**, v. 44, p.68-97, 2005.

ANWAR F, et al., *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytother Res.** Jan; 21(1):17-25. 2007.

ARENAS, Y. et al., Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Ru(II)-based type I/type II photosensitizers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. xx, n. xx, p. 1-11, 2013. No prelo.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WEISSMANN, G., The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations, **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 253-259, 1965.

BARBOSA, L. S., Estudo dos processos de magnetohipertermia e terapia fotodinâmica mediados por magnetolipossomas fotossensibilizados em camundongos. **Tese de Doutorado em Patologia Molecular**, 157p, UnB, 2008.

BARTSOSOVÁ, J., HRKAL, Z., Accumulation of protoporphyrin-IX (PpIX) in leukemic cell lines following induction by 5-aminolevulinic acid (ALA), **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 126, n. 3, p. 245-252, 2000.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S., Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BEN-YEHUDA, A. et al. Immunogenicity and safety of a novel IL-2-supplemented liposomal influenza vaccine (INFLUSOME-VAC) in nursing-home residents. **Vaccine, Kidlington**, v. 21, p. 3169-3178, 2003.

BEYER, W., Systems for light application and dosimetry in photodynamic therapy, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, n. 2, p. 153-156, 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição de Campinas**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BROWN, S. B., BROWN, E. A., WALKER, I.; The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, n. 1, p. 497-508, 2004.

BRÜNE, B., Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?, **Cell Death Differ**, v. 10, n. 8, p. 864-869, 2003.

BUDAI, M. et al., UV light induced photodegradation of liposome encapsulated fluoroquinolones: An MS study, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 198, n. 2-3, p. 268-273, 2008.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANO, M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 15, p. 186-190, 2010.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P., Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

CÁCERES, A. et al., Pharmacological properties of ikforinga oZe\$era. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, p. 213-216, 1991.

CAMMAS, S.; KATAOKA, K., Solvents and Self-Organization of Polymers; Webber, S.E.; Munk, P.; Tuzar, Z., eds.; **Kluwer Academic Publishers, Dordrecht**, p. 83-113, 1996.

CHANG, T. M. S., Semipermeable Microcapsules, **Science**, v. 146, n. 3643, p. 524-525, 1964.

CHANG, T. M. S., The in vivo Effects of Semipermeable Microcapsules containing L-Asparaginase on 6C3HED Lymphosarcoma, **Nature**, v. 229, p. 117-118, 1971.

CHANG, T. M. S.; POZNANSKY, M. J., Semipermeable Microcapsules containing Catalase for Enzyme Replacement in Acatalasaemic Mice, **Nature**, v. 218, p. 243-245, 1968.

CHANG, Y. J. et al. Therapeutic efficacy and microSPECT/CT imaging of ¹⁸⁸Re-DXR-liposome in a C26 murine colon carcinoma solid tumor model. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 37, n. 1, p. 95-104, 2010.

CHEENPRACHA, S. et al., Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Volume 18, Issue 17, Pages 6598-6602, 2010.

CHIARUGI, A.; MOSKOWITZ, M. A., PARP-1—a perpetrator of apoptotic cell death?, **Science**, v. 297, n. 5579, p. 259–263, 2002.

CHO, K. Y., SALTON, M. R. J., Fatty acid composition of the lipids of membranes of gram-positive bacteria and “walls” of gram-negative bacteria, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Lipids and Related Subjects**, v. 84, n. 6, p. 773-775, 1964.

CHORILLI, M. et al., Lipossomas e suas aplicações dermocosméticas. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, p. 75-79, 2004.

CHUANG et al., Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 232-236, 2007.

COLLINS, K., Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B **Saunders Company**. ISBN 0-7216-7335-X. 460p, 1998.

COSTA, V.; MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects Medicine**, v.22, p.217-246, 2001.

DAFTARIAN, P. et al., Eradication of established HPV 16-expressing tumors by a single administration of a vaccine composed of a liposome-encapsulated CTL-T helper fusion peptide in a water-in-oil emulsion. **Vaccine**, v. 24, n. 1, p. 5235-5244, 2006.

DAVIES, N., WILSON, B. C., Interstitial in vivo ALA-PpIX mediated metronomic photodynamic therapy (mPDT) using the CNS-1 astrocytoma with bioluminescence monitoring, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 4, n. 3, p. 202-212, 2007.

DERYCKE, A. S. L; WITTE, P. .A. M.; Liposomes for photodynamic therapy, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 1, p. 17-30, 2004.

DIAZ-RUIZ, R.; RIGOULET, M.; DEVIN, A., The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 568-576, 2011.

DONGMEZA, E. et al., Effects of dehydrated methanol extracts of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves and three of its fractions on growth performance and feed nutrient assimilation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* (L.)), **Aquaculture**, Volume 261, Issue 1, Pages 407-422, 2006.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. **Cancer Research**. v. 38, n. 1, p. 2628-2635, 1978.

EHRLICH, P. **Collected Studies on Immunology**, ed. John Wiley & Sons, Londres, p. 404-442, 1906.

EL-ANEED, A., An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 94, p. 1-14, 2004.

FAIZI, S. et al., Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*, **Phytochemistry**, Volume 38, Issue 4, Pages 957-963, 1995.

FEHR, M. K. et al., Structural and functional effects of endometrial photodynamic therapy in a rat model, **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 175, n. 1, p. 115-121, 1996.

FELDMANN, H., **Yeast: Molecular and Cell Biology**. Ed. Wiley Blackwell, 348p. 2010.

FÉLIX, M. M. et al., Evaluation of interaction between liposome membranes induced by stimuli responsive polymer and protein. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 5, p. 498-501, 2002.

FERREIRA, T. C., **Clonagem e Expressão do Fator 1 Humano Induzível por Hipóxia (HIF-1) na Levedura *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular. Universidade de Brasília. 142p. 2006.

FRÉZARD, F. Et al., Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, p.511-518, 2005.

GALLUZZI, L.; KROEMER, G., **Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis**. *Cell*, v. 135, n. 7, p. 1161-1163, 2008.

GANDERS, F. R.; BERBEE, M.; PIRSEYEDI, M. ITS base sequence phylogeny in *Bidens* (Asteraceae): Evidence for the continental relatives of hawaiian and marquesan *Bidens*. **Systematic Botany**, v. 25, n. 1, p. 122-133, 2000.

GASSENSCHMIDT, U. et al., Chemical properties of flocculant: active proteins from *Moringa oleifera* Lam. **Bio . Chem.** Hopper-Seyler 372,659. 1981.

GASSENSCHMIDT, U. et al., Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Volume 1243, Issue 3, Pages 477-481, 1995.

GAVILA, J., 35 High pathologic complete remission rate with liposome-encapsulated doxorubicin + paclitaxel + trastuzumab as primary treatment in HER-2 positive operable breast cancer: clinical experience , **European Journal of Cancer Supplements**, v. 8, n. 3, p. 68-69, 2010.

GHEBREMICHEAL, K. A. et al., A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed, **Water Research**, n.39, p2338–2344, 2005.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and Apoptosis. **Science**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.

GREGORIADIS, G.; RYMAN, B. E., Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases, **FEBS Letters**, v. 14, p. 95-98, 1971.

GUARATINI, M. T. G. et al., Sesquiterpene and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brazil, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 5, p. 479-486, 2005.

GUEVARA, A. P. et al., An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam., **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Volume 440, Issue 2, Pages 181-188, 1999.

GUEYRARD, D. et al., First synthesis of an O-glycosylated glucosinolate isolated from *Moringa oleifera*, **Tetrahedron Letters**, Volume 41, Issue 43, Pages 8307-8309, 2000.

GYSIN, B.; SCHWYZER, R., Liposome-mediated labeling of adrenocorticotropin fragments parallels their biological activity, **FESB Letters**, v. 158, n. 1, p. 12-16, 1983.

HARVEY, E. et al., Killing tumor cells: The effect of photodynamic therapy using mono-l-aspartyl chlorine and NS-398, **The American Journal of Surgery**, v. 189, n. 3, p. 302-305, 2005.

HOPPS, E. et al. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. Nutrition, **Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 72-77, 2010.

HUDSON, R., SAVOIE, H., BOYLE, R. W., Lipophilic cationic porphyrins as photodynamic sensitizers—Synthesis and structure–activity relationships, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 193-196, 2005.

IBBOTSON, S. H., An overview of topical photodynamic therapy in dermatology. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 1, p. 16-23, 2010.

IDOWU, M.; NYOKONG, t., Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 188, p. 200–206, 2007.

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

KASHEF, N.; ABADI, G. R. S.; DJAVID, G. E., Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 11-15, 2012.

KASHEF, N.; BORGHEI, Y. S.; DJAVID, G. E., Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, p. 150-155, 2013.

KAVARNOS, G. J.; TURRO, N. J. Photosensitization by reversible electron transfer: theories, experimental evidence, and examples. **Chemistry Reviews**, v. 86, p. 401-449, 1986.

KILLION, J. J.; FIDLER, I. J., Therapy of Cancer Metastasis by Tumoricidal Activation of Tissue Macrophages Using Liposome-Encapsulated Immunomodulators. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 78, n. 3, p. 141-154, 1998.

KUNDU, M.; THOMPSON, C. B., Autophagy: Basic Principles and Relevance to Disease, **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 427-455, 2008.

LABANA, S. et al., Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. **International Journal of Antimicrobiology Agents**, v. 20, p.301-304, 2002.

LAIA, C. A. T., COSTA, S. M. B., FERREIRA, L. F., Electron-transfer mechanism of the triplet state quenching of aluminium tetrasulfonated phthalocyanine by cytochrome c, **Biophysical Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 143-155, 2006.

LASIC, D.; NEEDHAM, D., "The `Stealth` Liposome: A Prototypical Biomaterial," **Chemical Reviews**, v. 95, p. 2601-2628, 1995.

LEHTINEN, J. et al., Analysis of cause of failure of new targeting peptide in PEGylated liposome: Molecular modeling as rational design tool for nanomedicine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 121-130, 2012.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

LI, W. T. et al., Pheophytin a and b mediated photodynamic therapy against sensitive and multidrug-resistant breast cancer cells, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 2, p. 130, 2011.

LIM, H. J., Indocyanine green-based photodynamic therapy with 785 nm light emitting diode for oral squamous cancer cells, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 4, p. 337-342, 2011.

LING, D. et al., Abeta42-Induced Neurodegeneration via an Age-Dependent Autophagic-Lysosomal Injury in Drosophila, **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p.4201-4209. 2005.

LONGO, J. P. F., **Avaliação da aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal sobre o Câncer Bucal em modelos experimentais in vivo e in vitro**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Patologia Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. 81p. 2008.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 4ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 1088p. 2008.

LOUGHREY, H. C. et al., Protein-liposome conjugates with defined size distributions. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1028, n. 1, p. 73-81, 1990.

LOWRY, O. H. et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265, 1951.

LUKSIENE, Z., Photodynamic therapy: mechanisms of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina**, v. 39, n. 12, p. 1137-1149, 2003.

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

MACHADO, A. H. A. et al., Cellular and molecular studies of the initial process of the photodynamic therapy in HEP-2 cells using LED light source and two different photosensitizers, **Cell Biology International**, v. 33, n. 7, p. 785-795, 2009.

MAMOT, C. et al., Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. **Drug Research Update**, v. 6, p. 271-279, 2003.

MATTSON, M. A.; CHAN, S. L., Calcium orchestrates apoptosis. **Nature Cell Biology**, v. 5, p. 1041-1043, 2003.

MAYNOR, M. L. et al, Brown recluse spider envenomation: a prospective trial of hyperbaric oxygen therapy, **Academic Emergency Medicine**, v. 4, n. 3, p. 184–192, 1997.

MAZUMDAR, T. et al. A mixed Th1/Th2 response elicited by a liposomal formulation of leishmania vaccine instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania donovani* in susceptible BALB/c mice. **Vaccine**, Kidlington, v. 22, p. 1162-1171, 2004.

MEHTA, K. et al., Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits, **Journal of Ethnopharmacology**, Volume 86, Issues 2-3, Pages 191-195, 2003.

MELO A. L. et al., Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 255, p.227–230, 2003.

MELO JR, M. A. et al., Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

MERCHAT, M. et al., Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 3, p. 153-157, 1996.

MINNOCK, A. et al., Photoinactivation of bacteria. Use of a cationic water-soluble zinc phthalocyanine to photoinactivate both Gram-negative and Gram-positive bacteria, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 3, p. 159-164, 1996.

MIYAMOTO, Y. et al., Comparison of phototoxicity mechanism between pulsed and continuous wave irradiation in photodynamic therapy, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 53, n. 1-3, p. 53-59, 1999.

MIZUSHIMA, N.; KLIONSY, D. J., Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism, **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p. 19–40, 2007.

MÜLLER, F. **Terapia fotodinâmica antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas: estudo comparativo entre fotosensibilizantes**. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006. Disponível em <<http://biblioteca.univap.br/dados/000001/000001B6.pdf>> Acesso em: 08/10/2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5a. Edição, São Paulo: Editora Artmed, 2010. 1273p.

NETO, A. D. A., ***Bidens sulphurea* (Sch. Bip.): efeitos fotodinâmico e antibiótico dos extratos etanólicos de suas flores**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 79p. 2011.

OCHSNER, M., Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.

OCSHNER, M. Light scattering of human skin: A comparison between zinc(II)—phthalocyanine and photofrin II®, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 32, n. 1-2, p. 3-9, 1996.

OKUDA, T. et al., ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF COAGULANT EXTRACTED FROM *MORINGA OLEIFERA* SEED BY SALT SOLUTION. **Wat. Res.** Vol.35, No.2, pp. 405-410, 2000.

OLIVEIRA, A. G., Lipossomas: Aplicações farmacêuticas e perspectivas futuras, **Caderno de Farmácia**, v. 9, n. 2, p. 71-76, 1993.

OLIVEIRA, C. A. et al, Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 133, n. 1, p. 69-78, 2005.

OLIVEIRA, G. A., **Restrição Calórica e Mitocôndrias: Papel no Envelhecimento de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). 127p. 2010.

PANKAU, J. Z. et al., The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: Recent advances, **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 232, n. 3, p. 487-497, 1998.

PARIMALAKRISHNAN, S. et al., Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant. **African Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 27-30, 2006.

PAULA, L. F. et al., A comparative study of irradiation systems for photoinactivation of microorganisms. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 21, n. 4, 2010.

PEIXOTO, J. R. O. et al., In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 201-204, 2011.

PEREIRA, M.D. **Possíveis sensores envolvidos na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo em *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2003.

POPOV S. G. et al, Lethal toxin of *Bacillus anthracis* causes apoptosis of macrophages". **Biochemistry and Biophysics Research Community**, v. 293, n. 1, p. 349–355, 2002.

RIAZ, M. Liposomes Preparation Methods. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 1, p. 65-77, 1996.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIOS, A. et al., Evaluation of Photodynamic Therapy Using a Light-emitting Diode Lamp against *Enterococcus faecalis* in Extracted Human Teeth, **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 6, p. 856-859, 2011.

SANTOS, A. F. S. et al., Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin, **Process Biochemistry**, Volume 44, Issue 4, Pages 504-508, 2009.

SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, N. B.; GOUVEIA, E. R., Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2010.

SANTOS, N. C., CASTANHO, M. A. R. B., Lipossomas: A bala mágica acertou?, **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1181-1185, 2002.

SAPRA, P.; ALLEN, T. M. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. **Progress on Lipid Research**, v. 42, p. 439-462, 2003.

SILVA, D. B. et al. Análise comparativa dos constituintes voláteis de *Bidens sulphurea* (Asteraceae) obtidos por hidrodestilação e SPME. **30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

SILVA, D. B. et al., Flavonóides antialérgicos de *Bidens sulphurea*(cav.) sch. bip.(Asteraceae). **31a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008.

SINGH, R. S. G.; NEGI, P. S.; RADHA, C., Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed ?our. **Journal of Functional Foods**, No prelo. 2013.

SOUKOS, N. S. et al., Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection, **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 10, p. 979-984, 2006.

SPESIA, M. B. et al. Mechanistic insight of the photodynamic inactivation of Escherichia coli by a tetracationic zinc(II) phthalocyanine. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 1, p. 52-61, 2009.

SPIKES, J.D., Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. **Photochemistry and Photobiology**, v. 43, n. 1, p. 691-699, 1996.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D. Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 1, p. 4151-4202, 1998.

STOCKERT, J. C.; HERKOVITS, J., Photodynamic toxicity and its prevention by antioxidativa agents in Bufo arenarum embryos. **Toxicology**, v. 192, p. 211-218, 2003.

STROMHAUG, P.E.; KLIONSKY, D. J., Approaching the Molecular Mechanism of Autophagy., **Traffic**, v. 2, n. 8, p. 524-531, 2001.

TARDIVO, J. P. et al., Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175-191, 2005.

THONG, P. S. P. et al., Hypericin-photodynamic therapy (PDT) using an alternative treatment regime suitable for multi-fraction PDT, **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, n. 1, p. 1-8, 2006.

TODOROV, T. et al., Double aldehyde stabilisation of erythrocytes in the indirect hemagglutination for echinococcosis. *Parasitology International*, v. 52, p. 203-207, 2003.

TSENG, W. C.; HUANG, L., Liposome-based gene therapy, **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 206-213, 1998.

TYRRELL, J., CAMPBELL, S., CURNOW, A. Protoporphyrin IX photobleaching during the light irradiation phase of standard dermatological methyl-aminolevulinate photodynamic therapy, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 4, p. 232-238, 2010.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERMA, A. R. et al., In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves, **Food and Chemical Toxicology**, Volume 47, Issue 9, Pages 2196-2201, 2009.

WAINWRIGHT, M. et al., A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series, **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 75-80, 1997.

WANG, C.; YOULE, R. J. The Role of Mitochondria in Apoptosis. **Annual Reviews of Genetics**, v. 43, p. 95-118, 2009.

WANG, X., A phase I clinical and pharmacokinetic study of paclitaxel liposome infused in non-small cell lung cancer patients with malignant pleural effusions. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 8, p. 1474-1480, 2010.

WEISHAUP, K. R.; GOMER, C. J.; DOUGHERTY, T. J. Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photo-inactivation of a Murine Tumor. **Cancer Research**. v. 36, n. 1, p. 2326-2329, 1976.

WONG, J. P. et al., Liposome delivery of ciprofloxacin against intracellular *Francisella tularensis* infection. **Journal of Controlled Release**. v, 92. n. 3, p. 265-273, 2003.

YAN, W. et al., Reactive oxygen species play a central role in the activity of cationic liposome based cancer vaccine. **Journal of Controlled Release**, v. 130, n. 1, p. 22-28, 2008.

YANG, F. et al. Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: From bench to bedside. **Cancer Treatment Reviews**. v. 37, n. 1, p. 633-642, 2011.

YANG, H. L. et al., Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes, **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 9, p. 1513-1521, 2006.

YUAN, K. H. et al., Comparison of photodynamic therapy and pulsed dye laser in patients with port wine stain birthmarks: A retrospective analysis, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 5, n. 1, p. 50-57, 2008.

ZHANG, J. et al., Synthesis and photobiological study of a novel chlorin photosensitizer BCPD-18MA for photodynamic therapy, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 18, p. 5520-5528, 2011.