



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS DE IRRADIAÇÃO  
UTILIZANDO LED E SUA APLICAÇÃO À FOTOINATIVAÇÃO DE**  
*Staphylococcus aureus E Trichophyton rubrum*

**LUCAS FERREIRA DE PAULA**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS DE IRRADIAÇÃO  
UTILIZANDO LED E SUA APLICAÇÃO À FOTOINATIVAÇÃO DE  
*Staphylococcus aureus* E *Trichophyton rubrum***

**LUCAS FERREIRA DE PAULA\***

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.

***\*Bolsista pelo CNPq***

***Orientação: Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira***

Uberlândia – MG

2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

**P324 d Paula, Lucas Ferreira de, 1985-**

**Desenvolvimento de dispositivos de irradiação utilizando LED e sua aplicação à fotoinativação de *Staphylococcus aureus* E *Trichophyton rubrum* / Lucas Ferreira de Paula. - 2010.**

**126 f.**

**Orientador: Carlos Alberto de Oliveira.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Fotoquímica - Teses. 3. Fotoquimioterapia - Teses. I. Oliveira, Carlos Alberto de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.**

**CDU: 544.52**

---

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



**ALUNO(A): LUCAS FERREIRA DE PAULA**

**NÚMERO DE MATRÍCULA: 97147**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA**

**PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:**

***“Desenvolvimento de dispositivos de irradiação de LED  
e sua aplicação à fotoinativação de  
staphylococcus aureus e trichophyton rubrum”***

**ORIENTADOR(A):**

**PROF. DR. CARLOS ALBERTO DE OLIVEIRA**

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco 1E, no Campus Santa Mônica, no dia 20 de janeiro de 2010, às 16:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

**NOME:**

**ASSINATURA:**

Prof. Dr. Carlos Alberto de Oliveira

Carlos Alberto de Oliveira

(IQUFU)

Prof. Dr. Noboru Hioka

Noboru Hioka

(UEM)

Prof. Dr. Domingos Sávio de Miranda

Domingos Sávio de Miranda

(IQUFU)

Uberlândia, 20 de janeiro de 2010.

**Dedico**

*A Deus, a inteligência suprema, causa primeira de  
todas as coisas.*

*Às pessoas mais importantes da minha vida: Minha  
adorável, querida e atenciosa mãe Gislaine Ferreira  
de Paula, minha cuidadosa avó Delfina Maria de  
Jesus, pelo amor, carinho, atenção, ao meu pai e  
companheiro de sempre Apolinário Rodrigues de  
Queiroz, à minha querida namorada Renata Oliveira  
Santos. Agradeço também ao cuidado que todos vocês  
tanto tem por mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe por todo o apoio e ajuda na minha casa, nesses períodos em que não pude colaborar e nem se quer ajudar em quase nada nas tarefas de casa.

Ao Dr. Hansen e toda sua equipe por me ajudarem hoje e sempre.

Ao meu orientador Carlos Alberto de Oliveira, que nunca se opôs nem pressionou a minha pessoa, sempre me incentivando e nos agradando, tornando o período de mestrado um momento de tranqüilidade, condição primordial para o desenvolvimento de um trabalho de qualidade. Sinto que ainda devo muito ao senhor.

Aos meus colegas de trabalho do dia-a-dia: Erick, Henrique, João Fernando, Marselha, Vítor, Bruno, Roberto, Alexandre, Flávia, Diógenes, Jonas. Muito obrigado por vocês terem tido paciência comigo e me ajudarem em tantas coisas.

Agradeço em especial ao meu amigo Henrique Dantas que me ensinou, ajudou e fez companhia diversas vezes no laboratório sobre todos os meus trabalhos desenvolvidos, inclusive neste. Agradeço ao conhecimento de microbiologia, e aos diversos métodos que você me passou durante todo esse tempo. Agradeço também pela sua companhia e força nos momentos de dificuldade.

Agradeço aos professores Domingos Sávio de Miranda e Luis Antonio Ortellado Gómez Zellada por me ajudarem a todo momento não somente em questões acadêmicas mas foram, juntamente com meu orientador, amigos de sempre.

Agradeço ao professor João Batista Vieira Junior por ter confiado em mim e dedicado seu aluno Jonas Reginaldo de Britto para me ajudar, sou muito grato pelo auxílio e presteza da parte de vocês.

Não posso me esquecer dos meus fiéis amigos Mauricio, Leon, Catarina, João Paulo, Lucian, Daniel Caixeta, Diego, Fred, Marcelo Hayashi, Marcelo Barbosa, Sara, Wanderson, Weyder.

Agradeço a Renatinha, por estar sempre comigo, me ajudando nos momentos de dificuldade, fazendo-me companhia e participando das minhas alegrias.

*Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz.*

*Onde houver ódio, que eu leve o amor,*

*Onde houver ofensa, que eu leve o perdão,*

*Onde houver discórdia, que eu leve a união,*

*Onde houver dúvida, que eu leve a fé,*

*Onde houver erro, que eu leve a verdade,*

*Onde houver desespero, que eu leve a esperança,*

*Onde houver tristeza, que eu leve a alegria,*

*Onde houver trevas, que eu leve a luz.*

*Ó Mestre, fazei que eu procure mais*

*consolar que ser consolado;*

*compreender que ser compreendido,*

*amar, que ser amado.*

*Pois é dando que se recebe*

*é perdoando que se é perdoado*

*e é morrendo que se nasce para a vida eterna...*

***(Oração de São Francisco de Assis)***



## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
1.1 Terapia Fotodinâmica .....	9
1.2 Histórico da TFD.....	10
1.3 Fotossensibilizadores.....	12
1.3.1 Porfirinas e Hematoporfirinas – Primeira geração de fotossensibilizadores	12
1.3.2 Ácido 1,5-aminolevulínico (ALA).....	14
1.3.3 Ftalocianinas .....	17
1.3.4 Corantes Catiônicos.....	17
1.4 Mecanismos fotodinâmicos .....	18
1.4.1 Mecanismo Tipo I.....	19
1.4.2 Mecanismo Tipo II.....	20
1.5 Fontes de irradiação .....	21
1.5.1 LED na Terapia Fotodinâmica.....	24
1.6 Staphylococcus Aureus.....	26
1.7 Onicomicose.....	28
<b>2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS .....</b>	<b>32</b>

<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>35</b>
3.1 Materiais e reagentes.....	36
3.2 METODOLOGIAS .....	38
3.2.1 – Construção do Equipamento de lâmpada halógena (PHLS).....	38
3.2.2 – Construção do Equipamento de LED de alto brilho (LED600).....	39
3.2.3 – Construção do Equipamento de LED de alta potência (AMS-II)	
3.2.4 – Preparo das soluções de azul de metileno .....	40
3.2.5 Ensaio de fotooxidação de DPBF .....	41
3.2.6 Ensaio microbiológicos de fotoinativação bacteriana .....	41
3.2.7 Ensaio microbiológicos de fotoinativação fúngica .....	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
4.1 Desenvolvimento dos Equipamentos.....	45
4.2 Espectros de emissão dos equipamentos.....	52
4.3 Confirmação da presença de oxigênio singlete .....	52
4.4 Comparação da cinética de Fotooxidação de DPBF .....	58
4.5 Inativação fotodinâmica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	61
4.6 Ensaio microbiológicos de <i>Trichophyton rubrum</i> .....	63
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>7. TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>82</b>
<b>8. APÊNDICE .....</b>	<b>84</b>
Protocolo para submissão ao comitê de Ética para pesquisa em seres humanos.	
.....	85

<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>109</b>
<b>Artigo Aceito para publicação – Proof do artigo enviado ao Journal of the     Brazilian Chemical Society já aceito para publicação. ....</b>	<b>110</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura da porfina, o representante mais simples da classe das porfirinas (AULER;BANZER, 1942). .....	12
<b>Figura 2:</b> Hematoporfirina na forma de éter presente na mistura de oligômeros que compõem a Photofrin <sup>®</sup> (SIMPLICIO <i>et al.</i> , 2002) .....	13
<b>Figura 3:</b> Biosíntese de Heme – O ALA é precursor e também modulador do processo (RUTHERFORD <i>et al.</i> , 1979).....	15
<b>Figura 4:</b> Rota sintética para obtenção do ALA e o derivado terc-butil éster, a partir de anidrido succínico (KANG <i>et al.</i> , 2005). .....	16
<b>Figura 5:</b> Corantes catiônicos empregados como fotossensibilizadores .....	18
<b>Figura 6:</b> Equipamento RL-50. O filtro de transmissão é normalmente encontrado como material de fotografia (TARDIVO <i>et al.</i> , 2002).....	22
<b>Figura 7:</b> Equipamento Visulas 690 <sup>®</sup> (CARL ZEISS, 2009) .....	23
<b>Figura 8:</b> LASER DIOMED 630 PDT para Terapia Fotodinâmica. O equipamento possui dispositivo de fibra óptica, tornando versátil a aplicação endógena (DIOMED, 2000).....	24
<b>Figura 9:</b> (A) Aspecto aveludado do crescimento de <i>T. rubrum</i> com 14 dias de crescimento, cultivado em Agar Sabouraud. (B) Microfotografia do perfil de conídios de <i>T. rubrum</i> evidenciando a maior presença de microconídeos em detrimento dos macroconídeos. ....	30

<b>Figura 10:</b> (A) e (C) representam o acometimento do leito ungueal em um estado moderado. (B) representa o acometimento no leito ungueal das mãos, num estado inicial. O agravamento pode manter-se estagnado durante longos períodos de tempo (PHIL, 2009).	<b>30</b>
<b>Figura 11:</b> Esquema demonstrando montagem de PHLS; 1 – Carcaça metálica acoplada com a lâmpada e o cooler; 2 – Lente de aumento; 3 – Cuba de refrigeração; 4 – Filtro óptico.	<b>38</b>
<b>Figura 12:</b> Equipamento LED600; 1 – Arranjo de LED de alto brilho; 2 – Suporte móvel transparente para acoplar as amostras; 3 – Níveis de altura para segurar o suporte.	<b>39</b>
<b>Figura 13:</b> Possível estrutura proposta para o equipamento AMS-II, 1 – Arranjo de LED de alta potência; 2 – Dissipador de calor de processadores soquete 775; 3 – Suporte com ranhuras para a inserção de amostras.	<b>40</b>
<b>Figura 14:</b> Esquema do arranjo de ligação dos LED em série-paralelo	<b>46</b>
<b>Figura 15:</b> Lâmpada de LED desenvolvida com arranjo série-paralelo que não apresenta limitador de corrente no circuito.	<b>46</b>
<b>Figura 16:</b> Fotos do equipamento LED600. A – Desligado. B – Ligado.	<b>47</b>
<b>Figura 17:</b> Comportamento entre a voltagem e corrente na ligação de um LED	<b>48</b>
<b>Figura 18:</b> Fotos de AMS-II. A e C – Equipamento em funcionamento. B – Vista frontal do equipamento.	<b>50</b>
<b>Figura 19:</b> Esquema de ligação do conversor desenvolvido para ligar o LED de alta potência (INTERNATIONAL RECTIFIER, 2007).	<b>51</b>
<b>Figura 20:</b> Espectro de absorção para o azul de metileno (—); Espectro de emissão de PHLS (—), LED600 (.....), e AMS-II (----). Erro! Indicador não definido.	

**Figura 21:** Degradação de DPBF (A), via reação com oxigênio singlete, formando o produto incolor 1,2 dibenzoilbenzeno (C). ..... Erro! Indicador não definido.

**Figura 22:** Oxidação fotoinduzida de DPBF pelo LED600 com uso de azul de metileno na concentração  $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . (A) - Ausência de  $\text{NaN}_3$ ; (B) - Presença de excesso (saturação) de  $\text{NaN}_3$ . Cada espectro foi obtido após 5 segundos de irradiação. ....57

**Figura 23:** Oxidação Fotoinduzida de DBPF. Cada espectro foi obtido após 5 segundos de irradiação. (A) – PHLS; (B) – LED600; (C) – AMS-II. A concentração de azul de metileno utilizada foi aproximadamente  $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . ....59

**Figura 24:** Variação da concentração de DPBF com o tempo. ▲ - PHLS; ● - LED600; ■ - AMS-II. ....60

**Figura 25:** Contagem de bactérias após a fotoinativação. Três tipos de diferentes concentrações de azul de metileno foram avaliadas: 0,5, 5 e  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ . Soluções com as mesmas concentrações e não irradiadas foram utilizadas como controle. ....62

**Figura 26:** Crescimento de *T. rubrum*, em triplicata, após 14 dias. As placas (A), (B) e (C), foram irradiadas durante 20 minutos, sob concentração de azul de metileno  $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ; (D), (E) e (F) correspondem ao controle no escuro; (G) é o controle que não recebeu luz nem fotossensibilizador. ....64

**Figura 27:** Estrutura da hifa septada de *Trichophyton rubrum* obtida por microfotografia óptica .....65

**Figura 28:** Microfotografia óptica com ênfase nos esporos do *Trichophyton rubrum* após a coloração com azul de metileno, forte pigmentação é observada. A presença de estruturas reprodutivas não coradas serve como comparação e sobretudo como contraste, evidenciando a grande absorção/interação de corante por essas estruturas. ....65



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A** – Ampère
- ACN** – Acetonitrila
- ALA** – Acido aminolevulínico
- AM** – Azul de metileno
- AMS-II** – Nome dado ao dispositivo de LED de alta potência
- ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- COUT** – Capacitor de saída
- DC** – Corrente contínua
- ddp** – Diferença de potencial
- DEN1** – Diodo de entrada
- DPBF** – 1,4 Difenilisobenzofurano
- FDA** – Food and Drug Administration
- LED** – Light Emitting Diode (Diodo emissor de luz)
- LED600** – Dispositivo dotado de uma matriz de 600 LED
- mcd** – Milicandela
- MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- PHLS** – Sistema de lâmpada halógena policromática
- R** – Integral de sobreposição
- ROS** – Espécies reativas de oxigênio
- ROUT** – Resistor de saída
- ScoA** – Succinil Coenzima A
- ScoAH** – Succinil Coenzima A protonada (reduzida)
- TFD** – Terapia Fotodinâmica
- UFC** – Unidades formadoras de colônias

## RESUMO

Estudou-se o desenvolvimento e a eficiência de fontes de irradiação baseada em LED na fotosensibilização do azul de metileno. Os equipamentos construídos utilizaram LED convencional e LED de alta potência. Verificou-se que o sistema que utiliza LED de alta potência exibe melhores resultados em função de sua maior irradiância. Na Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus*, *in vitro*, o LED de alta potência permitiu inativação de cerca de 99% dos microorganismos em soluções de azul de metileno de concentrações superiores a  $10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>.

O fungo *Trichophyton rubrum*, o agente etiológico mais comum no casos das Onicomicoses, foi também submetido ao protocolo de fotoinativação, desenvolvido *in vitro*. Foi observada uma redução drástica na formação de colônias, mesmo com apenas uma aplicação do equipamento com LED de alta potência.

Descreveu-se também, de forma detalhada, diretrizes para a construção de sistemas de LED, voltados a terapia fotodinâmica. O sistema que utiliza LED convencional, também em todos os testes exibiu resultados satisfatórios.

Propõe-se um protocolo para o comitê de ética, visando a aplicação, *in vivo*, para o tratamento de onicomicose no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando os equipamentos desenvolvidos, haja vista os resultados satisfatórios e seu baixo custo favorecendo a aplicação em unidades de saúde pública.

**Palavras-chave:** Construção de dispositivos, Onicomicose, LED, Fotoinativação, *Trichophyton rubrum*, *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

The construction and efficiency of irradiation sources based on LED applied to methylene blue photosensitization was studied. Conventional LED and high power LED was used to building the equipments. It was found that the system that uses high power LED shows better results due to its higher irradiance. In the *Staphylococcus aureus* photoinactivation, *in vitro*, the high power LED allowed inactivation of about 99% of the microorganisms in methylene blue solutions of concentrations above  $10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>.

The fungus *Trichophyton rubrum*, the most common etiologic agent in cases of Onychomycosis also was submit to the photoinactivation protocol, developed *in vitro*. There was a drastic reduction in the colony forming units, even with only one application of the high power LED.

Is also described in detail, guidelines for the construction of LED systems, applied to photodynamic therapy. The system that uses conventional LED, also in all tests, showed satisfactory results.

We propose a protocol to the Ethics Committee, aimed at implementing *in vivo* for the treatment of onychomycosis in the Hospital de Clínicas of Universidade Federal de Uberlândia – the school hospital of this university - using the developed equipments, given satisfactory results and low cost by encouraging the application in public health facilities.

Keywords: Construction of devices, Onychomycosis, LED, Photoinactivation, *Trichophyton rubrum*, *Staphylococcus aureus*.

## **I. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Terapia Fotodinâmica**

Terapia fotodinâmica (TFD) é nome de uma modalidade clínica pouco invasiva aplicada ao combate de diversas doenças cujo crescimento anormal de tecidos mostra-se preponderante. Das moléstias que exibem essa característica destacam-se o câncer, degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, restenose, micoses fungóides, verrugas, arteriosclerose, AIDS, infestações de microorganismos, etc. (SIMPLICIO *et al.*, 2002).

A TFD baseia-se em uma combinação entre luz de um comprimento de onda específico, um composto atóxico, também chamado de fotossensibilizador e oxigênio molecular (MACHADO, 2000). Esses fotossensibilizadores, mediante a presença de luz, possibilitam a oxidação de diversos substratos orgânicos, inclusive componentes de vírus e outros microorganismos (SHIKOWITZ, 1998).

Frente à métodos cirúrgicos a terapia fotodinâmica mostra-se superior em diversos aspectos, tais como: menos invasiva; direcionamento muito preciso, permite aplicações repetitivas, ao contrário de radioterapias; a formação de cicatrizes são muito mais raras ou inexistentes, após o tratamento (BROWN *et al.*, 2004).

Assim como qualquer modalidade clínica, existem limitações para a TFD. A terapêutica é restrita a regiões onde ocorra a exposição de luz. Sondas luminosas específicas para aplicações endógenas são possíveis alternativas que tentam suprir estas desvantagens (MOAN; PENG, 2003). Portadores de porfirias ou que apresentam alguma sensibilidade aos fotossensibilizadores não são candidatos seguros para a aplicação da TFD. (MOAN; PENG, 2003).

Thierry Patrice, em seu livro chamado Terapia Fotodinâmica, afirma que não tem dúvidas que a terapia fotodinâmica será a maior tecnologia médica do futuro (PATRICE, 2003).

## **1.2 Histórico da Terapia Fotodinâmica**

As primeiras observações sobre a cura de determinadas moléstias por meio de luz solar datam mais de 3000 anos atrás, sendo conhecidas dos povos egípcios, chineses e indianos. Normalmente esse tratamento se realizava pela aplicação dérmica de determinadas plantas (SPIKES, 1985).

No meio científico, os relatos da terapia fotodinâmica são inicialmente mencionados por Oscar Raab, em 1900, que observou a mortandade do protozoário *Paramecium sp.* em solução de acridina, em contato com a luz solar. Raab observou que no primeiro experimento o tempo de vida do protozoário era de 1,5 horas, enquanto no segundo experimento, nas mesmas condições experimentais, o tempo de vida foi próximo de 15 horas. Entretanto, o segundo experimento havia sido realizado durante uma tempestade. Desta forma, ele começou a relatar que a dose de sol (luz incidente) é a responsável pelo efeito observado (RAAB, 1900).

O termo “fotodinâmico” foi introduzido no meio científico em 1904 por Hermann von Tappeiner, professor de Raab e diretor do instituto farmacológico da Universidade Ludwig-Maximilians, em Munique. Não se sabe exatamente porque o processo é chamado dinâmico, talvez para não ficar ambíguo aos processos fotográficos que surgiram na mesma época, tentou-se substituir o termo Terapia Fotodinâmica por Fotoquimioterapia, sem grandes sucessos (MOAN; PENG, 2003).

Atualmente sabe-se que a excitação eletrônica do fotossensibilizador na presença de oxigênio propicia a geração de um grande número de espécies reativas de oxigênio (ROS), como por exemplo, o oxigênio singlete (DOUGHERTY, 1998), num processo chamado de fotosensibilização.

As porfirinas foram as primeiras drogas utilizadas com a finalidade de se promover fotosensibilizações. Em 1911 Hausman já relata a aplicação de hematoporfirinas para a fotosensibilização em camundongos (HAUSMAN, 1911). Meyer-Betz (1913) testou a aplicação de uma hematoporfirina em sua própria pele. As porfirinas normalmente apresentam um prolongado tempo de vida no organismo humano, principalmente em função da dificuldade de serem metabolizadas pelo corpo. Como consequência, o tempo de

fotosensibilidade adquirida na superfície corpórea pelo uso de porfirinas é bastante alto. Meyer-Betz ainda relata que ficou fotossensível durante cerca de dois meses.

Policard (1924) demonstrou que as porfirinas além de se concentrarem em células tumorais, apresentam fluorescência. A fluorescência apresentada por estas substâncias é atualmente empregada para a detecção prévia de determinados tumores (BORISOVA *et al.*, 2008). Em 1925 Hans Fischer ganha o prêmio nobel por reportar que a uroporfirina apresenta fototoxicidade muito próxima da hematoporfirina, apresentando como diferencial uma boa solubilidade em sistemas aquosos (FISCHER, 1925).

Em 1942, relata-se que quando as hematoporfirinas injetadas em cobaias são mais acumuladas em tumores metastáticos do que nos nódulos linfáticos. Essas cobaias mostraram-se após a irradiação resultados promissores na regressão dos tumores (AULER; BANZER, 1942). Sabe-se que os fotossensibilizadores podem se associar as lipoproteínas no plasma e serem transportados às células tumorais com muita facilidade, uma vez que estas possuem um número exageradamente maior de receptores de lipoproteínas de baixa densidade, conforme visto por sua demanda por colesterol (MACHADO, 2000). A partir de 1960 as hematoporfirinas começaram a ser largamente aplicadas nas finalidades terapêuticas e diagnósticas (LIPSON *et al.*, 1961).

As aplicações conhecidas da TFD em clínica começaram em 1970, utilizando hematoporfirinas como fotossensibilizador, com os trabalhos pioneiros de Dougherty e colaboradores, os quais conseguiram uma maior purificação dos derivados hematoporfirínicos (DOUGHERTY *et al.*, 1978). Posteriormente, além das porfirinas, vários outros fotossensibilizadores foram testados, na tentativa de tornar a terapêutica mais eficiente.

## 1.3 Fotossensibilizadores

### 1.3.1 Porfirinas e Hematoporfirinas – Primeira geração de fotossensibilizadores

As porfirinas, em termos estruturais, são macrociclos caracterizados pela presença de quatro subunidades de anéis pirrólicos interconectados a seus carbonos alfa por meio de ligações metínicas (YAO *et al.*, 2009). Elas são aromáticas e possuem um sistema de inúmeros pares conjugados e como conseqüência, são bastante coloridas. O nome porfirina vem do grego *porphurã* e significa púrpura. Alguns desses macrociclos podem ter origem natural, como as hematoporfirinas, responsáveis pela pigmentação vermelha do sangue. A porfina é o composto mais simples dessa classe, seus análogos substituídos são chamados genericamente de porfirinas. A figura 1 exibe a estrutura de uma porfina.

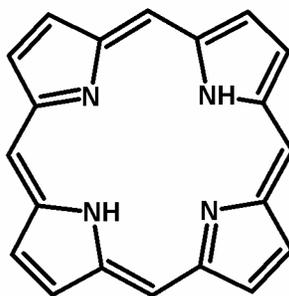


Figura 1: Estrutura da porfina, o representante mais simples da classe das porfirinas (AULER;BANZER, 1942).

Essas estruturas porfirínicas têm como característica uma Banda Soret, trata-se de uma banda de absorção do espectro eletromagnético bastante forte na região do azul (400 – 420nm). Geralmente, apresentam também quatro bandas de absorção na faixa de 500-600 nm, denominadas de bandas Q.

Historicamente as hematoporfirinas, foram as primeiras espécies fotossensibilizadoras a serem largamente empregadas na terapia fotodinâmica. A literatura aponta que misturas hematoporfirínicas foram amplamente utilizadas como fotossensibilizadores principalmente

nos trabalhos executados a partir de 1911 e até meados da década de 70. Inicialmente essas misturas eram obtidas a partir de sangue dessecado e posterior tratamento com ácido sulfúrico para a remoção do ferro (SCHERER, 1841).

Esses compostos, no entanto, apresentam efeitos colaterais, tais como um alto tempo de fotosensibilidade da pele. Essa dificuldade metabólica do organismo não é devida à hematoporfirina, e sim às várias outras substâncias oligoméricas presentes na mistura de hematoporfirina, decorrentes, principalmente, do método de preparação (SIMPLICIO *et al.*, 2002; STERNBERG *et al.*, 1998).

A Photofrin<sup>®</sup>, por exemplo, é uma mistura mais purificada dos derivados de hematoporfirina. Por medidas espectroscópicas, farmacocinéticas e propriedades farmacológicas, observa-se que a Photofrin<sup>®</sup> é constituída principalmente de monômeros (protoporfirina IX, derivados da hematoporfirina, dois isômeros de hidroxietilvinildeuteroporfirina), dímeros de hematoporfirinas com um éter, um éster ou uma ligação carbono-carbono, e alguns oligômeros bastante extensos. A Figura 2 mostra uma dessas estruturas mencionadas.

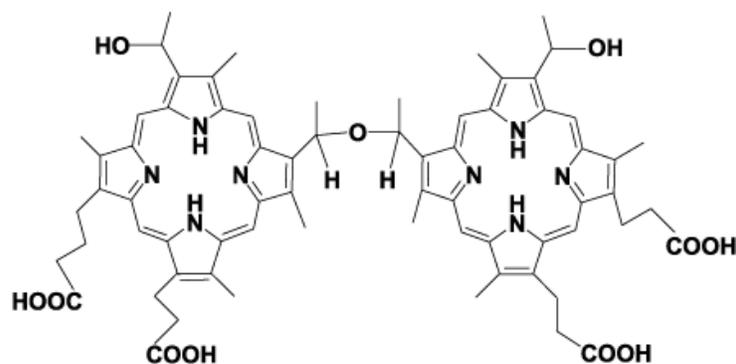


Figura 2: Hematoporfirina na forma de éter presente na mistura de oligômeros que compõem a Photofrin<sup>®</sup> (SIMPLICIO *et al.*, 2002)

Esses fotossensibilizadores, chamados de primeira geração, apresentavam, além disto, outros aspectos negativos, tais como baixa seletividade pelo tumor e baixa absorção na região entre 600-750 nm (onde a luz penetra melhor o tecido humano) (PROFIO; DOIRON, 1981). É claro que uma mistura mais purificada como é o caso da Photofrin<sup>®</sup>

permite a atenuação de algumas destas desvantagens. A busca por substâncias com características mais apreciáveis e maior eficiência, culminou na segunda geração de fotossensibilizadores (MOAN; PENG, 2003), apresentados a seguir nos itens 1.3.2; 1.3.3 e 1.3.4.

### **1.3.2 Ácido 1,5-aminolevulínico (ALA)**

O ALA é uma pré-droga, que enzimaticamente se transforma no seu respectivo fotossensibilizador: a protoporfirina IX. O processo ocorre no organismo via síntese de heme no organismo na qual o ALA é um biomodulador do processo (Figura 3).

A unidade heme é um grupo prostético constituinte da hemoglobina, mioglobina e dos citocromos. A biosíntese da unidade de heme é descrita na Figura 3. O controle no organismo para a formação de heme está em função da concentração de ALA, e por isto ele é um biomodulador do processo. Se a concentração é alta a própria heme atua como inibidor de transcrição da enzima  $\delta$ -Aminolevulinato Sintase suprimindo a formação de ALA. O ultimo estágio da síntese de heme é a ferroquelação enzimática da protoporfirina IX em heme. Sabe-se que a adição externa de ALA induz a formação preferencial de protoporfina IX em detrimento do heme, uma vez que existe uma limitada habilidade da enzima ferroquelatase em formar o complexo heme (RUTHERFORD *et al.*, 1979).

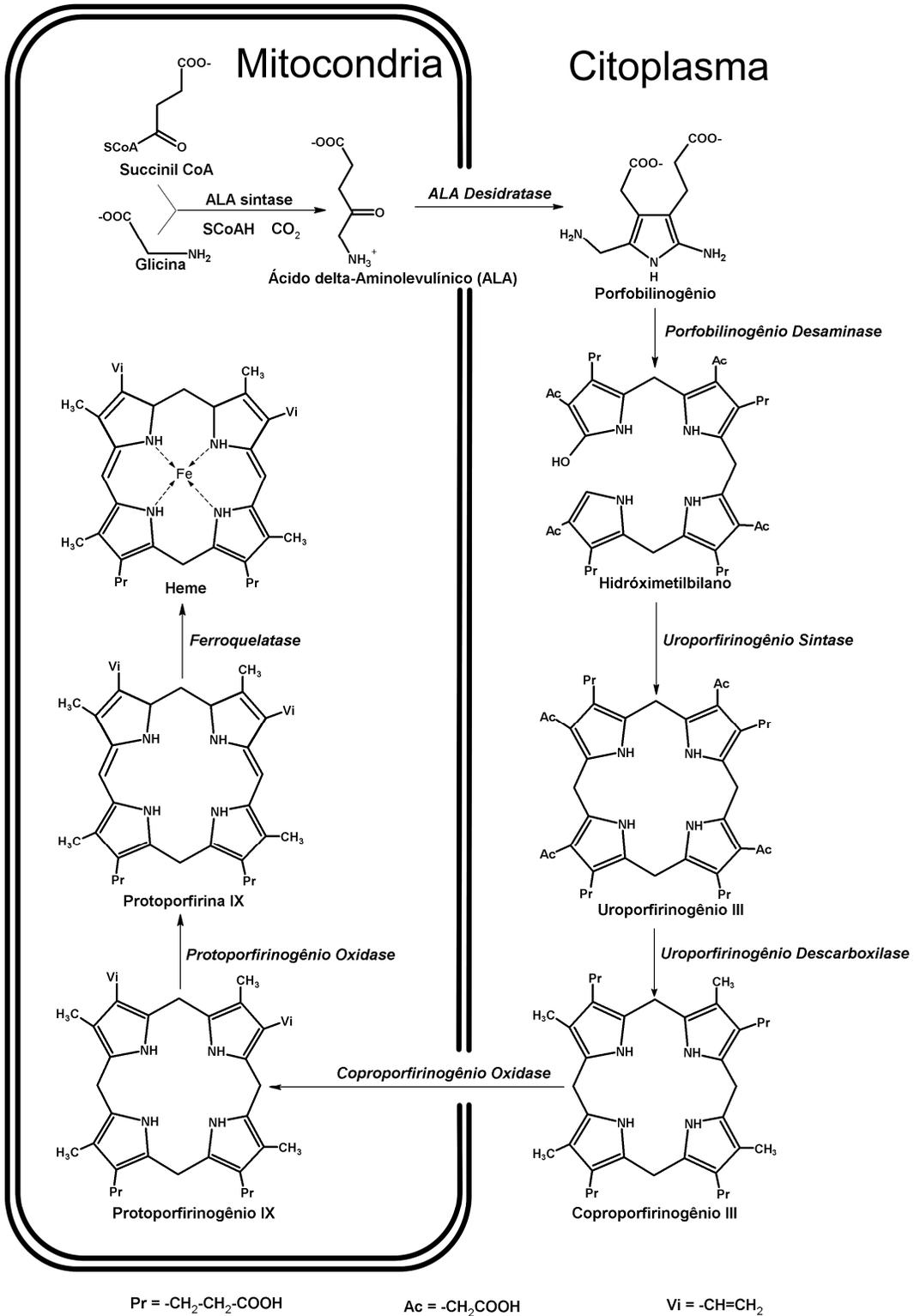


Figura 3: Biosíntese de Heme – O ALA é precursor e também modulador do processo (RUTHERFORD *et al.*, 1979).

O ALA pode ser sintetizado em laboratório, dentre outros métodos, pela rota sintética proposta por Kang e colaboradores (Figura 4), em condições anidras. Na presença de água, podem ocorrer reações secundárias de hidrólises e substituições que reduzem significativamente o rendimento do ALA (KANG *et al.*, 2005).

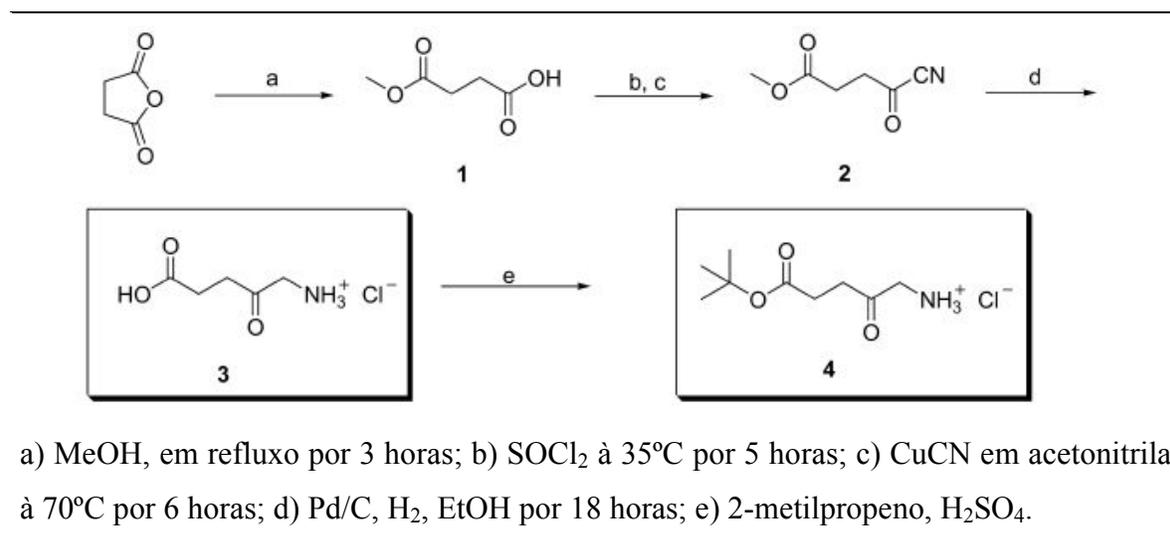


Figura 4: Rota sintética para obtenção do ALA e o derivado terc-butil éster, a partir de anidrido succínico (KANG *et al.*, 2005).

O ALA aplicado em terapia fotodinâmica já liberado pelo FDA e pela ANVISA no Brasil, possui parecer favorável desde o ano de 2002. O registro foi concedido pela ANVISA através da resolução RE nº 376, processo nº 25351.015079/01-97. Atualmente o produto é comercializado pelos Laboratórios Stiefel.

O uso de ALA não se restringe apenas à fotossensitização. Diversos trabalhos apontam resultados interessantes de sua aplicação como marcador para detecção prévia de tumores (BAKOS *et al.*, 2003).

### 1.3.3 Ftalocianinas

Relatos de Ben-Hur e colaboradores já descrevem as ftalocianinas como agentes fotosensibilizantes (BEN-HUR; ROSENTHAL, 1985). As ftalocianinas são porfirinas sintéticas do grupo das azaporfirinas; nelas os grupos pirrólicos são condensados com um grupo benzênico e uma ligação de nitrogênio substitui a ligação metálica. (SPIKES, 1986) Essas alterações estruturais resultam em um alto coeficiente de absorção molar (cerca de  $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), principalmente na faixa de 675-700 nm. Por essas razões as ftalocianinas tendem a ser potentes fotossensibilizadores.

Esses compostos podem formar complexos estáveis com metais diamagnéticos como  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  e  $\text{Ga}^3$ , que além conferirem maior rendimento na síntese, aumentam o tempo de vida do estado triplete comparado com as ftalocianinas paramagnéticas. As propriedades fotofísicas variam de acordo com a presença e natureza do íon metálico no centro.

Quando não substituídas, as ftalocianinas são insolúveis em água, entretanto existem diversas modificações, tanto em relação ao metal, quanto ao macrociclo, que permitem aumentar a hidrofiliabilidade visando aplicações clínicas mais diretas. Os métodos atualmente utilizados são sulfonações, tetra e octa substituições, cordenações axiais com outros metais, acoplamentos à polímeros, na formulação de cremes, inclusão em lipossomas, nanopartículas, nanomicelas, ligação à albumina de soro bovino, ligação à colesteróis de estruturas de baixa densidade, etc (MOAN; PENG, 2003).

### 1.3.4 Corantes catiônicos

Corantes catiônicos fenotiazínicos, fenonaxínicos, como o azul de metileno (Figura 5B) e o alaranjado de acridina (Figura 5D) são reportados como agentes fotosensibilizantes. Sabe-se também que a acridina (Figura 5A) e corantes tiazínicos foram os primeiros agentes utilizados na TFD antiviral.

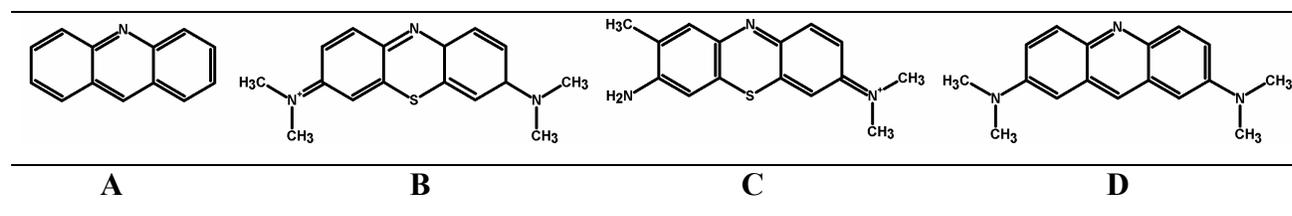


Figura 5: Corantes fenotiazínicos e fenonaxínicos empregados como fotossensibilizadores.

O azul de metileno (AM), por sua característica catiônica, apesar de corar eficientemente as células, normalmente apresenta baixa capacidade de permeação no tecido epitelial. Deste modo, as aplicações do AM em terapia fotodinâmica é mais comum na área dermatológica. A literatura aponta diversos trabalhos que evidenciam resultados bastante satisfatórios nas aplicações tópicas da terapia fotodinâmica com azul de metileno (TARDIVO *et al.*, 2007b; PERUSSI, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2006).

Combinações entre azul de metileno e azul de toluidina (Figura 5C) também são usadas com o objetivo de aumentar o desempenho do tratamento, uma vez que se promove uma coloração do exterior da derme (azul de metileno) e interior do tecido (pelo azul de toluidina) (TARDIVO *et al.*, 2007a). Desta forma, o azul de toluidina atua complementando a ação do azul de metileno conferindo um tingimento geral e mais eficiente dos tecidos.

## 1.4 Mecanismos fotodinâmicos

A ação fotodinâmica fundamenta-se nas reações de fotossensitização em presença de oxigênio molecular. 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 fotossensibilizador em seu estado tripleto:

### 1.4.1 Mecanismo Tipo I

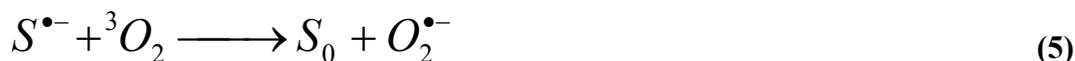
O mecanismo do tipo I tem como característica a geração de um radical ou reação redox na qual o fotossensibilizador, excitado ao estado triplete ( $^3S$ ), reage com uma molécula vizinha (A) por transferência de elétron ou de um átomo de hidrogênio.



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 o oxigênio molecular (equação 4). Essas oxidações ocorrem pela formação de complexos excitados. Podem ocorrer desativações dos complexos (equação 4), ou desativação do fotossensibilizador na reação com oxigênio molecular (equações 5 e 6).



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

### 1.4.2 Mecanismo Tipo II

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



Observa-se que os processos do Tipo II são predominantes, uma vez que os mecanismos do tipo I tendem a ser muito rápidos devido a sobreposição máxima dos orbitais envolvidos, durante a formação do complexo excitado. (KAVARNOS; TURRO, 1986).

Oxigênio singlete é nomenclatura dada aos 3 estados eletronicamente excitados imediatamente superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental. A tabela 2 mostra essas configurações eletrônicas.

Tabela 1: Possíveis configurações eletrônicas assumidas pela molécula de oxigênio (Machado, 2000).

Estado	Orbital molecular antiligante	Energia *, $KJmol^{-1}$
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* [\uparrow] \pi_y^*$	0
$^1\Delta_y$	$[\uparrow\downarrow] \pi_x^* [ ] \pi_y^*$	92,4
$^1\Delta_x$	$[ ] \pi_x^* [\uparrow\downarrow] \pi_y^*$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow] \pi_x^* [\downarrow] \pi_y^*$	159,6

\* Relativa ao estado fundamental

## **1.5 Fontes de irradiação**

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 fotossensibilizadores. Esse tipo de sistema, infelizmente, exibe um aquecimento relevante, dificilmente permite um controle preciso na dosagem de luz, e normalmente apresenta baixa intensidade luminosa, na região desejada (ZHENG-HUANG, 2005). Têm se observado no mercado vários aperfeiçoamentos no sentido da minimização dessas desvantagens por meio de cuidadosos projetos de engenharia e *design*.

Entretanto, no Brasil, é utilizado com bastante sucesso em aplicações *in vivo* de TFD um equipamento chamado RL-50, desenvolvido com tecnologia nacional. O equipamento apesar de ter sofrido diversas alterações, foi concebido acoplado-se uma lâmpada halógena no interior de uma estrutura cilíndrica rígida dotada de haste, e através de um filtro óptico acoplado na extremidade, a radiação filtrada foi empregada para fotossensibilização. A Figura 6 exibe o equipamento descrito, retirado dos trabalhos de Tardivo e colaboradores (TARDIVO *et al.*, 2002).

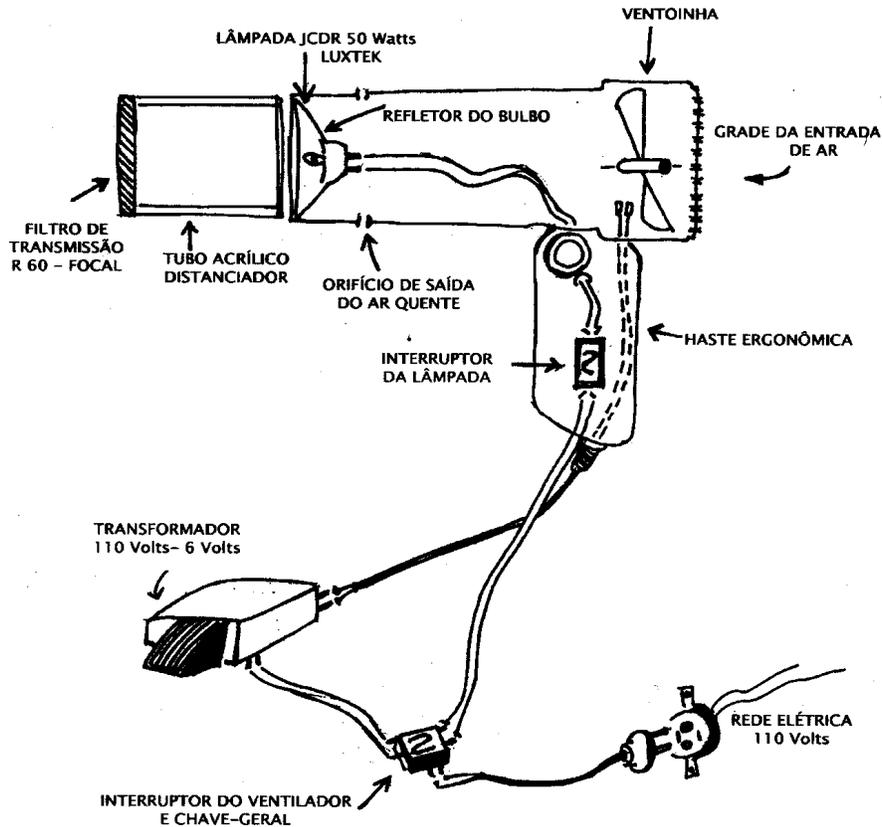


Figura 6: Equipamento RL-50. O filtro de transmissão é utilizado normalmente em fotografia (TARDIVO *et al.*, 2002).

O uso do equipamento de irradiação para TFD depende muito da região do organismo a ser tratada. Pois, sistemas que empregam luz filtrada, conseguem abranger uma área de irradiação substancialmente maior do que seus respectivos concorrentes a LASER. Apesar dos sistemas a LASER ser o mais empregado em TFD, apresenta uma série de desvantagens. A principal é o seu alto custo, principalmente em países como o Brasil. Equipamentos de custo elevado não são viáveis para uso em larga escala, como em sistemas de saúde pública. Outro parâmetro bastante observado para a aquisição de equipamentos é a intensidade da luz emitida, pois concluí-se que sistemas mais intensos são normalmente melhores. Na TFD, cada aplicação está envolvida a um protocolo médico, onde a dose de luz  $D$ , equação 9, é normalmente fixa. Onde  $I$  é a intensidade da luz emitida, e  $t$  o tempo.

$$D = I \cdot t \quad (9)$$

Acerca da dose empregada no tratamento de tumores, Herwig Kostron cita algumas doses empregadas em diferentes tipos de moléstias, usando diferentes tipos de sistemas de irradiação. A dose de  $240 \text{ J cm}^{-2}$  em função do tratamento e do fotossensibilizador, é considerada bastante alta (KOSTRON, 2003). Para se ter uma idéia prática do tempo necessário para se obter essa dose, considerando-se que sistemas que empregam luz filtrada normalmente apresentam intensidades próximas a 100 mW, nesses dispositivos seriam necessários 40 minutos de exposição.

A empresa Carl Zeiss produz um sistema de irradiação indicado para o tratamento oftálmico com verteporfirinas, chamado Visulas 690<sup>®</sup>; este sistema trabalha com um LASER que emite no comprimento de onda de 689nm, utilizado principalmente para o tratamento de degeneração macular da retina. A potência do LASER não ultrapassa 400 mW. O equipamento é muito interessante, entretanto devido ao seu elevado custo e seu uso restrito a aplicações oftálmicas, torna-se inapropriado para ser usado em centros de saúde pública. A Figura 7 mostra o equipamento Visulas 690<sup>®</sup>.



Figura 7: Equipamento Visulas 690<sup>®</sup> (CARL ZEISS, 2009).

A empresa DIOMED produz o equipamento DIOMED 630 PDT<sup>®</sup> (Figura 7), adequado para uso com Photofrin<sup>®</sup>, pois opera no comprimento de onda de 630 nm. O

equipamento é útil para aplicações endógenas, pois possui sistemas de fibra óptica com difusor para fazer a transmissão da luz. A potência máxima pode chegar a 2000mW. O equipamento possui um sistema de refrigeração. No entanto, não apresenta boa área de irradiação, o que limita a aplicação do equipamento à pequenas regiões. O comprimento de onda de 630 não é favorável a outros tipos de drogas fotossensibilizadoras. Por outro lado o Photofrin<sup>®</sup>/Photogem<sup>®</sup> não são fotossensibilizadores viáveis economicamente no Brasil (75 mg de Photofrin custam aproximadamente US\$2.200) (VIA; MAGNO, 2001). A Figura 7 exhibe o equipamento DIOMED 630 PDT<sup>®</sup>.



Figura 8: LASER DIOMED 630 PDT para Terapia Fotodinâmica. O equipamento possui dispositivo de fibra óptica, tornando versátil a aplicação endógena (DIOMED, 2000)

### 1.5.1 LED na Terapia Fotodinâmica

Diodos emissores de luz (LED) são também empregados em sistemas de irradiação voltados a TFD. Os LED além de constituírem uma alternativa de baixo custo, possuem grande homogeneidade luminosa, (PIESLINGER *et al.*, 2006) permitindo que a radiação seja facilmente dosada e calculada em diversas aplicações. A emissão de um LED é bem definida e normalmente estreita em um determinado comprimento de onda. Esse fator, associado à relativa intensidade (como nos modelos chamados de alto brilho), dispensa o

sistema de filtragem encontrado nos sistemas de lâmpadas policromáticas. Além destes fatores, a baixa dissipação térmica, combinada à emissão monocromática de moderada intensidade, sistemas simples, robustos e de pequeno tamanho, torna-se atraente o uso de LED em dispositivos para aplicações de TFD (PIESLINGER *et al.*, 2006; JUZENIENE *et al.*, 2004).

Os LED coloridos convencionais de 3 e 5 mm muito comuns no mercado, operam normalmente sob corrente média de 20 mA, e possuem baixas taxas de emissão luminosa (normalmente não superior à 5.000 mcd) (KINGBRIGHT CORP., 2007). No intuito de suprir essa desvantagem, observa-se duas alternativas: i) a construção de arranjos de LED que não somente aumentam a área de incidência, como potencializam a intensidade da radiação emitida; ii) a aplicação de LED de alta potência (HPLED – High Power LED). Esses últimos, atualmente são confeccionados para o uso em iluminação, são mais potentes que os anteriores, possuem boas taxas de conversão luminosa - cerca de 33 lm/W para o HPLED vermelho (PHILLIPS LUMILED LIGHT Co., 2006). Isso indica que gastam menor quantidade de energia para a emissão da mesma quantidade luminosa em comparação com outras fontes, além de preservarem as boas características que possuem seus correspondentes de baixa potência: durabilidade e emissão próxima à monocromática.

Em 2004 foram realizados estudos comparativos *in vivo* entre sistemas de irradiação de lâmpadas halógenas filtradas e sistemas dotados de tecnologia LED. O estudo, onde se empregou o ácido 5-aminolevulínico para aplicação de TFD em níveis dérmicos, revelou, em diversos aspectos, a superioridade dos sistemas que utilizam LED. Dentre as vantagens, pode-se citar a maior profundidade de atuação nos tecidos, baixo calor incidente, redução na intensidade de dor e boa eficiência em inativação de células *in vitro* (JUZENIENE *et al.*, 2004). 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. Essa sonda, pequena e flexível, emite luz permitindo baixíssimas invasões aos demais tecidos. Neste sistema o cateter pode ser introduzido em tumores percutâneos (LUSTIG *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2002).

Atualmente, espécies reativas de oxigênio são geradas na TFD através, principalmente, por LASER. As vantagens dos LASER estão no caráter da luz

monocromática e na alta intensidade obtida nesse dispositivo (ZHENG HUANG, 2005). Entretanto, a coerência de um LASER não é necessária em aplicações na TFD (JUZENIENE *et al.*, 2004; BOEHNCKE *et al.*, 1996). Esse fator justifica a construção de fontes não-coerentes, as quais são normalmente muito mais acessíveis economicamente, estáveis e versáteis.

## **1.6 *Staphylococcus aureus***

Atualmente o gênero *Staphylococcus* é composto por cerca de 27 espécies sendo algumas freqüentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais. Os principais tipos de estafilococos encontrados em seres humanos são os *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*.

O *Staphylococcus* são microorganismos Gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e normalmente apresentam 0,5µm a 1,5µm de diâmetro. São dispostos na forma de cocos, que se dividem em mais de um plano na formação de estruturas similares a cachos de uva (BAIRD-PARKER, 1990).

A reprodução pode ocorrer em faixas de pH de 4,2 à 9,3, apresentando ponto ótimo entre 7,0 e 7,5. Em concentrações entre 10 a 20% de NaCl e nitratos os *Staphylococcus* mostram-se bastante tolerantes (IGARASHI *et al.*, 1986). A temperatura ideal de crescimento fica próxima a 30 – 37° C. Já em temperaturas entre 37 – 40°C os *Staphylococcus* começam a produzir toxinas chamadas enterotoxinas. Essas toxinas são produzidas em alimentos contaminados quando estão em temperaturas acima de 4°C. Atualmente, são conhecidas cinco toxinas imunologicamente distintas (A, B, C, D, E). Algumas evidências sugerem que essas enterotoxinas são superantígenos termoestáveis e, assim, a intoxicação alimentar pode ser veiculada mesmo por alimentos cozidos, tornando-se um risco em potencial para a saúde pública (CARMO *et al.*, 2002). A intoxicação alimentar caracteriza-se por sintomas que incluem câimbra muscular, dor de cabeça, vômito, hipotensão, cólica abdominal, náusea e, principalmente, diarreia. Casos raros em crianças e idosos podem levar ao óbito (CARMO, 1997).

O *Staphylococcus aureus* é capaz também de produzir a toxina-1, capaz de promover a síndrome do choque tóxico. Nesta situação o paciente, geralmente mulher no período menstrual, apresenta febre alta, diminuição da pressão sistólica, eritema com descamação da pele, insuficiência renal, diarreia e outras manifestações. Essas manifestações são atribuídas a uma toxina produzida ao nível da vagina. Embora a grande maioria dos doentes seja constituída por mulheres em período menstrual, a doença tem sido registrada em pacientes com infecções de pele, ossos e pulmões (LIMA, 2007).

Além destes fatores, o *S. aureus* está muitas vezes associado à infecções cutâneas, nasais, de tecidos moles, tanto em pacientes da comunidade quanto em hospitalizados. Essas infecções podem atingir desde regiões superficiais até os tecidos mais profundos, sendo o *S. aureus* o agente mais comum. Além disto o *S. aureus* é conhecido por ser o principal responsável por infecções hospitalares (SANTOS, *et al.*, 2007).

Embora o *Staphylococcus aureus* possa ser suscetível à ação de várias drogas ativas contra bactérias Gram-positivas (tais como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e clorafenicol), é também conhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversas delas. Portanto, a antibioticoterapia adequada para estas infecções estafilocócicas deve ser precedida da escolha da droga com base nos resultados de testes de suscetibilidade (FREITAS *et al.*, 2004).

A penicilina é a droga de escolha se a linhagem for sensível. As linhagens resistentes são produtoras de beta-lactamase (penicilinase), uma enzima que inibe a ação da droga, e são codificadas por genes plasmidiais (NEVES *et al.*, 2007). O emprego de meticilina e outras penicilinas semi-sintéticas (tais como a oxacilina, nafcilina e cloxacilina), resistentes à ação das penicilinas, iniciada em 1959, representou uma etapa significativa na terapia antiestafilocócica (NEVES *et al.*, 2007). Porém a resistência a esses antibióticos foi detectada dois anos após o início da sua utilização.

A resistência à meticilina está relacionada a alterações das proteínas ligantes de penicilina (penicillin-binding proteins) (TAVARES, 2001). Essas linhagens resistentes a meticilina (MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes), muitas vezes são resistentes a outros tipos de antibióticos. Para essas linhagens a droga de escolha é a gentamicina e em caso de tratamento de infecções estafilocócicas de caráter grave é recomendado o uso da vancomicina (MELO *et al.*, 2005).

## 1.7 Onicomicose

A onicomicose é uma infecção que atinge as unhas, causada por fungos, correspondendo a cerca de 50% das queixas relacionadas à problemas de unhas. A infecção total normalmente gera espessamento, descoloração, opacificação, distrofia ungueal, podendo inclusive alterar a estrutura da unha (GRAY, 2002).

O agente dermatófito mais comum, o *Trichophyton rubrum*, é responsável por cerca de 69-92,7% dos casos. Quanto ao segundo agente, a literatura é um pouco confusa, variando entre o *Trichophyton tonsurans* e o *Trichophyton mentagrophytes var interdigitale* (HEIKKILÄ; STUBB, 1995; ARENAS, 1990). As drogas sistêmicas apresentam algumas desvantagens como a possibilidade de indução a reações hepatobiliares moderadas à severas, baixo espectro de atividade, possíveis interações medicamentosas. Durante o percurso do tratamento, podem ocorrer recidivas, que normalmente tornam o tratamento extenso, muitas vezes cansativo e oneroso ao paciente (CAMPANHA *et al.*, 2007). O tratamento tópico é frequentemente ineficaz na eliminação total da infecção (RUIZ-ESMENJAUD *et al.*, 2003; ARENAS, 2004).

Os fungos do gênero *Trichophyton*s caracterizam-se pela presença de grande quantidade de microconídios piriformes (formato de pêra), redondos ou ovulares, dispostos em acládio ou agrupados e macroconídios claviformes alongados (Figura 9B). Podem ser observadas ainda estruturas como candelabros fávicos, hifas em espiral e hifas em raquete. Alguns pesquisadores têm observado infecções invasivas por *T. rubrum* (GROSSMAN *et al.*, 1995) e *T. mentagrophytes* (SALVAT *et al.*, 1998) em indivíduos com deficiência imunológica.

Esse tipo de micose foi escolhida dentre outras dermatoses por constituir uma infecção de alta frequência nos adultos. No Reino Unido tem-se constatado a infecção em 3% da população de adultos (ROBERTS, 1992); a prevalência na Finlândia atinge cerca de 8% (HEIKKILÄ; STUBB, 1995); um estudo realizado nos Estados Unidos demonstra que a parcela afetada chega a valores próximos a 18,5% (CHARIF; ELEWSKI, 1996). No Brasil, recentemente, uma estatística realizada na cidade do Rio de Janeiro revelou a presença da micose em 19,35% da população (ARAÚJO *et al.*, 2003). O maior número de casos na

América Latina talvez esteja associado aos fatores climáticos e socioeconômicos (RUIZ-ESMENJAUD *et al.*, 2003).

A virulência dos dermatófitos está relacionada, principalmente, devido aos artroconídios (RASHID, 2001), as enzimas proteolíticas, as queratinases, as collagenases e as elastases (APODACA; MCKERROW, 1989; TSUBOI *et al.*, 1989) e também, a toxinas (GARETH-JONES, 1994). Esses dermatófitos proliferam-se em condições de escassez ou ausência de alguns mecanismos naturais de combate aos fungos tais como a estrutura física e química da pele, a exposição a raios ultravioleta, a condições de umidade e a competição com bactérias da microbiota autóctone da pele. A epiderme durante processos de queratinização pode também sofrer infecção, resultando numa perda contínua da camada mais superior da pele – o extrato córneo (WAGNER; SOHNLE, 1995).

As manifestações clínicas das dermatofitoses são, portanto, decorrentes das reações do hospedeiro aos metabólitos do fungo, da virulência da espécie infectante e da localização anatômica (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995). Os dermatófitos produzem infecções de acordo com a área corporal que invadem, sendo denominadas *tinha capitis*, *tinha barbae*, *tinha corporis*, *tinha cruris*, *tinha pedis*, *tinha manum* e *tinha unguium*.

O cultivo do *Trichophyton rubrum* em placas de Petri, em meio apropriado, apresenta crescimento lento e colônias brancas com textura algodonosa ou aveludada (Figura 9), com pregas radiais e pigmentação vermelha no lado reverso da colônia, daí o nome rubrum que significa vermelho rubro (CERVELATTI *et al.*, 2004).

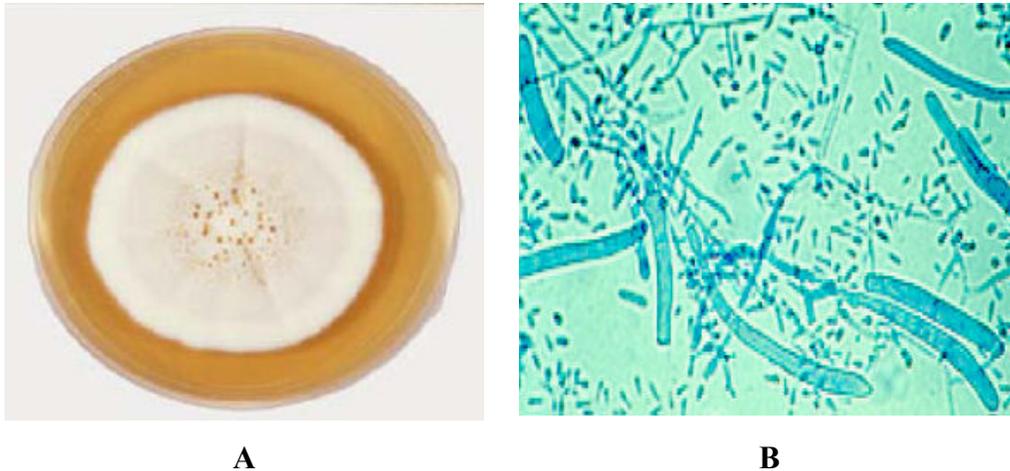


Figura 9: (A) Aspecto aveludado do crescimento de *T. rubrum* com 14 dias de crescimento, cultivado em Agar Sabouraud. (B) Microfotografia do perfil de conídios de *T. rubrum* evidenciando a maior presença de microconídeos em detrimento dos macroconídeos.

A Figura 10 mostra unhas dos pés acometidas pelo *Trichophyton*, as unhas normalmente são os principais alvos de ataque dos dermatófitos, em razão da presença de queratina, umidade elevada, baixa ventilação e ausência de luz por grandes períodos.



Figura 10: (A) e (C) representam o acometimento do leito ungueal em um estado moderado. (B) representa o acometimento no leito ungueal das mãos, num estado inicial. O agravamento pode manter-se estagnado durante longos períodos de tempo (PHIL, 2009).

Além de causar um impacto negativo na qualidade de vida, os casos de onicomicose costumam apresentar pronunciada resistência ao tratamento convencional. No tratamento convencional emprega-se drogas antimicóticas tópicas ou sistêmicas. Dentre as drogas sistêmicas destacam-se o fluconazol, itraconazol, terbinafina e a griseofulvina (principalmente em crianças) (TARDIVO *et al.*, 2007a; HEIKKILÄ; STUBB, 1995). A

medicação tópica envolve o uso de ciclopiroxolamina 8%, amorolfina 5% e uréia 40% com bifonazol 1% (RUIZ-ESMENJAUD *et al.*, 2003; GUPTA; SKINNER, 2004).

O custo do tratamento está em função do tempo de remissão. Nos casos mais comuns fica em torno de 6-12 meses. Nas incidências relativas à onicomicose nos pés, podendo ser mais ou menos longo em função de sua gravidade (RATIOPHARM, 2009). O tratamento contínuo por fluconazol 150mg/semana ou Terbinafina 250mg/dia, resulta no custo médio de R\$ 100,00/mês (CONSULTA REMÉDIOS, 2009). Já o tratamento contínuo com Itraconazol, dose 200mg/dia, o custo mensal aproxima-se de R\$ 300,00 (CONSULTA REMÉDIOS, 2009). A administração de Terbinafina, em alguns casos, tende a apresentar melhoras nos quadros clínicos mais rapidamente, quando comparada com os demais medicamentos (EVANS; SIGURGEIRSSON, 1999; OUF *et al.*, 2003).

## **2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

Um dos maiores obstáculos relativos à disponibilização da terapia fotodinâmica para a sociedade está no custo atribuído às fontes de irradiação e da droga fotossensibilizadora.

A presente proposta visa a confecção de uma fonte de luz potente e de baixo custo, empregando LED. Estes semicondutores se mostram promissores não somente pelo baixo custo associado, bem como por apresentarem diversas propriedades opto-mecânicas convenientes (e.g., monocromaticidade, robustez, durabilidade). Como também o uso de corantes fenotiazínicos, como o azul de metileno (Figura 5B e 5C respectivamente), foram aplicadas como alternativa ao uso de drogas mais onerosas tais como o ALA e derivados porfirínicos (Photofrin<sup>®</sup>, Photogem<sup>®</sup>), sem grandes perdas ao processo, conforme demonstrado por diversos pesquisadores, inclusive do âmbito nacional.

Fontes de irradiação voltadas à sensibilização de drogas normalmente são um dos pontos críticos para a obtenção de processos foto-oxidativos eficientes. O uso de LASERs voltados a excitação de drogas, apresentam problemas de aplicação, como reduzida área de incidência, elevado custo do equipamento e manutenção, limitadas opções de comprimentos de onda, etc. Neste trabalho pretendeu-se desenvolver fontes de irradiação que não empreguem o princípio do LASER para emissão de luz. Das fontes propostas, duas empregam o uso de diodos emissores de luz (LED), a outra emprega lâmpada halógena. Como modelo de aplicação ao processo fotodinâmico, avaliou-se a eficiência destas fontes na inativação fotodinâmica de colônias de *Staphylococcus aureus* e de *Trichophyton rubrum*, empregando-se azul de metileno como fotossensibilizador.

Foram delimitados os seguintes objetivos específicos, para o presente trabalho:

- Construir equipamentos empregando LED para uso na TFD que permitissem irradiação apreciável, emissão de comprimentos de onda satisfatórios, fácil manuseio, custo acessível, utilizar fotossensibilizadores comuns como o azul de metileno, haja vista o custo benefício deste corante frente às demais drogas disponíveis no mercado. Deve-se também caracterizar o equipamento construído quanto às suas propriedades físicas (ópticas). A construção deve priorizar o uso de azul de metileno como fotossensibilizador,
- Construir um equipamento, visando maximizar a ação fotodinâmica, e ser competitivo frente aos modelos comerciais disponíveis;

- Utilizar o equipamento aplicado à inibição de *Trichophyton rubrum in vitro*, haja vista que este é o dermatófito mais comum em casos clínicos confirmados de onicomicose. Também são previstos ensaios voltados a fotoinativação de *Staphylococcus aureus*, uma bactéria modelo, amplamente estudada, e também é a principal causa de infecções hospitalares.

### **3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### 3.1 Materiais e reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos, bem como suas respectivas purezas, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Reagentes usados e seus graus de pureza.

	Reagentes	Pureza
I	metanol	HPLC
II	etanol	P.A.
III	acetona	P.A.
IV	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	>90%
V	ácido Sulfúrico	P.A.
VI	azoteto de sódio	>99%
VII	dimetilsulfóxido	HPLC
VIII	NaCl	>95%
VIII	d-glicose anidra	P.A.
IX	azul de metileno	>99%
X	1,4-difenilisobenzofurano (DPBF)	>97%
XI	extrato de carne	BACTERIOLÓGICO
XII	triptona	BACTERIOLÓGICO
XIII	peptona	BACTERIOLÓGICO
XIV	meio de cultivo - ágar CLED	BACTERIOLÓGICO
XV	ágar bacteriológico	BACTERIOLÓGICO
XVI	ágar-dextrose-batata	BACTERIOLÓGICO

Os ensaios microbiológicos foram realizados com *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), cepa gentilmente doada pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Uberlândia. O fungo filamentoso *Trichophyton rubrum* foi coletado de amostras

hospitalares do setor de Micologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

A esterilização dos meios de cultura e soluções utilizadas no cultivo e manutenção das culturas de microrganismos, bem como todo o material necessário para a realização dos experimentos, foi realizada em autoclave horizontal. As soluções foram autoclavadas por 20 minutos a 120 °C. O descarte dos meios e do material contendo microrganismos foi sempre precedido por esterilização em autoclave.

Os espectros de absorção foram obtidos utilizando um espectrofotômetro Shimadzu UV-1201 de feixe duplo.

Os solventes foram utilizados sem purificação prévia.

A irradiância e os espectros da luz emitida pelos equipamentos desenvolvidos neste trabalho foram obtidos com o auxílio de um espectrômetro de fibra óptica (marca Ocean Optics, modelo SD2000) com um tempo de integração de 35 milissegundos. Para a obtenção das potências ópticas dos equipamentos comparou-se o espectro de emissão dos mesmos com um LASER à gás, da marca PHIWE de He-Ne que emite no comprimento de onda de 660 nm, de potência óptica de 1mW.

A área integrada do LASER obtida no espectrômetro corresponde à sua potência padrão (1mW), se medida à distância zero (na ponta de emissão do feixe). Desta forma, a potência dos equipamentos desenvolvidos foi obtida através da correlação com a área do LASER de potência padrão. A correlação só é proporcional caso os espectros obtidos sejam adquiridos no mesmo intervalo de integração (aqui foi utilizado 35 ms.)

O LASER utilizado como padrão limita esta metodologia a comprimentos de onda próximos à sua emissão (660 nm), pois, em comprimentos distantes deste, a medida deixa de ser um parâmetro mais quantitativo em função da variação da energia com o comprimento de onda.

Todos os ensaios e medidas foram realizados na Universidade Federal de Uberlândia.

## 3.2 METODOLOGIAS

### 3.2.1 Construção do Equipamento de lâmpada halógena (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”. Uma lente de vidro cristal 100% (marca DFV, modelo LL-P100, com 100 mm de diâmetro, 175 mm de foco e aumento de 1,5 vezes) foi fixada à uma distância de 7 cm fonte luminosa.

A uma distância de 22,5 cm, colocou-se uma cuba de refrigeração retangular de vidro oca, 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. A cuba permite a passagem de água visando a refrigeração da região próxima à amostra.

A luz emitida pela lâmpada foi filtrada para a eliminação de comprimentos de onda desnecessários, através de um filtro óptico vermelho de poliéster. Comercialmente esses filtros são empregados no controle da luminosidade para uso automotivo e arquitetônico. O filtro foi acoplado no topo da cuba de vidro e os comprimentos de onda transmitidos são exibidos na Figura 20. O espectro de emissão dês sistema é exibido na Figura 20.

A montagem completa é exibida na Figura 11. O cooler é alimentado por um transformador comum 12 V, enquanto a lâmpada é ligada diretamente na tensão alternada.

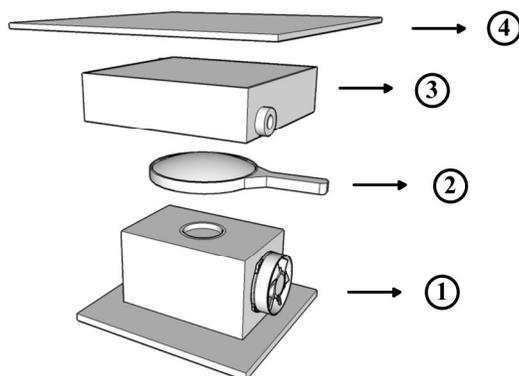


Figura 11: Esquema demonstrando montagem de PHLS; 1 – Carcaça metálica acoplada com a lâmpada e o cooler; 2 – Lente de aumento; 3 – Cuba de refrigeração; 4 – Filtro óptico.

### 3.2.2 Construção do Equipamento empregando LED de alto brilho (LED600)

Sob uma placa de fenolite, fez-se um arranjo para seiscentos (600) LED vermelhos de alto brilho (marca ZX, 8000 mcd). O arranjo foi organizado em cento e cinquenta (150) clusters de quatro (4) LED em série, ligados em paralelo.

A placa foi fixada em uma caixa metálica retangular, de 21 cm<sup>2</sup> de área, por 51 cm de altura. No interior da caixa foi soldado na estrutura metálica, alguns suportes que permitiram a fixação das amostras. Conforme estudos preliminares da variação da homogeneidade/intensidade em função da distância observou-se que a distância de 11 cm entre os LED e a amostra era a mais adequada para a realização dos ensaios.

Todo o arranjo foi ligado a uma fonte de alimentação DC, fornecendo corrente de 2,42 A. A estrutura descrita é mostrada na Figura 12.

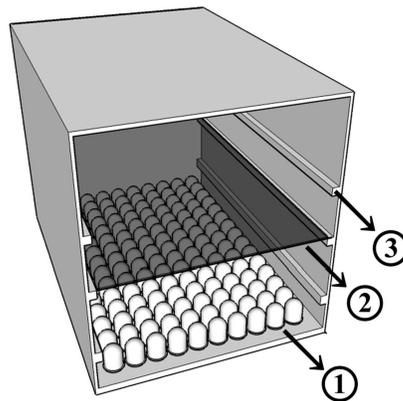


Figura 12: Equipamento LED600; 1 – Arranjo de LED de alto brilho; 2 – Suporte móvel transparente para acoplar as amostras; 3 – Níveis de altura para segurar o suporte.

### 3.2.3 Construção do Equipamento empregando LED de alta potência (AMS-II)

Arranjou-se em série (Figura 13) sete (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 em 350 mA.

Na realização dos ensaios de eficiência deste equipamento as amostras foram fixadas a uma altura de 2,5 cm da parte luminosa do sistema, uma vez que essa distância exhibe os melhores resultados de homogeneidade/intensidade.

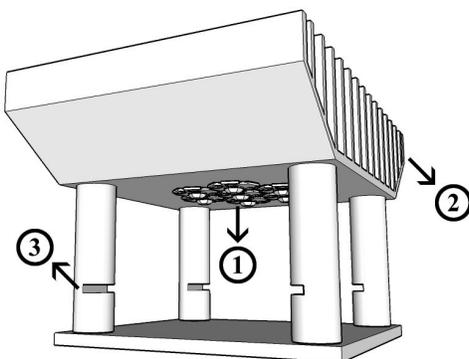


Figura 13: Protótipo para o equipamento AMS-II, 1 – Arranjo de LED de alta potência; 2 – Dissipador de calor de processadores soquete 775; 3 – Suporte com ranhuras para a inserção de amostras.

### 3.2.4 Preparo das soluções de azul de metileno

Soluções de azul de metileno empregadas nos ensaios bacteriológicos (Merck) nas concentrações  $5 \times 10^{-5}$ ;  $5 \times 10^{-6}$ ;  $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ , foram preparadas em capela de fluxo pela dissolução do corante em soro fisiológico estéril (solução salina de cloreto de sódio 0,9% esterilizada por autoclave) e armazenadas temporariamente em frascos Eppendorf de 2 mL.

Utilizou-se soluções de azul de metileno na concentração  $10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$  na coloração dos fungos para exame microscópico. As microfotografias foram obtidas num microscópio óptico Olympus, modelo SZ61. As figuras 26 e 27 foram obtidas com lente objetiva 400x e 1000x respectivamente.

### 3.2.5 Ensaios de fotooxidação de 1,4 Difenilisobenzofurano (DPBF)

Soluções  $10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  de DPBF foram preparadas em metanol absoluto, seguida da adição de azul de metileno, resultando na concentração final de  $10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  do corante.

As soluções foram irradiadas dentro de uma cubeta de quartzo (Hellma 110-QS) de 1 cm de caminho óptico aberta, sob agitação, em intervalos de 5 segundos, seguido de leitura no espectrofotômetro.

Visando uma comparação entre os sistemas propostos, estimou-se a integral de sobreposição (R) entre a absorção do azul de metileno ( $\text{ABS}_{\text{PS}}$ ) e a emissão dos equipamentos ( $E_{\text{EQUIP}}$ ) de irradiação (equação 10), conforme o método proposto por Bonacin e colaboradores (BONACIN *et al.*, 2009).

$$R = \int \text{ABS}_{\text{PS}} E_{\text{EQUIP}} d\lambda \quad (10)$$

Uma vez que a intensidade de irradiação não varia com o tempo, (R) possibilita estimar a fração relativa de fotossensibilizador excitada pela luz dos equipamentos propostos, e portanto, um importante parâmetro para a comparação da eficiência entre os equipamentos descritos.

Em um dos experimentos foi utilizado azoteto de sódio ( $\text{NaN}_3$ ), como supressor de oxigênio singlete.

### 3.2.6 Ensaios microbiológicos de fotoinativação bacteriana

A cepa bacteriana (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) foi inicialmente cultivada em um meio de cultura com a seguinte composição: 1,25% de extrato de carne ‘lab lemco’, 0,50% de triptona, 1,00% de peptona, 0,50% de cloreto de sódio, 0,25% de hidrogenofosfato dissódico heptahidratado e 2,00% de D-glicose anidra.

A seguir realizou-se um cultivo secundário em ágar Cistina-Lactose-Eletrolito-Deficiente – CLED (Oxoid), utilizado para crescimento e isolamento de UFCs. A partir

desta cultura preparou-se então uma suspensão bacteriana em soro fisiológico estéril. Nos ensaios bacteriológicos empregou-se uma suspensão bacteriana de 0,1 da escala de Mcfarland. Essa suspensão estoque foi diluída na proporção de 1:10 o que corresponde à uma densidade de células de aproximadamente  $3 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias UFC/mL.

As amostras foram incubadas, no escuro, por 30 minutos em uma mistura de 500µL de suspensão bacteriana e 500µL de solução de azul de metileno. Esse ensaio foi repetido para cada uma das seguintes concentrações de azul de metileno:  $5 \times 10^{-5}$ ;  $5 \times 10^{-6}$ ;  $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, as amostras foram irradiadas, por 20 minutos, sem agitação, outro grupo foi mantido no escuro como controle, em seguida transferiu-se 10uL da suspensão para uma placa de petri contendo o meio de cultura fundido e mantido em estufa à 35 °C. Esse meio foi preparado adicionando-se 2% de agar bacteriológico à formulação do caldo nutritivo. Após 24h de incubação, realizou-se a contagem de colônias, através de um contador de colônias PHOENIX (CP 602).

Utilizou-se ainda um terceiro grupo de amostras que foram tratadas na ausência de luz e de fotossensibilizador foram utilizadas como controle geral. Esse controle geral visa observar o crescimento bacteriano em situações ausentes do efeito fotodinâmico e ausentes da ação citotóxica do azul de metileno.

### **3.2.7 Ensaios microbiológicos de fotoinativação fúngica**

A amostra de *T. rubrum* foi suspensa em 10 mL soro fisiológico estéril. Numa placa com 24 reservatórios foi inserido 500µL de solução de azul de metileno  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  e 500µL de suspensão fúngica. O controle foi realizado na ausência de corante substituída pela adição de 500µL de soro fisiológico.

Durante 20 minutos as amostras foram incubadas no escuro à temperatura ambiente. As amostras incubadas foram irradiadas por 20 minutos pelo equipamento AMS-II, outro grupo foi reservado como controle no escuro por igual tempo. Posteriormente, transferiu-se 10µL da soluções para a superfície de placas de Petri que continham previamente agar-

dextrose-batata. O Agar foi preparado pela simples dissolução de Agar Dextrose Batata 39g/L, sem demais aditivos.

As placas de Petri foram deixadas para crescimento em temperatura ambiente, e observadas visualmente a cada dia, durante 14 dias.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4.1 Desenvolvimento dos Equipamentos

Vários LED do mercado foram utilizados, até a obtenção da configuração descrita. O presente trabalho menciona três equipamentos de irradiação, entretanto foram construídos diversos outros arranjos de LED até a obtenção dos sistemas descritos. As diferentes marcas ou modelos de LED tem efeito apenas na intensidade e o comprimento de onda emitido. Assim, anteriormente à montagem, através de um espectrômetro, visualizou-se a emissão espectral de todos os LED disponíveis, observando se o pico de emissão do LED localizava-se próximo ao pico da absorção do azul de metileno ( $\lambda \cong 663\text{nm}$ ). Sendo assim, aquele que mais se aproximava tenderia a ter uma eficiência maior. Essa metodologia é importante não somente para confirmar as características informadas pelo fabricante como o  $\lambda_{\text{máx}}$  mas, também, permite uma estimativa da intensidade de cada LED ao se comparar a área de emissão dos mesmos à de LASERs de potência padrão.

No mercado, os LED mais comuns e que apresentam brilho suficiente para aplicações luminosas são os modelos chamados de alto brilho. Apesar do critério não ser muito bem estabelecido, é definido como LED de alto brilho aquele que apresenta intensidade luminosa superior a 1 candela, uma vez que normalmente o brilho desses LED é medido em milicandela (mcd). Na faixa do vermelho ( $\lambda_{\text{máx}} = 640 \text{ nm}$ ) é possível obter LED com brilho próximo a 9000 mcd. Os LED vermelhos que apresentam faixa de  $\lambda_{\text{máx}}$  superior à 640 nm são bastante incomuns uma vez que seu brilho perceptível visualmente é inferior e portanto é pouco apreciado no mercado. No mercado, observa-se também modelos que emitem no infravermelho e que apresentam normalmente  $\lambda_{\text{máx}}$  em 850 ou 940 nm.

Nas primeiras montagens produziu-se pequenas placas com cerca de nove a doze LED ligados em paralelo. A ligação em paralelo foi escolhida pois assim seria possível alimentar todos os LED com baterias de 9V. Os LED foram alimentados com a tensão normal de trabalho deste modelo 2,2V, e a queda de tensão obtida pelo uso de resistores, conforme a Figura 14.

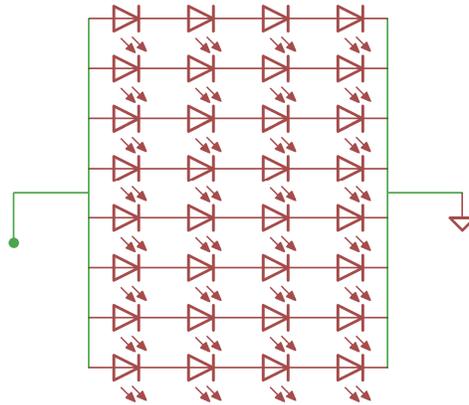


Figura 14: Esquema do arranjo de ligação dos LED em série-paralelo.

Nesse sistema (Figura 15) o número de LED em série foi ajustado para drenar a ddp da bateria de 9V, não necessitando de resistores, o que torna os sistemas bem mais práticos. A Figura 15 mostra o dispositivo construído nesta abordagem.

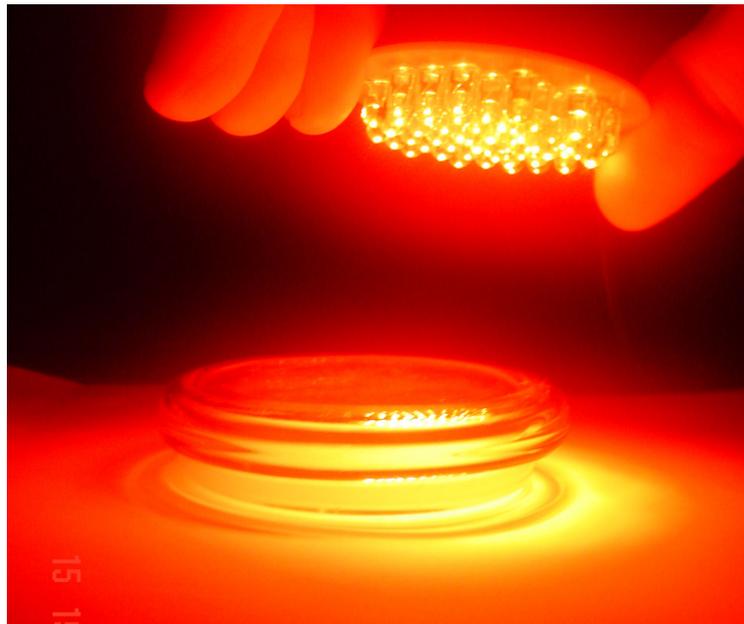


Figura 15: Lâmpada de LED desenvolvida com arranjo série-paralelo que não apresenta limitador de corrente no circuito.

O equipamento descrito como LED600 foi desenvolvido com base nesta abordagem. Neste equipamento, empregou-se 600 LED para a obtenção de uma boa área de

irradiação, ligados numa matriz de 100 clusters com 6 LED em cada série. O sistema opera a 13,2 V e drena 3 A de corrente. Por limitações operacionais (a fonte empregada não fornece mais que 2A) todos os ensaios realizados neste trabalho foram executados com a corrente limitada a 2 A. O equipamento é exibido na Figura 16.

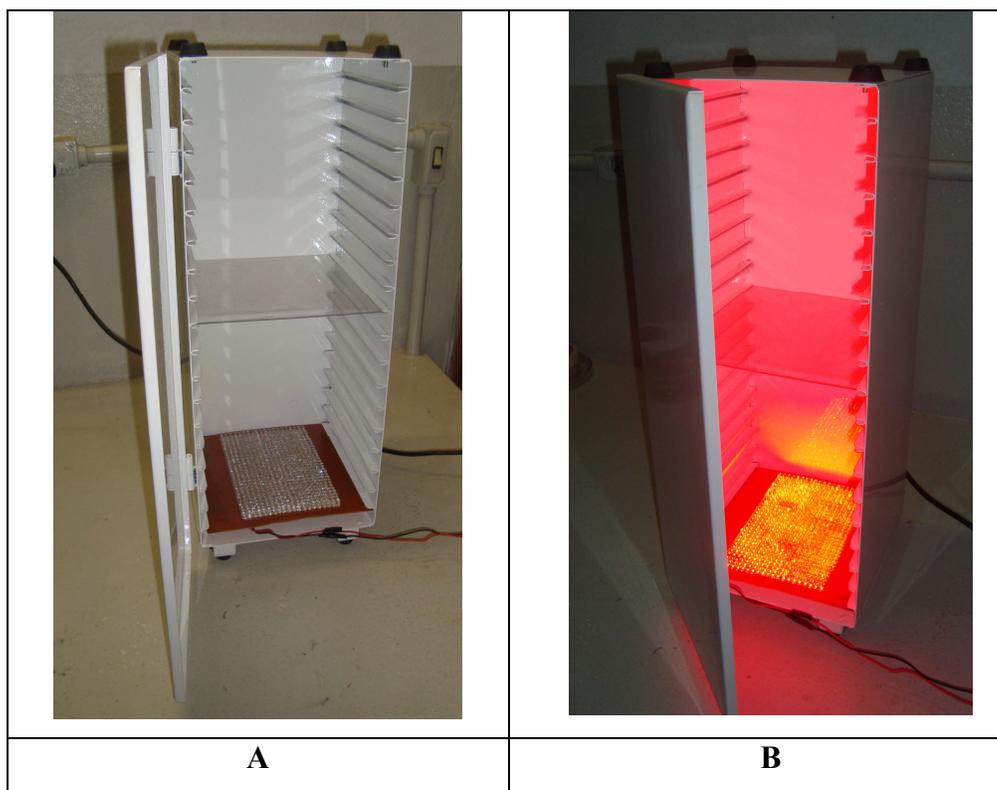


Figura 16: Fotos do equipamento LED600. A – Desligado. B – Ligado.

Nas matrizes com LED convencionais, o uso de baterias se mostrou ineficiente, pois a corrente drenada por estes circuitos é bastante elevado. Nas baterias a redução da carga implica na redução do brilho dos LED, um efeito bastante indesejável. Assim esses circuitos foram alimentados em fontes de alimentação convencionais, como as fontes lineares a venda no comércio..

O sistema LED600, apresenta uma matriz extensa, contendo 600 LED, dentre os quais, devido a falta de controle de corrente, gerou brilhos desiguais em várias ramificações. Observou-se com o uso deste equipamento que o arranjo em paralelo implica em algumas desvantagens, e o uso de sistemas em série tendem a ser muito mais adequados

à processos fotoquímicos, haja vista que o fornecimento de intensidade homogênea, de irradiância fixa e estável, são fundamentais para obter resultados confiáveis. Desta forma o arranjo em série e o controle na corrente (e não na tensão) fornecida aos LED, foi preferido, uma vez que:

- i) A curva entre a corrente e a voltagem dos LED é muito abrupta: Pequenas alterações na voltagem traduzem-se em grandes variações na corrente. Uma vez que a intensidade luminosa dos LED altera-se mais linearmente com a corrente, sutis alterações na voltagem implicariam em drásticas mudanças na intensidade. Portanto, entre dois sistemas distintos A e B, o “A” opera em voltagem fixa, e o “B” em corrente fixa. Observa-se que em “A”, por mais preciso que seja, tende a oscilar mais o brilho dos LED do que “B”. A razão disto pode ser entendido analisando a Figura 17, que mostra as alterações de voltagem versus corrente (brilho) em um LED. Isso indica que “B”, mesmo atuando com sistemas simples de controle de corrente, tende a garantir menores oscilações da intensidade luminosa.

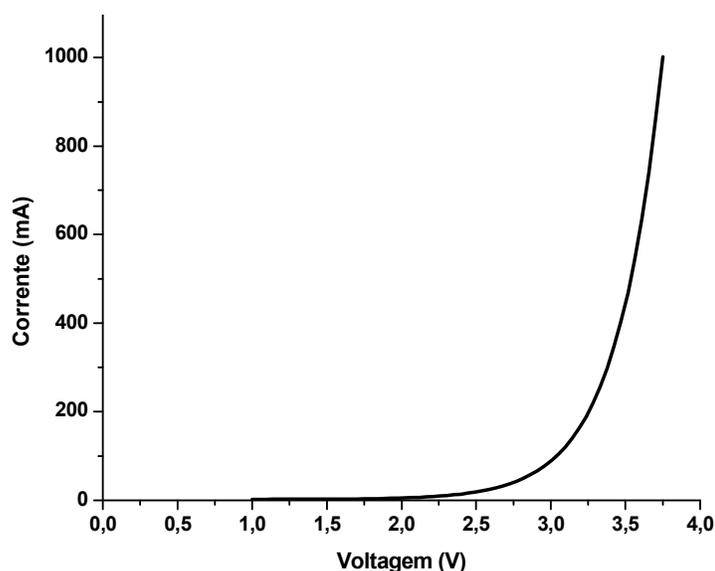


Figura 17: Comportamento entre a voltagem e corrente na ligação de um LED.

- ii) Em função da voltagem e do coeficiente negativo de temperatura natural dos LED, arranjos conectados em paralelo não garantem que a corrente (e assim o brilho) entre cada LED seja necessariamente igual. Quando dois diodos são conectados em paralelo e um deles aquece um pouco mais do que o outro, esse diodo tende a drenar mais corrente, aquecendo-se mais e assim contribuindo progressivamente através de um efeito cascata que, leva a um superaquecimento do LED. Uma vez que o LED superaquece, observa-se inexoravelmente a redução de seu brilho em função da temperatura (eles possuem um coeficiente negativo de temperatura).

O sistema LED600, infelizmente, por questões práticas, não pode ser arranjado em série, uma vez que a tensão em componentes em série é cumulativa, e, portanto o equipamento tenderia a consumir uma tensão próxima a 1320 V (assumindo 2,2 V a tensão aproximada de cada diodo), inviabilizando o projeto. Na prática foi observado que apesar do arranjo em LED600 ter sido realizado de forma bastante compacta, a homogeneidade não foi comprometida, e a limitação de corrente, pelo uso de uma fonte apropriada, reduz parte dos problemas relacionados aos arranjos em paralelo. Além disto, LED600 possui inúmeros componentes, caso fosse montado em série e um dos diodos fosse danificado, abrindo o circuito, toda iluminação do conjunto seria comprometida.

No sentido de evitar todos os problemas práticos observados no sistema LED600, foi construído o sistema AMS-II, no qual os LED foram associados em série e com controle de corrente. Desta forma o sistema construído apresentaria todas as características apreciáveis conforme supramencionado. Outra vantagem na construção de AMS-II é o uso de LED de alta potência, cuja intensidade luminosa é muito maior. Portanto empregou-se apenas 7 LED de alta potência em AMS-II. A Figura 18 mostra o equipamento em funcionamento.

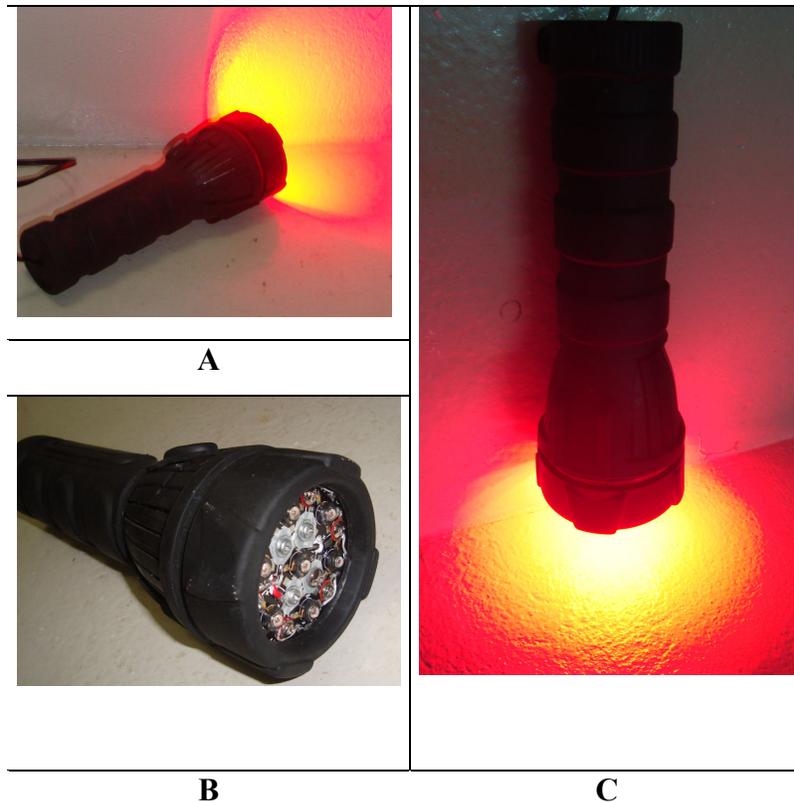


Figura 18: Fotos de AMS-II. A e C – Equipamento em funcionamento. B – Vista frontal do equipamento.

O controle de corrente dos LED de alta potência foi realizado através do circuito integrado IRS2541 produzido pela International Rectifier (2007). Esse circuito permite a regulagem de uma corrente constante para os LED, por meio de realimentação através de um controle de corrente de saída no seu pino IFB (*feedback* de corrente). Esse tipo de controle é muito comum em fontes chaveadas, e permite dentre diversos outros fatores, a independência da tensão de entrada (110 ou 220V e 60Hz, no Brasil) para regular a corrente de saída. Portanto o circuito além de apresentar bom controle de corrente é bivolt automático, evitando assim a queima por ligação em tensão incorreta (uma das maiores causas de queima de eletroeletrônicos).

No projeto não se utilizou DEN1 (diodo de entrada), COUT (capacitor de saída) e ROUT (resistor de saída), pois as funções adicionais executada por estes dispositivos não foram necessárias. Todos os outros componentes utilizados, além de suas características e

valores, exibidos na figura 19, foram inseridos da mesma forma que o sugerido na nota de aplicação do fabricante.

O esquema de montagem de AMS-II foi realizado conforme a nota de aplicação do circuito integrado descrito, e está descrita na Figura 19.

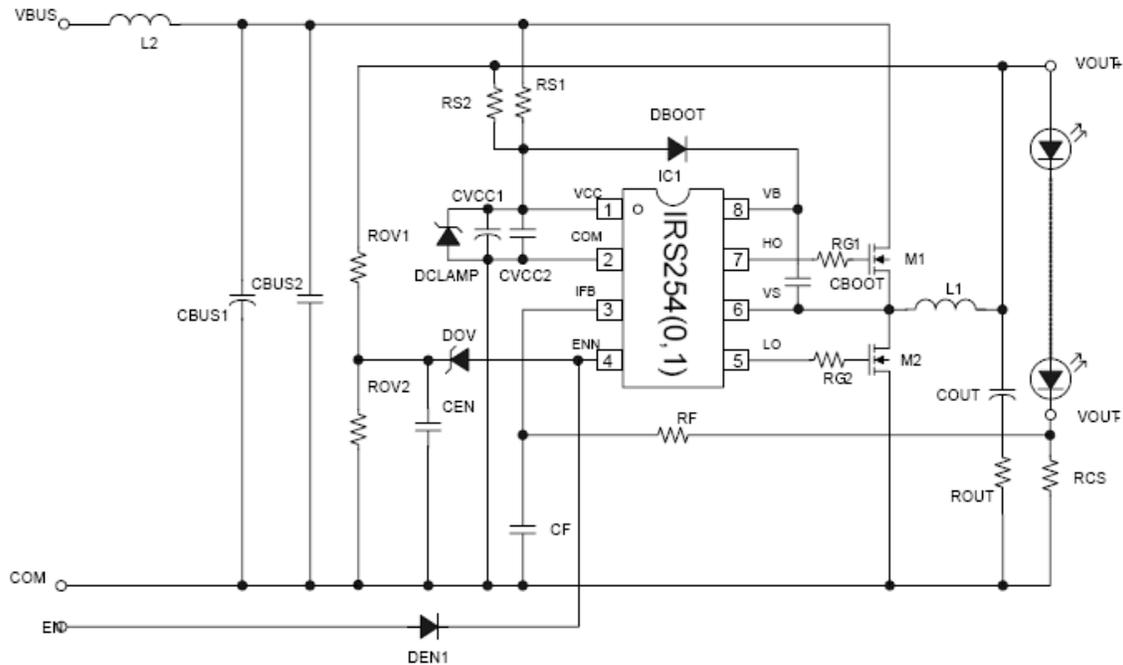


Figura 19: Esquema de ligação do conversor desenvolvido para ligar o LED de alta potência (INTERNATIONAL RECTIFIER, 2007).

Cada LED de alta potência foi alimentado com 350 mA de corrente e a tensão de saída do equipamento era de 22,4V. Um dissipador de calor de corpo em alumínio anodizado foi fixado na matriz de LED.

Já o equipamento construído e utilizado como comparação entre os dispositivos que empregam LED é de lâmpada halógena filtrada e foi aqui denominado por PHLS. O PHLS possui um custo de produção, de no mínimo, duas vezes menos que os demais dispositivos desenvolvidos. Esse equipamento também é muitas vezes mais acessível que os equipamentos comerciais análogos (de lâmpadas). A lente empregada reduz muito a área de radiação homogênea. Todavia, testes realizados com o espectrômetro indicaram um ganho superior à 50% no valor da intensidade luminosa, quando se usa a lente. Na ausência de sistemas de refrigeração, a amostra pode atingir temperaturas próximas à 52°C o que

favorece a desnaturação de DNA e proteínas. Desta forma, usou-se uma cuba de vidro que dissipa eficientemente o calor gerado, garantindo que a temperatura da amostra não seja elevada a mais do que 3°C.

Caso a proposta fosse a construção de equipamentos LASER, estes podem ser construídos, a partir do LASER de gravadores de DVD. Isso porque o LASER de gravadores de CD emite normalmente na faixa de 780 nm, os LASERs de gravação em DVD emitem próximos à 650 nm (CLEMENTS, 2006), uma faixa bastante adequada para alguns fotossensibilizadores. Esses LASERs normalmente apresentam potências apreciáveis (245 mW). A construção de um sistema simples para ligar esse LASER pode ser feita com um circuito integrado regulador de tensão do tipo LM317 fabricado pela National Semiconductors. Apesar deste sistema, assim como qualquer outro equipamento a LASER, tender a apresentar uma área de irradiação limitada (inferior a 0,25 cm<sup>2</sup>), seu custo deve ser baixo comparando com os dispositivos normalmente utilizados e comercializados com a tecnologia LASER.

## ***4.2 Espectros de emissão dos equipamentos***

O espectro de emissão dos equipamentos desenvolvidos, sobreposto à absorção do corante empregado está disposto na Figura 20.

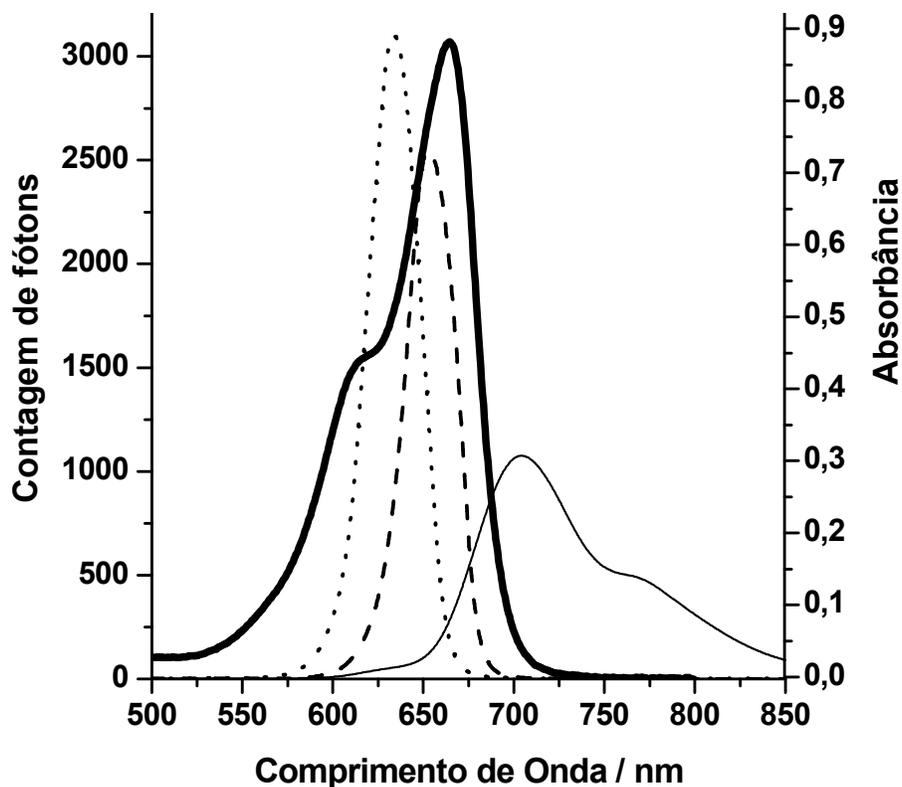


Figura 20: Espectro de absorção do azul de metileno (—); Espectro de emissão do PHLS (—), LED600 (.....), e AMS-II (----)

O LED600 apresenta uma ampla área de emissão. Cerca de  $360 \text{ cm}^2$ , uma razoável homogeneidade (determinada com auxílio de um espectrômetro na qual o pico de intensidade não se altera em  $\pm 4\%$  em magnitude na região central de incidência de luz) e baixo aquecimento. Para este equipamento foi observada uma distância de 11 cm, como ponto de melhor relação homogeneidade/intensidade. Esta distância qual foi utilizada nos ensaios microbiológicos e na degradação de DPBF. Nos sistemas que usam arranjos de LED deve-se encontrar a distância de trabalho ideal, uma vez que, o invólucro polimérico atua como lente. Uma alta proximidade implica que a amostra está muito próxima ao foco, e, assim, a irradiação deixa de ser uma área definida e passa a ser pontual e intensa, perdendo-se assim a homogeneidade. Um aumento na distância, tende a melhorar a distribuição da radiação, mas resulta em perdas na intensidade.

O AMS-II apresentou uma intensidade muito próxima a de LED600, possuindo um pico de emissão em 652 nm, sendo muito mais próximo ao pico de absorção do azul de metileno (663 nm). Foi visto que a emissão do AMS-II não é somente mais apropriada para

o azul de metileno, como também apresenta ótima homogeneidade conforme visto em testes adicionais com o espectrômetro. Além disto, a área de emissão de 95 cm<sup>2</sup> do AMS-II (Tabela 3) podem ser aumentada pela simples adição de mais LED ao arranjo.

A fração útil de luz que excita o corante fenotiazínico é diferente para cada equipamento, uma vez que os equipamentos apresentam diferentes potências de emissões em função do comprimento de onda. As informações sobre a área de irradiação com intensidade homogênea, potência óptica, irradiância, o fluxo fotônico em mol de fótons (Einstein) por segundo  $\Phi$ , e R (fração de moléculas excitadas) obtidas com cada equipamento são resumidas na Tabela 3,

Tabela 3: Potência óptica (P), Área de irradiação (A), Irradiância (Ir) e estimativa da fração excitada de moléculas do fotossensibilizador (R), nas condições empregadas.

<i>Equipamento</i>	P (mW)	A (cm <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	Ir (mW cm <sup>-2</sup> )	$\Phi$ (Einstein s <sup>-1</sup> )	R <sup>b</sup>
<i>PHLS</i>	2,90	132	1,80	1,7 x 10 <sup>-8</sup>	6,33
<i>LED600</i>	20,11	360	12,46	1,6 x 10 <sup>-7</sup>	18,58
<i>AMS-II</i>	19,69	95	12,21	1,07 x 10 <sup>-7</sup>	31,36

<sup>a</sup> Área de irradiação homogênea. Refere-se apenas à possibilidade de irradiação de maiores números de amostras ao mesmo tempo. Variação máxima em  $\pm 5\%$  de intensidade

<sup>b</sup> Calculado em função do azul de metileno solução 10<sup>-6</sup> mol dm<sup>3</sup> em cloreto de sódio 0,9%.

É interessante ressaltar que a Tabela 3 relaciona a potência em mW de cada equipamento referente ao pico do máximo de absorção (663 nm) do azul de metileno, o que não diz a respeito da emissão total fornecida, mesmo porque, a potência efetiva quando se utiliza azul de metileno é a que se localiza nessa região.

Observa-se que a região de emissão dos LED se enquadra na faixa de melhor excitação do fotossensibilizador, enquanto o PHLS apresenta emissões eletromagnéticas de baixa magnitude na região de melhor excitação do fotossensibilizador (R= 6,33). A região de melhor emissão do PHLS é apropriada para outros fotossensibilizadores, como por exemplo, a classe das ftalocianinas, uma vez que sua banda Q situa-se na região entre 675-700 (ROSENTHAL, 1991). Essas emissões são dificilmente obtidas com LED convencionais, pois comercialmente valores nesta faixa não são usuais.

Mesmo que as irradiâncias de LED600 e AMS-II, se aproximem, é esperado que AMS-II tenha maior eficiência em geração de espécies reativas em virtude de sua irradiação ser capaz de excitar uma maior fração de moléculas do fotossensibilizador (R= 31,36) frente aos demais equipamentos.

Foi previsto também que para AMS-II se tornasse bastante versátil para outras drogas, é possível trocar a cabeça luminosa do equipamento para de outros tipos de LED, como os azuis que irradiam na região de 415 nm, visando a ativação de cumarinas, psoralenos e outros derivados. Essa troca da cabeça luminosa permite que o equipamento trabalhe com módulos, os quais, favorecem a possibilidade de irradiação em diferentes comprimentos de onda. Em função do circuito utilizado, a tensão é readequada automaticamente a cada nova cabeça, sendo o único fator fixo, a corrente, centrada em 350mA.

Não se realizou um ensaio prévio para observar o photobleaching (fotobranqueamento) do azul de metileno, isso significa que nas medidas de (R) não está incluso um parâmetro de correção sobre o fotobleaching do azul de metileno. Entretanto os ensaios comparativas que se seguem não foram comprometidas por este fator, pois, sabe-se que a auto-oxidação de azul de metileno é um fenômeno de baixas magnitudes e ainda assim é um fator que está incluso em todas as medidas. Portanto, em critérios comparativos este fator não exerce uma influência de impacto.

### ***4.3 Confirmação da presença de oxigênio singlete***

O substrato fotooxidável 1,3-difenilisobenzofurano (DBPF) foi empregado para o monitoramento espectrofotométrico das reações de geração do oxigênio singlete presente no meio. A banda de absorção mais pronunciada do DPBF é na região próxima à 405 nm. Sabe-se que o DPBF (Figura 21A) sofre reação específica com oxigênio singlete, formando um endoperóxido (Figura 21B), incolor, que se decompõe rapidamente em 1,2-dibenzoilbenzeno (incolor em 350-450 nm)(Figura 21C).

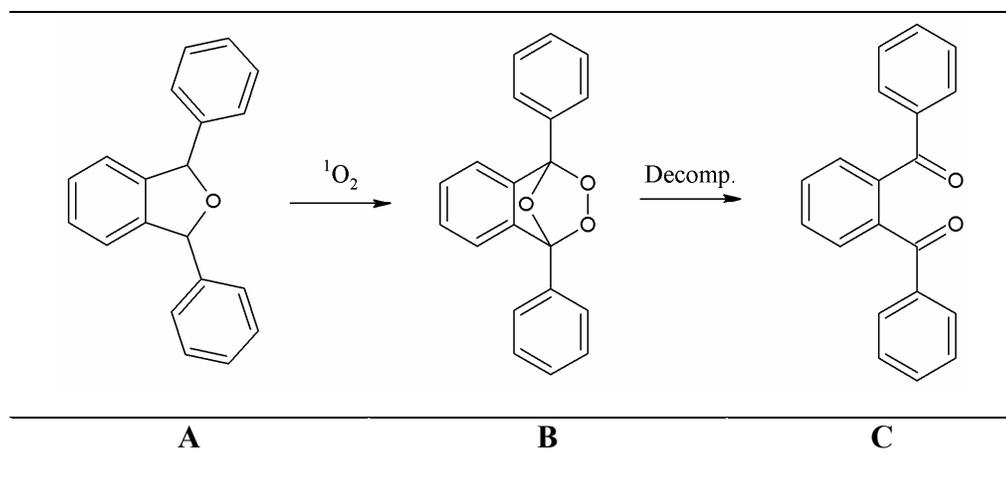
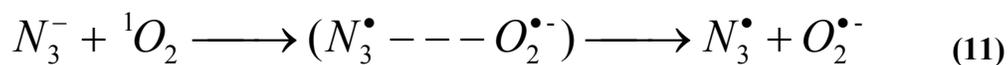


Figura 21: Degradação de DPBF (A), via reação com oxigênio singlete, formando o produto incolor 1,2 dibenzoinbenzeno (C).

Soluções contendo azoteto de sódio ( $NaN_3$ ) podem ser empregadas no intuito de se evidenciar a participação de oxigênio singlete no processo reacional citado (Figura 21). o azoteto de sódio é um forte supressor de oxigênio singlete citado na literatura (FOOTE, 1979). Na presença de ânions azoteto, o oxigênio singlete reage rapidamente (na ordem de  $10^8 \text{ s}^{-1}$  em  $H_2O$ ) (FOOTE, 1979), liberando radicais azidila, que são formados pela dissociação de um complexo de transferência de carga formado durante a supressão (equação 11) (FOOTE, 1979; HARBOUR; ISSLER, 1982).



Os radicais formados podem se recombinar, na formação de oxigênio molecular, e ânions azoteto.



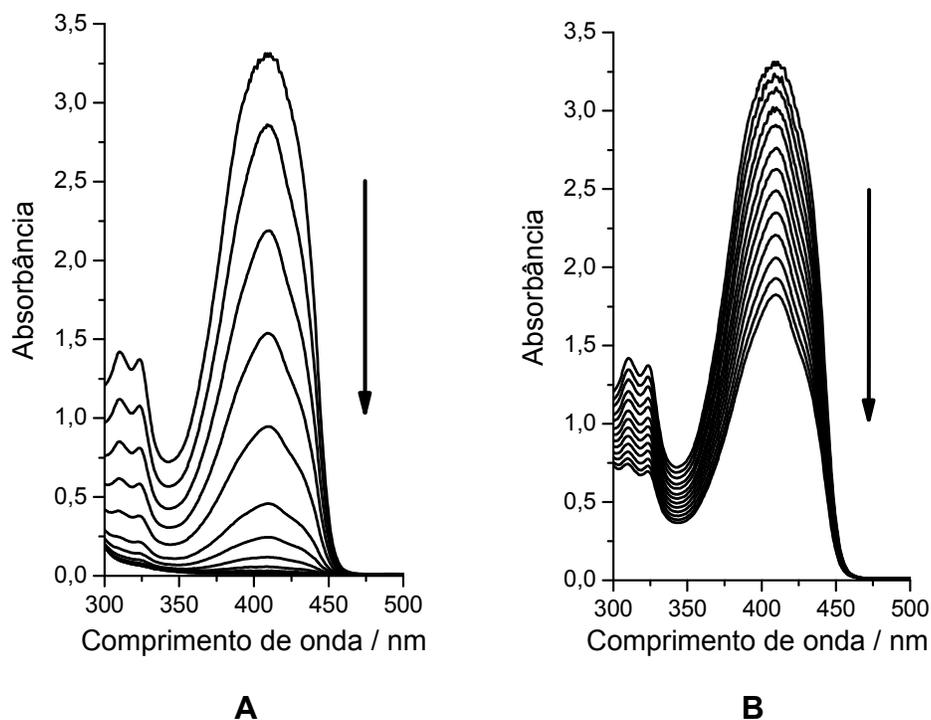


Figura 22: Oxidação fotoinduzida de DPBF pelo sistema LED600 com uso de azul de metileno na concentração  $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . (A) - Ausência de  $\text{NaN}_3$ ; (B) - Em excesso de  $\text{NaN}_3$ . Cada espectro foi obtido em instantes de 5 segundos de irradiação.

Os resultados da Figura 22 foram obtidos para o equipamento LED600, entretanto todos os equipamentos exibiram características similares. Cada espectro foi obtido após a cronometragem de 5 segundos de irradiação.

É possível observar através da Figura 22(B), que em presença de  $\text{NaN}_3$ , ocorre uma redução na taxa de oxidação do DPBF. O pico de absorção na região do DPBF situa-se na região 420 nm e observa-se pela figura, que o mecanismo de oxidação por participação do oxigênio singlete mostra-se predominante. Em todos os equipamentos foi observada a geração e supressão de oxigênio singlete pelo azoteto de sódio.

Apesar dos ensaios visarem apenas os aspectos comparativos, medidas mais precisas poderiam ser obtidas em atmosfera presente e ausente de  $\text{O}_2$ , obtida pela inserção de gás inerte, uma vez que a presença de íons azoteto apenas ocasiona uma competição inibitória do  $^1\text{O}_2$  tanto por DPBF quanto por  $\text{N}_3^-$ . Mesmo assim, concentrações saturadas de azoteto são suficientes para a observação do fenômeno.

#### 4.4 Comparação da cinética de Fotooxidação de DPBF

Quantitativamente é possível expressar a eficiência na geração de espécies reativas de oxigênio dos equipamentos por meio de um estudo cinético da degradação de DPBF. A equação 13 mostra a degradação do substrato oxidável pela ação do oxigênio singlete. A concentração de oxigênio singlete foi considerada como constante uma vez que as soluções estão abertas e sob constante agitação. Desta forma, é possível incorporar a concentração de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) à constante cinética  $k$ , resultando em uma constante de pseudo primeira ordem,  $k'$ . Desta forma, a cinética resultante é de pseudo primeira ordem (equações 14 e 15). Após a integração, a equação 16 é obtida para a cinética da reação promovida (BELL; MACGILLIVRAY, 1974; YOUNG *et al.*, 1973). A obtenção condições cinéticas na qual o oxigênio se encontra em concentrações ainda mais próximas de à de uma constante podem ser obtidas pela borbulhação de ar na solução: o ar borbulhado mesmo que em pequenas quantidades já garante concentrações suficientes para que o oxigênio dissolvido possa de fato ser considerado como constante.



$$v = \frac{d[\text{DPBF}]}{dt} = -k[{}^1O_2][\text{DPBF}] \quad (14)$$

$$\frac{d[\text{DPBF}]}{dt} = -k'[\text{DPBF}] \quad (15)$$

$$\ln\left(\frac{[\text{DPBF}]}{[\text{DPBF}]_0}\right) = -k't \quad (16)$$

A redução na concentração de DPBF em função do tempo é exibida na Figura 23, para todos os equipamentos construídos.

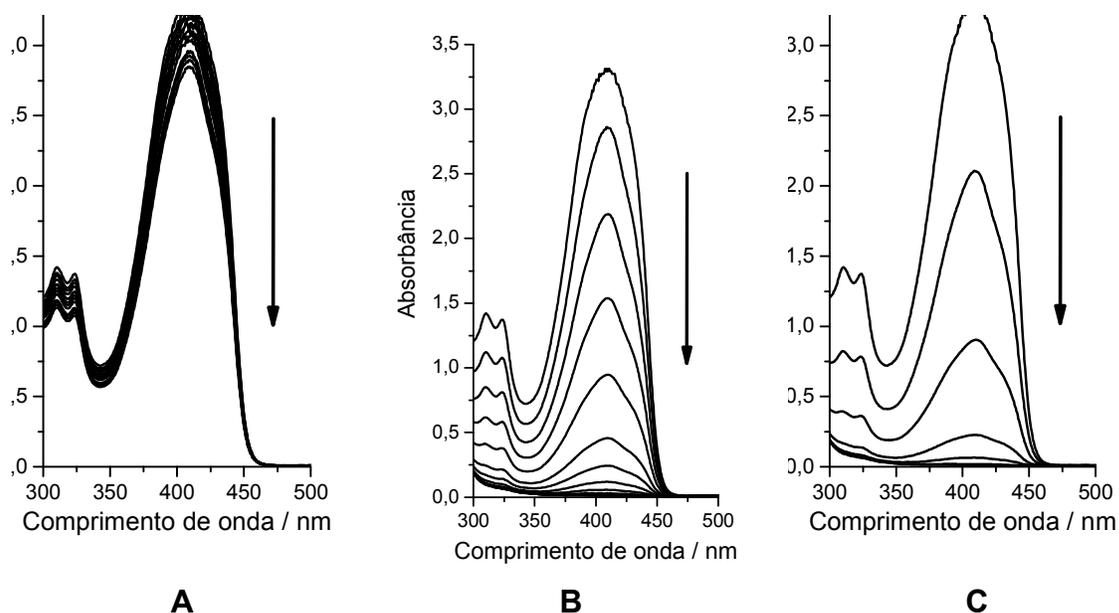


Figura 23: Oxidação Fotoinduzida de DPBF. Cada espectro foi obtido após 5 segundos de irradiação. (A) – PHLS; (B) – LED600; (C) – AMS-II. A concentração de azul de metileno utilizada foi aproximadamente  $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Todos espectros tendem a decrescerem em absorção em virtude da descoloração do DPBF. Os espectros foram obtidos após 5 segundos de exposição à luz emitida pelos equipamentos, a variação de tempo em função da absorção é melhor explicitada na Figura 24. Assim, foi observado que para o AMS-II, somente 20 segundos de irradiação (vide o 5º espectro decrescente da Figura 23 C) já se mostrou suficiente para a redução de 98% da intensidade da banda de DPBF. Os controles no escuro realizados para este ensaio não exibiram reduções insignificantes na banda do DPBF.

Uma melhor comparação entre as cinéticas de fotodegradação de DPBF, para os diversos equipamentos pode ser obtida analisando Figura 24.

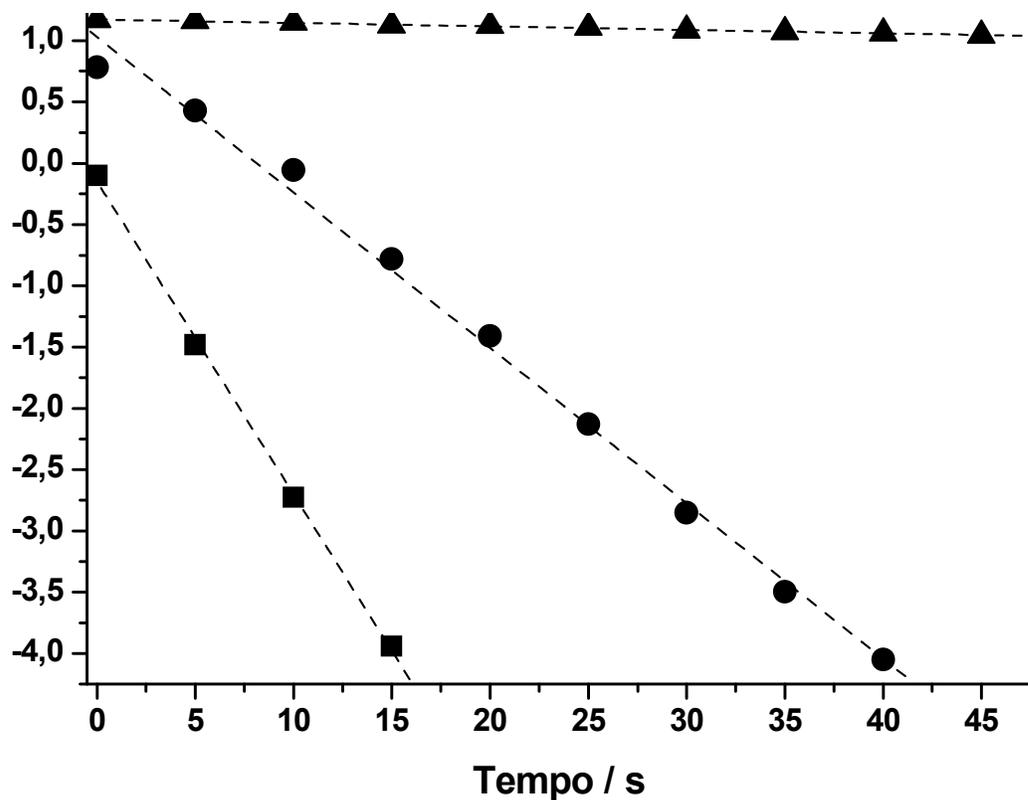


Figura 24: Variação da concentração de DPBF com o tempo. ▲ - PHLS; ● - LED600; ■ - AMS-II.

Esses resultados sugerem que AMS-II apresentou o melhor desempenho. Esses ensaios também estão de acordo com a Tabela 3, uma vez que AMS-II emite radiação eletromagnética em uma região do espectro mais apropriada para a faixa de absorção do azul de metileno e conseqüentemente apresenta maiores valores de R (fração estimada de moléculas excitadas). Nessas condições experimentais, ainda é possível afirmar que o sistema AMS-II apresenta o dobro da eficiência do sistema LED600 ( $k'_{AMS} = 0,25532 \text{ s}^{-1}$ ;  $k'_{LED} = 0,12668 \text{ s}^{-1}$ ). Já PHLS, em virtude da pequena emissão na faixa útil de trabalho, apresenta uma eficiência bastante reduzida quando comparada aos equipamentos de LED.

#### **4.5 Inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus***

O azul de metileno, na ausência de luz, apresenta ação bactericida em especial a Gram-positivos. Esses efeitos são descritos na literatura (LI, *et al.*, 2000; ROHS; SKLENAR, 2004). O corante catiônico se liga a região polianiônica do DNA. O anel planar do AM além de poder interagir intermolecularmente com as bases nitrogenadas, pode se acomodar nas fendas da dupla hélice. A interação é também auxiliada por fenômenos de solvatação, uma vez que as interações com a atmosfera iônica contribui para a interação (ROHS; SKLENAR, 2004; ZHAO *et al.*, 1999). Os fenômenos de solvatação e a geração uma atmosfera iônica podem causar a permeação do corante pela camada de peptidoglicano, culminando em possíveis danos no DNA (ROHS; SKLENAR, 2004).

Os resultados obtidos na inativação fotodinâmica de *S. aureus* (Figura 25) permitem estimar que a aplicação de concentrações superiores a  $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$  apresenta forte ação fototóxica no meio, e, desta forma, mostra que a aplicação *in vivo* de azul de metileno no controle de bactérias ou fungos, deva ser realizada em soluções ou veiculações próximas a estas concentrações. O uso de soluções diluídas de mesma concentração de cloreto de sódio, apesar de não alterarem a eficiência fotodinâmica do processo, reduz a ação citotóxica do azul de metileno, e, assim, reduz o efeito sinérgico entre esses dois fenômenos (fotodinâmico e citotóxico).

É interessante ressaltar que soluções o cloreto de sódio na presença de azul de metileno favorece a formação de auto-agregação do corante, e conseqüentemente suprimem em parte o efeito fotodinâmico. Mesmo assim, no sentido da normalização destes erros, todos os ensaios foram conduzidos em soro fisiológico, na tentativa de se reproduzir a força iônica dos fluidos corpóreos.

Os resultados referentes à inibição bacteriana mediante a presença e ausência de luz, são mostrados na Figura 25. As amostras foram irradiadas por 20 minutos.

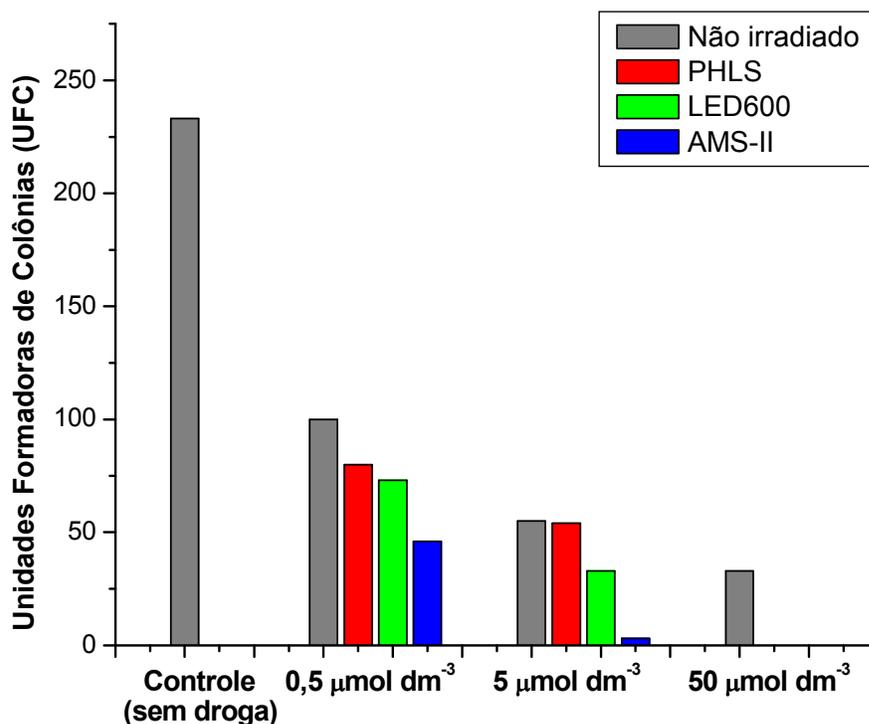


Figura 25: Contagem de bactérias após a fotoinativação. Três tipos de diferentes concentrações de azul de metileno foram avaliadas: 0,5, 5 e 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ . As amostras foram irradiadas por 20 minutos.

A inibição do crescimento bacteriano no escuro para a solução mais diluída (0,5  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ ), apresenta uma redução aproximada de 50% no número de unidades formadoras de colônias. Observa-se ainda que, quando a cultura bacteriana foi irradiada com o sistema AMS-II, ocorre uma inibição próxima a 50% das UFC se comparada ao controle mantido no escuro para aquela mesma concentração (efeito puramente citotóxico). Esses resultados sugerem que, efeitos sinérgicos (os fototóxicos e os citotóxicos) de grandezas similares estão presentes, o que resulta numa inibição final de 75% do crescimento bacteriano na solução mais diluída quando usado o sistema AMS-II.

Em todas as demais concentrações, o equipamento AMS-II apresenta fotoinativações superiores à 99%. Os demais equipamentos, LED600 e HPLS apresentaram também desempenhos satisfatórios em fotoinativações. Na concentração de 50  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , após a aplicação de luz, não se observou nenhuma formação de colônia. Portanto, todos os equipamentos descritos neste trabalho, operam de forma satisfatória na inibição do

crescimento de *Staphylococcus aureus in vitro*, e de modo especial em concentrações próximas à  $50 \mu\text{mol dm}^{-3}$ .

Os resultados obtidos na inativação fotodinâmica concordam proporcionalmente quando comparados aos resultados anteriores de fotooxidação de DPBF.

#### **4.6 Ensaios microbiológicos de *Trichophyton rubrum***

Os resultados da inibição do crescimento do *T. rubrum in vitro*, são mostrados na Figura 26. Observa-se que somente após a irradiação ocorre uma redução significativa no número de unidades formadoras de colônias. A eficiência observada pode ser atribuída não somente a fonte de irradiação, mas também ao efeito citotóxico do azul de metileno. As Figuras 27 e 28 a afinidade que o azul de metileno tem pelas hifas e esporos, respectivamente, do *Trichophyton rubrum*.

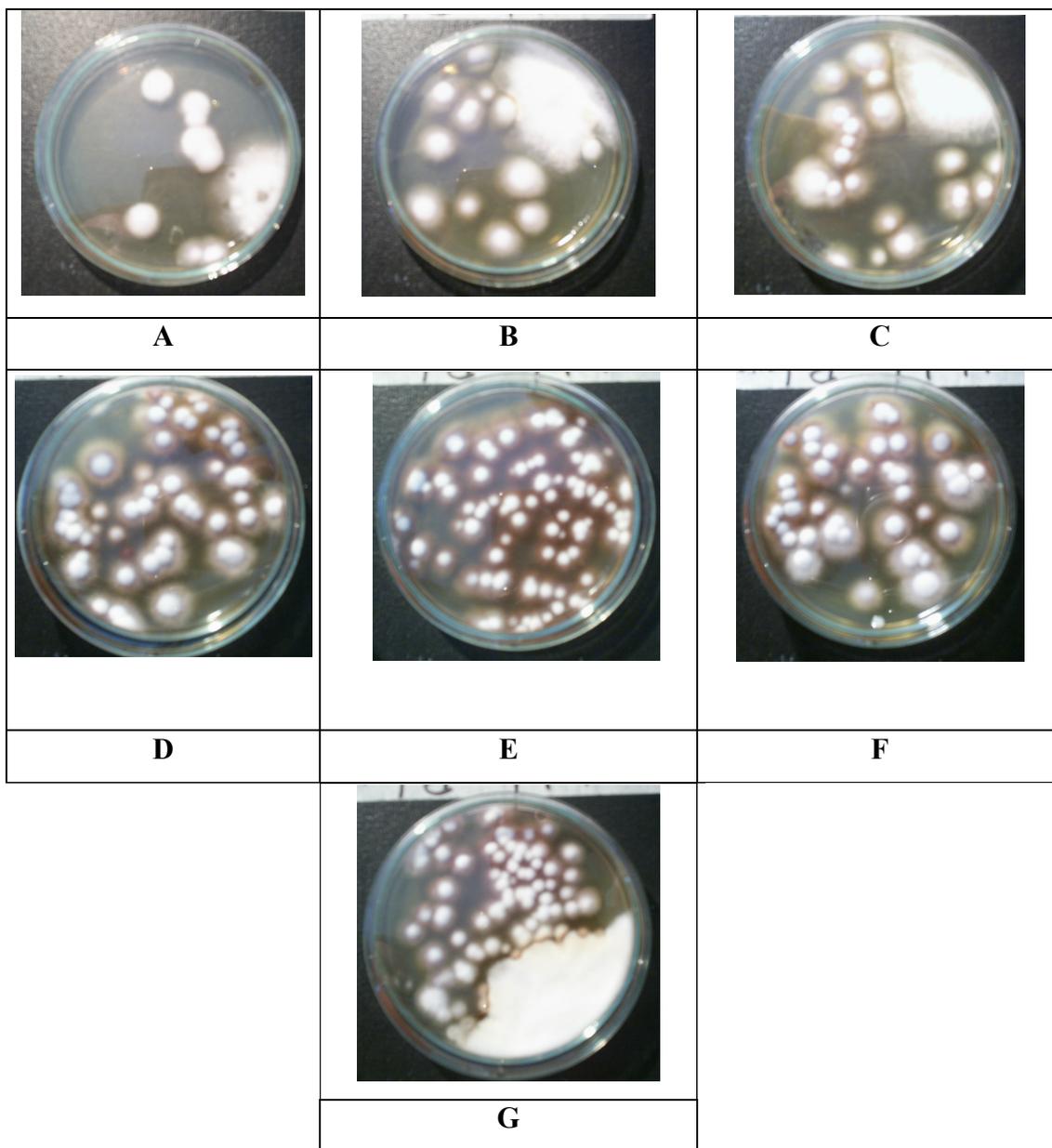


Figura 26: Crescimento de *T. rubrum*, em triplicata, após 14 dias. As placas (A), (B) e (C), foram irradiadas durante 20 minutos, sob concentração de azul de metileno  $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ; (D), (E) e (F) correspondem ao controle no escuro, sob concentração de azul de metileno  $500 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ; (G) é o controle geral que não recebeu luz nem fotossensibilizador.



Figura 27: Estrutura da hifa septada de *Trichophyton rubrum* obtida por microfotografia óptica, após a coloração com azul de metileno, pouca coloração é observada.

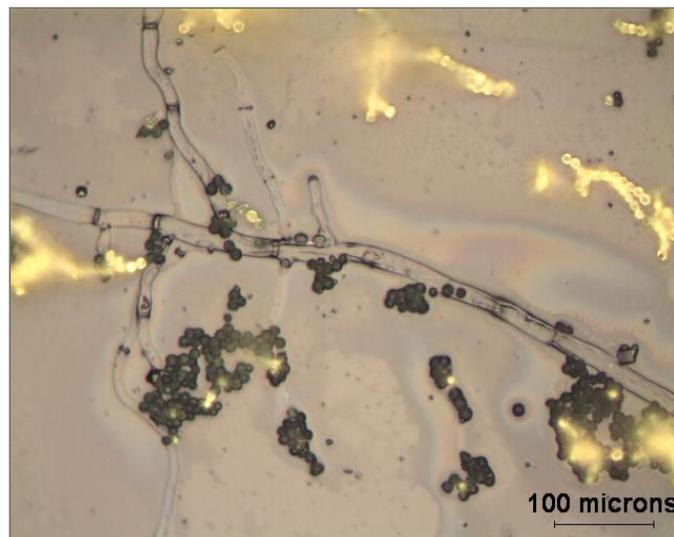


Figura 28: Microfotografia óptica com ênfase nos órgãos reprodutivos do *Trichophyton rubrum* após a coloração com azul de metileno. Forte coloração foi observada. A presença de estruturas reprodutivas não coradas serve como comparação e sobretudo como contraste, evidenciando a grande afinidade deste corante por essas estruturas.

Através das Figuras 27 e 28 é possível observar que o corante apresenta alta afinidade nos esporos e baixa aderência nas hifas, tornando-se, portanto, um excelente medicamento para inibir o crescimento do fungo após doses de irradiação. A alta coloração dos órgãos reprodutivos garante um alto potencial inibidor no crescimento fúngico,

tornando o fotosensibilizador bastante seletivo. A parte reprodutiva é a estrutura mais comprometida na fotoinativação, pois uma alta impregnação sugere uma grande concentração de azul de metileno. Como a área do fotoproceto normalmente fica em cerca de 10 à 50 nm, (MOAN, 1990; JORI, 1997) a fotooxidação da região mais pigmentada é máxima.

A fotoinativação de *Trichophyton rubrum* pode apresentar efeitos fungistáticos, ou fungicidas em virtude do fotossensibilizador (SMIJS *et al.*, 2003). O azul de metileno no entanto, apesar de exibir grande redução da fração fúngica local, é fungostático em relação a hifa, entretanto, é fungicida quando se analisa a parte reprodutora. Resultados obtidos da inativação de *Trichophyton rubrum* com azul de metileno *in vivo* obtido por outros pesquisadores, confirmam a ação fungicida (TARDIVO *et al.*, 2007a). Além disto, fenômenos puramente fungostáticos podem auxiliar o sistema imunológico a eliminar as frações remanescentes.

Observa-se que fármacos a base de Itraconazol atuam farmacologicamente destruindo a camada fúngica de ergosterol (MARICHAL *et al.*, 1999), assim, possivelmente a inativação fotodinâmica com azul de metileno em pacientes administrados com Itraconazol deva ser superior, uma vez que a baixa pigmentação das hifas pelo corante é também atribuída ao ergosterol na estrutura fúngica, que atua como barreira, impedindo a pigmentação do tecido fúngico.

A ação sinérgica sugerida acima não deve ser prevista em medicamentos como fluconazol, griseofulvina ou outros cuja farmacocinética indica a atuação em outros metabolismos do fungo, que não na destruição da barreira de ergosterol. Apesar de uma ação sinérgica não ser prevista, é possível que seja presenciada a ação de dois módulos terapêuticos distintos aumentando as chances de erradicação fúngica.

## **5. CONCLUSÃO**

Todos os equipamentos se mostraram capazes de gerar oxigênio singlete conforme visto nos resultados de descoloração de DPBF, na presença de azoteto de sódio, na fotoinativação de *Staphylococcus aureus* e de *Trychophyton rubrum*.

O estudo possibilita concluir que o equipamento que utiliza LED de alta potência apresentou o melhor rendimento na excitação do fotossensibilizador, e conseqüentemente, exibiu uma pronunciada geração de oxigênio singlete, conforme visto pela magnitude da cinética de descoloração do DPBF, valores de R e inibição de microorganismos. A razão para este melhor rendimento destes aparelhos se deve ao comprimento de onda mais próximo ao desejado, com intensidade apreciável. Já o sistema que utiliza lâmpada halógena filtrada apresenta baixas emissões fotônicas na região de 660 nm. Poderia-se utilizar outros filtros ópticos, visando um aprimoramento na excitação eletrônica desta.

A inativação de *Staphylococcus aureus* e *Trychophyton rubrum* se mostraram bastante satisfatórias e como conseqüência do sucesso dessa metodologia, iniciou-se um processo de aplicação dos equipamentos descritos na inativação *in vivo* de pacientes acometidos pela ação do *Trychophyton*.

A fotoinativação de *Trychophyton rubrum* mostra-se mais eficiente nas suas estruturas reprodutivas, o que tende a exibir resultados satisfatórios e progressivos na inibição do crescimento posterior do fungo, que pode ser também um protocolo complementar à terapêutica usual.

O circuito integrado (IRS2541) que possibilitou a ligação dos LED de alta potência em um sistema de ligação bivolt, mostra-se bastante simples, estável, e muito confiável, além disto, o sistema apresenta tamanho compacto, favorecendo conveniências na construção de um protótipo industrial.

O sistema que utilizou LED de alta potência mostrou ser mais adequados não só fotoquimicamente, mas também por serem eficientes, com baixo custo e fácil montagem.

## **6. REFERÊNCIAS**

ALMEIDA, J. M. *et al.* Estudo radiográfico de perda óssea alveolar em ratos tratados pela terapia fotodinâmica. **Periodontia**. Brasil, v. 16, n. 4, p. 34-40, 2006.

AULER, H.; BANZER, G. Untersuchungen ueber die rolle der porphine bei geschwulstkranken menschen und tieren. **Z. Krebsforsch**. German, v.53, p.65-73, 1943.

APODACA, G.; MCKERROW, J. H. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. **Infection and Immunity**. United States, v.57, n.10, p.3081-3090, Oct. 1989.

ARAÚJO, A. J. G. *et al.* Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v.78, n.3, p.299-308, 2003.

ARENAS. R. Las onicomicosis. Aspectos clínico-epidemiológicos y terapeuticos. **Gac. Méd. Mex.** México, v.126, p.84-89, 1990.

BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: an introduction. **J. of Appl. Bacteriol. Symposium Supplement**, 1S-8S.

BAKOS, R. M. *et al.* Terapêutica fotodinâmica com ácido delta-aminolevulínico em neoplasias queratinocíticas superficiais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v.78, n.2, p.197-207, 2003.

BELL, J. A.; MACGILLIVRAY, J. D. Photosensitized oxidation by singlet oxygen. An adapted photochemical system. **Journal of Chemical Education**. United States, v.51, n.10, p.677-679, 1974.

BEN-HUR, E.; ROSENTHAL. I. Photosensitized inactivation of chinese hamster cells by phthalocyanines. **Photochemistry and Photobiology**. United States, v.42, n.2, p.129-133, Aug. 1985.

BOEHNCKE, W.H. *et al.* Comparison of sensitivity towards photodynamic therapy of cutaneous resident and infiltrating cell types in vitro. **LASERS in Surgery and Medicine.** (S.I.), v.19, n.4, p.451-457, 1996.

BONACIN, J. A. *et al.* Singlet oxygen quantum yields ( $\phi_{\Delta}$ ) in water using beetroot extract and an array of LEDs. **Journal of the Brazilian Chemical Society.** Brasil, v. 20, n.1, p.31-36, 2009.

BORISOVA, E.; VLADIMIROV, B.; AVRAMOV, L. 5-ALA mediated fluorescence detection of gastrointestinal tumors. **Advances in Optical Technologies.** New York, 2008. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/aot/2008/862081.html>>. Acessado em: Set.2008.

BOYLE, R. W.; DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochemistry and Photobiology.** United States, v.64, n.3, p.469-485, Sep. 1996.

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

CAMPANHA, A. M.; TASCA, R. S.; SVIDZINSKI, T. I. E. Dermatômicoses: frequência, diagnóstico laboratorial e adesão de pacientes ao tratamento em um Sistema Público de Saúde, Maringá-PR, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy.** (S.I.), v.26, n.3, p.442-448, 2007.

CARMO, L. S. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology.** United States, v.19, p.9-14, 2002.

CARMO, L. S. **Produção e purificação das enterotoxinas estafilocócicas A, B, C e D.** 1997. 177f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CERVELATTI, E. P. *et al.* Electrophoretic molecular karyotype of the dermatophyte *Trichophyton Rubrum*. **Genetics and Molecular Biology**. United States, v.27, n.1, p.99-102, 2004.

CHARIF, M. A.; ELEWSKI, B. E. Prevalence of onychomycosis in the United States: results of a population based survey. In: INTERNATIONAL SUMMIT ON CUTANEOUS ANTIFUNGAL THERAPY PROGRAMME, May 1996, Vancouver.

CHEN, J. *et al.* New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. **The Cancer Journal**. United States, v.8, n.2, p.154-163, Mar. 2002.

CLEMENTS, A. **Principles of Computer Hardware**. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.

CONSULTA REMÉDIOS. Disponível em <<http://www.consultaremedios.com.br/>>. Acessado em: Ago. 2009.

Datasheet WP7113PR51 C/A. **Kingbright Corporation**, Ago. 2007. Disponível em:<<http://pdf1.alldatasheet.co.kr/datasheet-pdf/view/187795/KINGBRIGHT/WP7113PR51C/A.html>>. Acessado em: Set.2008.

DIOMED 630 PDT. Diomed Limited, 2000. Disponível em: <<http://www.optosolutions.com/doc/630PDT.pdf>>. Acessado em Dez.2009.

DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**. United States, v.90, p.889-905, 1998.

DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Research**. United States, v.38, p.2628-2635, 1978.

DOUGHERTY, T. J. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. **Photochemistry and photobiology**. United States, v.45, n.6, p.879-889, 1987.

EVANS, E. G.; SIGURGEIRSSON, B. Double blind, randomized study of continuous terbinafine compared with intermittent itraconazole in treatment of toenail onychomycosis. **The LION Study Group**. (S.I.), v.5, p.318-1031, 1999.

FOOTE, C. S. Photosensitized oxygenation and the role of singlet oxygen. **Acc. Chem. Res.** United States, v.1, p.104-105, 1979.

FREITAS, M. F. *et al.* Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp. Isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.56, n.3, p.405-407, 2004

GARETH – JONES, E. B. Fungal adhesion. **Mycological Research**. v.98, n.9, p.961-981, Sep. 1994.

GRAY, J. A. Onychomycosis new treatments are effective. **Clinician Reviews**. United States, v.12, n.9, p.7-8, 2002.

GROSSMAN, M.E. *et al.* Invasive *Trichophyton rubrum* infections in the immunocompromised host: report of three cases. **Journal of the American Academy Dermatology**. United States, v.33, p.315-318, 1995.

GUPTA, A. K.; SKINNER, A. R. Onychomycosis in children: a brief overview with treatment strategies. **Pediatric dermatology**. United States, v.21, n.1, p.74-79, 2004.

FISCHER, H.; HILMER, H.; LINDNER, F.; PUTZER, B. Chemische Befunde bei einem Fall von Porphyrinurie (Petry). **Ztschr. f. Physiol. Chem. German**, v.150, p.44, 1925.

HARBOUR, J. R.; ISSLER, S. L. Involvement of the azide radical in the quenching of singlet oxygen by azide anion in water. **Journal of the American Chemical Society**. United States, v.104, n.3, p.903-905, Feb. 1982.

HAUSMAN, W. Die sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. **Biochem. Z. German**, v.30, p.276-316, 1911.

HEIKKILÄ, H.; STUBB, S. The prevalence of onychomycosis in Finland. **British Journal of Dermatology**. London, v.133, n.5, p.699-703, Jul. 2006.

HENNEQUIN, C. *et al.* Onychomycosis in children. **Medical Mycology**. United States, v.6, p.186-189, 1996.

IGARASHI, H. *et al.* Latex agglutination test for staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1. **J. Clin. Microbiol.** United States, v.23, p.509-512, 1986.

JORI, G. Novel therapeutic modalities based on photosensitized process. **EPA Newsletter**. United Kingdom, v.60, p. 12-19, 1997.

JUZENIENE, A. *et al.* Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **LASERs in Medical Science**. (S.I.), v.19, n.3, p.139-149, Dec. 2004.

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

KOSTRON, H. *Photodynamic applications in neurosurgery*. In: *PATRICE, Thierry (Ed.). Photodynamic Therapy*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. cap. 10, p.213-241.

LI, W. -Y.; XU, J. -G.; HE, X. -W. Characterization of the binding of methylene blue to DNA by spectroscopic methods. **Analytical letters**. Filadélfia, v.33, n.12, p.2453-2464, 2000.

LIMA, J. C. **Ocorrência de Staphylococcus sp. em ambiente hospitalar, caracterização de superfícies e adesão de Staphylococcus aureus em sondas nasoenterais de poliuretano e silicone**. 2007. 145 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viscosa, Viscosa.

LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; OLSEN, A. M. The use of a derivative of Hematoporphyrin in tumor detection. **Journal of the National Cancer Institute**. United States, v.26, n.1, p.1-8, Jan.1961.

LUSTIG, R. A. *et al.* A multicenter phase I safety study of intratumor photoactivation of talaporfín sodium in patients with refractory solid tumors. **Cancer**. United States, v.98, n.8, p.1767-1771, Jul. 2003.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**. (S.I.), v.23, n.2, p.237-244, Mar. 2000.

MARICHAL, P. *et al.* Accumulation of 3-Ketosteroids induced by itraconazole inazole-resistant clinical *Candida albicans* isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.** United States, v.43, n.11, p.2663-2670, 1999.

MELO, G. B. *et al.* Analysis of the genetic diversity of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology**. Brazil, v.36, p.126-130, 2005.

MEYER-BETZ, F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivate des Blut und Gallenfarbstoffs. **Dtsch. Arch. Klin. Med.** German, v. 112, p. 476-503, 1913.

MOAN, J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. **Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology.** Norway, v.6, n.3, p.343-344, 1990.

MOAN, J.; PENG, Q. *An outline of the history of PDT. In: PATRICE, Thierry (Ed.). Photodynamic Therapy. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. cap.1, p.1-19.*

NEVES, M.C. *et al.* Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus spp.* **Arquivos do Instituto Biológico.** (S.I.), v. 47, p.207-213, 2007.

OUF, S. A. *et al.* Study of solar photosensitization processes on dermatophytic fungi. **Acta Microbiologica Polonica.** Poland, v.52, n.1, p.65-79, 2003.

PATRICE, T. *Factors in the stabilishment and spread of photodynamic therapy. In: PATRICE, Thierry (Ed.). Photodynamic Therapy. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003. cap. 13, p.273-283.*

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microorganismos. **Química Nova.** (S.I.), v.30, n.4, p.988-994, Jul. 2007.

PHIL – Public Health Image Library. Disponível em <<http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>>. Acessado em: Dez. 2009.

PIESLINGER, A. *et al.* Characterization of a simple and homogeneous irradiation device based on light-emitting diodes: A possible low-cost supplement to conventional

light sources for photodynamic treatment. **Medical LASER Application**. Germany, v.21, n.4, p.277-285, Nov. 2006.

POLICARD, A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinées a la lumière de Wood. **Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie**. Paris, v.91, p.1423-1424, 1924.

PROFIO, A. E.; DOIRON, D. R. Dosimetry Considerations in Phototherapy. **Medical Physics**. (S.I.), v.8, p.190–198, 1981.

RAAB, O. Uber die Wirkung, fluorescirender Stoffe auf infusorien. **Zeitschrift für Biologie**. German, v.39, p.524-546, 1900.

RASHID, A. Arthroconidia as vectors of dermatophytosis. **Cutis**. v.67, suppl.5, p.23, May 2001.

RATIOPHARM – Folheto informativo do fluconazol. Disponível em <[http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=34322&tipo\\_doc=fi](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=34322&tipo_doc=fi)>. Acessado em: Ago. 2009.

ROBERTS, D.T. Prevalence of dermatophyte onychomycosis in the United Kingdom: results of an omnibus survey. **British Journal of Dermatology**. London, v.126, suppl.39, p.23-27, Feb. 1992.

ROHS, R.; SKLENAR, H. Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: minor groove binding is favored over intercalation. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v.21, n.5, p. 699-711, 2004.

ROSENTHAL, I. Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. **Photochemistry and Photobiology**. United States, v.53, n.6, p.859-870, Jun. 1991.

RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Onicomiose na infância: uma perspectiva atual com ênfase na revisão do tratamento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro, v.79, n.2, p.225-232, Mar. 2004.

RUTHERFORD, T.; THOMPSON, G. G.; MOORE, M. R. Heme biosynthesis in Friend erythroleukemia cells: Control by ferrochelatase. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v.76, n.2, p.833-836, Feb. 1979.

SALVAT, C. G. *et al.* Tiña inflamatoria diseminada: presentación inusual. **Revista IBEROAMERICANA de Micologia**. Venezuela, v.15, p.100-102, 1998.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Medicina e Patologia Laboratorial**. (S.I.), v.43, p.413-423, 2007.

SCHERER, H. Chemical-physiological investigations. *Ann. d. Chem. u. Pharm.* Paris, v.40, p.1-64, 1841.

SHIKOWITZ, M. J. *et al.* Efficacy of DHE photodynamic therapy for respiratory papillomatosis: immediate and long-term results. **Laryngoscope**. United States, v.108, n.7, p.962-967, 1998.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**. (S.I.), v.25, n.5, p.801-807, Set. 2002.

SMIJS, T. G. M.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic Inactivation of the Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Photochemistry and photobiology**. United States, v. 77, p. 556, 2003.

SPIKES, J. D. Photosensitization. In: SMITH, K. S. (Ed.). **The Science of Photobiology Photosensitization**. New York: Plenum Press, 1989, p.79-110.

SPIKES, J. D. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. **Photochemistry and Photobiology**. United States, v.43, n.6, p.691-699, Jun. 1986.

SPIKES, J. D. The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences. In: BENSASSON, R. V. *et al.* (Eds.). **Primary Photoprocesses in Biology and Medicine**. N. Y.: Plenum Press, 1985. p.209-227.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**. (S.I.), v.54, n.17, p.4151-4202, Apr. 1998.

TARDIVO, J. P. *et al.* Desenvolvimento do RL 50: uma fonte de radiação luminosa e barata para Terapia Fotodinâmica. **Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia**. (S.I.), v.18, p.21-28, 2002.

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

TARDIVO, J. P. *et al.* In: II Workshop "Terapia Fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área da Saúde, 2007a, São Pedro – SP. **Anais do II Workshop em Terapia Fotodinâmica**, p.77-78

TARDIVO, J. P. *et al.* Terapia Fotodinâmica em Onicomicoses com Fenotiazínicos e RL-50. **Jornal Brasileiro de LASER**. (S.I.), v.1, n.4, p.28-31, Out. 2007b.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos**. São Paulo: Artmed, 2001.

**Technical Datasheet DS45.** PHILLIPS LUMILEDS LIGHTING COMPANY, **Marc. 2006.** Disponível em: < <http://www.philipslumileds.com/pdfs/DS45.pdf>>. Acessado em: Set.2008.

TSUBOI, R. *et al.* Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. **Infection and Immunity.** United States, v.57, n.11, p.3479-3483, Nov. 1989.

Universal Input (90 VAC – 265 VAC) LED Driver using IRS2541. **International Rectifier**, Dec. 2007. Disponível em: < <http://www.irf.com/technical-info/appnotes/an-1131.pdf> > . Acessado em: Nov. 2009.

VIA, L. V.; MAGNO, S. M., Photochemotherapy in Treatment of Cancer. **Current Medicinal Chemistry.** Emirados Árabes Unidos, v. 8, n.12, p.1405-1418, Fev. 2001.

VISULAS 690 Plus. Carl Zeiss Inc. Disponível em: < [http://www.zeiss.com/88256DE3007B916B/0/88B05632E2CAAB5AC12572CA003FE2F7/\\$file/visulas\\_690plus\\_engl\\_last.pdf](http://www.zeiss.com/88256DE3007B916B/0/88B05632E2CAAB5AC12572CA003FE2F7/$file/visulas_690plus_engl_last.pdf)>. Acessado em Dez.2009

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Reviews.** United States, v.8, n.3, p. 317-335, Jul. 1995.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews,** United States, v.8, n.2, p.240-259, Apr. 1995.

YAO, P. *et al.* Structures and spectroscopic properties of meso-tetrasubstituted porphyrin complexes: Meso-substitutional and central metallic effect study based on density functional theory calculations. **Vibrational Spectroscopy.** (S.I.), v.50, n.2, p.169-177, Jul. 2009.

YOUNG, R. H.; BREWER, D.; KELLER, R. A. Determination of rate constants of reaction and lifetimes of singlet oxygen in solution by a flash photolysis technique. **Journal of the American Chemical Society**. United States, v.95, n.2, p.375-379, Jan. 1973.

ZHAO, G. -H. *et al.* Voltammetric studies of the interaction of methylene blue with DNA by means of  $\beta$ -cyclodextrin. **Analytical Chimica Acta**. v.394, n.2-3, p. 337-344, 1999.

ZHENG-HUANG, M. D. A review of progress in clinical Photodynamic Therapy. **Technol. Cancer Res. Treat.** United States, v.4, n.3, p.283-293, 2005.

## **7. PROPOSTA DE PESQUISAS FUTURAS**

Conforme já iniciado, pretende-se submeter ao comitê de ética um protocolo que permita a aplicação do sistema de irradiação desenvolvido no tratamento de casos clínicos confirmados de onicomicose. A avaliação da concentração adequada, dose, combinação e veiculação de drogas visando maximizar o efeito também são parâmetros interessantes.

Trabalhos futuros poderiam comparar a eficiência das fontes desenvolvidas na inativação fotodinâmica de outras moléstias, principalmente dermatoses, em função de sua aplicação ser mais simples.

Fontes pulsadas também são interessantes para as aplicações, estudos subsequentes poderiam avaliar o efeito de luz pulsada de LED sobre a eficiência fotodinâmica nos microorganismos. Alguns microcontroladores fabricados pela empresa Atmel permitem a obtenção de pulsos com frequências de chaveamento na faixa de MHz ou GHz.

Uma pesquisa *in vivo* bastante simples e interessante é a aplicação de luz de LED na inativação de *Propionibacterium acnes*, uma vez que a própria bactéria já produz em seu metabolismo a Coproporfirina III, um fotossensibilizador ativado na região do azul, próximo a 417 nm.

A síntese de novos fotossensibilizadores também sempre são alvos interessantes de pesquisa, haja vista que muitas apresentam problemas de permeação nos tecidos orgânicos, ou problemas de solubilidade, ou mesmo apresentam pouco rendimento quântico de geração de oxigênio singlete.

Por fim, como o enfoque trata de sistemas de irradiação, sistemas LASER que apresentassem relativo custo benefício são também bastante apreciáveis em países como o Brasil, haja vista que os fabricantes que trabalham com esta tecnologia, normalmente apresentam produtos de altíssimo valor agregado.

## **8. APÊNDICE**

**10.1 Apêndice A – Protocolo para submissão ao comitê de Ética para pesquisa em seres humanos.**

## **Projeto de Pesquisa**

**Desenvolvimento e caracterização *in vivo/in vitro* de uma fonte luminosa aplicada ao combate de dermatoses através da Terapia Fotodinâmica**

Uberlândia, XX de XXXXXX de XXXX (data de envio)

## **1 Antecedentes, Justificativas, Registro**

### *Terapia Fotodinâmica*

Terapia fotodinâmica (TFD) é uma nova modalidade no tratamento de diversas moléstias como o Câncer, Degeneração Macular da Retina, Psoríase, Artrite reumatóide, Restenose, micose fungóide, infecções bacterianas, Verruga vulgar, Arteriosclerose, AIDS e Herpes simplex.<sup>1,2,3</sup>

A terapia fotodinâmica parte de uma combinação entre luz de um comprimento de onda específico, um composto atóxico, também chamado de fotossensibilizador e oxigênio molecular, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio capazes de induzirem a inviabilização de determinadas células.<sup>4</sup>

Diversos estudos são realizados na tentativa de síntese, caracterização e aplicação de drogas mais eficientes, visando aplicações em diversas modalidades clínicas.<sup>5</sup>

No tocante a fontes de irradiação empregadas em TFD, o intervalo do espectro eletromagnético mais significativo está na região entre 600 e 800 nm, onde a membrana celular apresenta baixa absorvidade. Nesta região é possível magnitudes na penetração da luz próximas a 3 centímetros em tecidos dotados de baixa pigmentação<sup>6</sup>. Deste modo é possível evitar destruições desnecessárias causadas às demais organelas presentes no meio que não possui a droga sensibilizadora.<sup>6</sup>

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 fotossensibilizadores. Esse tipo de sistema,

infelizmente, exibe um aquecimento relevante, dificilmente permite um controle preciso na dosagem de luz, e normalmente apresenta baixa intensidade luminosa<sup>7</sup>. 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. Os LED além de constituírem uma alternativa de baixo custo, possuem grande homogeneidade luminosa<sup>8</sup>, 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 de 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<sup>8,9</sup>.

Juzeniene *et al*<sup>9</sup>, realizaram um estudo comparativo *in vivo* entre sistemas de irradiação de 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<sup>10</sup>. Essa sonda,

pequena e flexível, emite luz permitindo baixíssimas invasões aos demais tecidos. Neste sistema o cateter pode ser introduzido em tumores percutâneos<sup>11,12</sup>.

Atualmente, espécies reativas de oxigênio geradas na TFD são ativadas principalmente por LASER. As vantagens do LASER reside no caráter da luz monocromática e na alta intensidade obtida nesse dispositivo<sup>7</sup>. Entretanto, a coerência de um LASER não é necessária em aplicações na TFD<sup>9,13</sup>. Esse fator, justifica a construção de fontes não-coerentes, as quais são normalmente muito mais acessíveis, estáveis e versáteis.

Na dermatologia, esse procedimento é aplicado em algumas regiões do território nacional, bem como no exterior, exibindo resultados promissores. No tocante a aplicações tópicas, a TFD mostra-se interessante no caso da remissão de melanomas, no tratamento de onicomicose, minimização de surtos do vírus da herpes simplex, e diversas outras moléstias cujo tratamento convencional mostra-se ainda pouco eficiente<sup>1</sup>.

### Onicomicose

A onicomicose é uma infecção que atinge as unhas, causada por fungos, correspondendo a cerca de 50% das queixas relacionadas à problemas de unhas. A infecção total normalmente gera espessamento, descoloração, opacificação, distrofia ungueal, podendo inclusive alterar a estrutura da unha<sup>14</sup>.

Esse tipo de micose foi escolhida dentre eventuais outras dermatoses por constituir uma infecção de alta frequência nos adultos: no Reino Unido tem-se constatado uma prevalência da moléstia em 3% da população de adultos<sup>15</sup>; a prevalência na Finlândia atinge cerca de 8%<sup>16</sup>; um estudo realizado nos Estados Unidos demonstra que a parcela afetada chega a valores próximos a 18,5%<sup>17</sup>. No Brasil, recentemente, uma estatística realizada na

cidade do Rio de Janeiro revelou a presença da micose em 19,35% da população<sup>18</sup>. O maior número de casos na América Latina talvez esteja associado aos fatores climáticos e socioeconômicos<sup>19</sup>.

Além de causar impacto negativo na qualidade de vida<sup>20</sup>, os casos de onicomicose costumam apresentar pronunciada resistência ao tratamento convencional. No tratamento convencional emprega-se drogas antimicóticas tópicas ou sistêmicas. Dentre as drogas sistêmicas destacam-se o fluconazol, itraconazol, terbinafina e a griseofulvina (principalmente em crianças)<sup>2,16</sup>. A medicação tópica envolve o uso de ciclopiroxolamina 8%, amorolfina 5% e uréia 40% com bifonazol 1%<sup>19,21</sup>.

O agente dermatófito mais comum, o *Trichophyton rubrum*, é responsável por cerca de 69-92,7% dos casos, quanto ao segundo agente, a literatura é um pouco confusa, variando entre o *T. tonsurans* e o *T. mentagrophytes var interdigitale*<sup>16,22,23</sup>. As drogas sistêmicas apresentam algumas desvantagens como a possibilidade de indução a reações hepatobiliares moderadas à severas, baixo espectro de atividade, possíveis interações medicamentosas. Durante o percurso do tratamento, podem ocorrer recidivas, que normalmente tornam o tratamento extenso, muitas vezes cansativo e oneroso ao paciente<sup>24</sup>. O tratamento tópico é frequentemente ineficaz na eliminação total da infecção<sup>25</sup>.

O custo do tratamento está em função do tempo de remissão. Nos casos mais comuns fica em torno de 6-12 meses nas incidências relativas à onicomicose nos pés, podendo ser mais ou menos longo em função de sua gravidade<sup>26</sup>. O tratamento contínuo por Fluconazol 150mg/semana ou Terbinafina 250mg/dia, resulta no custo médio de R\$ 100,00/mês<sup>27</sup>. Tomando por exemplo uma administração de Itraconazol, via tratamento contínuo, dose 200mg/dia, o custo mensal aproxima-se de R\$ 300,00<sup>28</sup>. A administração de

Terbinafina, em alguns casos, tende a apresentar melhoras nos quadros clínicos mais rapidamente, quando comparadas às demais<sup>29,30</sup>.

### Objetivo Geral

Um dos maiores obstáculos relativo à disponibilização da terapia fotodinâmica frente à sociedade está no custo atribuído às fontes de irradiação luminosas e da droga fotossensibilizadora. O objetivo geral do presente trabalho é a redução de custos na TFD.

### Objetivos Específicos e Fotossensibilizadores

A presente proposta visa a confecção de uma fonte de luz potente e de baixo custo, empregando LED: semicondutores que se mostram promissores não somente pelo baixo custo associado, mas bem como por apresentarem diversas propriedades opto-mecânicas convenientes (e.g., monocromaticidade, robusteza, durabilidade). O uso de corantes fenotiazínicos, como o azul de metileno e o azul de toluidina, serão aplicados como alternativa ao uso de drogas mais onerosas, sem grandes perdas ao processo, conforme demonstrado por diversos pesquisadores, inclusive do âmbito nacional. Como controle, será empregada uma droga padrão: o ácido aminolevulínico (ALA), cuja aplicação em terapia fotodinâmica já é liberada pelo FDA e pela ANVISA, o qual apresenta o parecer favorável desde o ano de 2002. O registro foi concedido pela ANVISA através da resolução RE nº 376, processo nº 25351.015079/01-97, datado em 04 março de 2002. Atualmente o produto é comercializado pelos Laboratórios Stiefel, sob o nome comercial de Levulan Kerastick<sup>®</sup>,

liberado pelo processo 25351.150742/2006-20, publicado no suplemento ao nº 198 do DOU de 16.10.2006.

O corante Azul de Metileno (AM), em uso tópico, já está inserido dentre os medicamentos pertencentes à farmacopéia brasileira. A isenção de registro do medicamento é disposta e liberada conforme a legislação atual<sup>31</sup>. O medicamento para uso tópico é principalmente empregado como anti-séptico<sup>32,33</sup>.

Entretanto, o uso do medicamento não é somente limitado a aplicações tópicas, pois, observa-se que o azul de metileno parece ser o medicamento de maior eficiência no tratamento da metemoglobinemia<sup>34</sup> (condição hereditária na qual o ferro presente na hemoglobina torna-se incapaz de executar o transporte de oxigênio). Nestas situações o medicamento é administrado, via intravenosa, normalmente em dose única de 1-2 mg/Kg<sup>35,36</sup>.

O azul de metileno, por sua característica catiônica, apesar de corar eficientemente as células, normalmente apresenta baixa capacidade de permeação no tecido epitelial. Deste modo, as aplicações do AM em terapia fotodinâmica são mais difundidas no âmbito dermatológico. A literatura aponta diversos trabalhos que evidenciam resultados bastante satisfatórios nas aplicações tópicas da terapia fotodinâmica com azul de metileno<sup>2,3,37,38,39</sup>.

A busca no aumento da eficiência desses sistemas, também é alvo de diversas pesquisas. Por exemplo, a combinação entre azul de metileno e azul de toluidina possivelmente tende a aumentar o desempenho do tratamento, uma vez que se promove uma coloração do exterior e interior das células do agente dermatófito, conferindo um tingimento mais eficiente<sup>40</sup>.

O azul de toluidina, solução 1%, é amplamente empregado em exames citopatológicos e anatomopatológicos, na determinação de tumores. Apesar de não ser

específico para células neoplásicas, o teste do azul de toluidina, é bastante empregado, proporcionando uma interessante ferramenta para diagnóstico preliminar<sup>41</sup>. No tocante a TFD, o azul de toluidina aplicado na ausência de misturas, também exerce atividade fotodinâmica favorável<sup>42</sup>.

A ficha de segurança do azul de toluidina demonstra também sua característica atóxica, principalmente quando aplicada topicamente<sup>43</sup>.

Desta forma, em resumo, os três objetivos específicos do presente trabalho são:

- a) Aferir a eficiência de uma nova fonte de luz: disponibilizar um equipamento robusto e econômico, mais eficiente de que os presentes no mercado (normalmente apresentam pouca intensidade), aquecimento reduzido (o aquecimento é um problema muito comum quando se substitui o LASER como fonte de luz);
- b) Aplicação comparativa in vivo entre o ALA e o azul de metileno/azul de toluidina: Visando observar a eficiência na resposta ao tratamento entre as duas drogas em determinadas dermatoses. Também está previsto a elaboração de um protocolo médico mais eficiente.
- c) Utilizar o ALA sintetizado no laboratório, em pureza apropriada, isento de eventuais elementos traços nocivos, conforme a exigência legislativa: Esse objetivo tem por natureza a busca de formas mais eficientes e econômicas na síntese da droga - buscando metodologias que proponham maiores rendimentos e/ou rotas sintéticas mais viáveis.

Os objetivos de redução de custos, podem ser melhor observados, por uma comparação ao valor comercial das drogas supracitadas: azul de metileno, solução 1%, frasco com 30 mL, possui valor médio em R\$ 3,00. Valores não distantes são encontrados para o azul de toluidina. Contudo, o ALA apresenta custo médio aproximado em R\$ 1.600,00, normalmente disposto em embalagens com quatro ampolas de 1,5 mL.

Pretende-se realizar ensaios *in vivo* no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia para casos clínicos de onicomicose. As aplicações dermatológicas serão realizadas através do Dr. José Joaquim Rodrigues, membro da equipe de dermatologia do Hospital de Clínicas de Uberlândia. Todas as aplicações visam estudos progressivos dos três objetivos propostos.

## **2 Material e Métodos, Casuística, Resultados Esperados e Bibliografia**

### 2.1- Material e Métodos

#### Material Utilizado:

Azul de metileno P.A.

Azul de toluidina P.A.

Cloreto de ácido aminolevulínico P.A.

Algodão hidrófilo, tipo bola, cor branca; ou hastes flexíveis algodonizadas.

Álcool etílico 70° INPM

Água deionizada;

Propilenoglicol

Ácido oleico

Removedor de esmalte;

Fonte de irradiação

Formulações do fotossensibilizador:

Azul de metileno 2,5% e azul de toluidina 2,5%<sup>45,46</sup>: num balão de 10 mL, dissolver em água destilada/deionizada 0,25g de azul de metileno P.A. e 0,25g de azul de toluidina. Completar o volume do balão.

Solução de ALA<sup>47</sup>: num béquer de 1mL, adicionar 20mg de cloreto de ácido aminolevulínico P.A., e completar a massa de 1g com solução de ácido oléico (10% p/p) em propilenoglicol.

#### Metodologia:

O esmalte que eventualmente possa ser encontrado em unhas acometidas, será removido, para uma melhor aplicação e eficiência do protocolo. O paciente será orientado previamente sobre essa necessidade. Na ausência de esmalte, será realizada uma limpeza do local por meio de solução de álcool etílico 70 % (p/p) embebido em algodão hidrófilo.

Será tomado um registro visual da unha infectada de cada paciente: toda seção é amostrada fotograficamente. Esse arquivo possibilita aferição e comprovação da eficiência e/ou progresso do protocolo.

Será aplicado o fotossensibilizador, previamente formulado, na lâmina, no leito ungueal, e em seu respectivo interstício. A aplicação é realizada com algodão hidrófilo, ou hastes flexíveis algodonizadas, dispensando o uso de equipamentos mais complexos ou delicados, como seringas. A aplicação é realizada até que a região alvo assimile bem o fotossensibilizador: no caso do azul de metileno/azul de toluidina. Isso pode ser visto pela coloração escura da região. Posteriormente a área afetada deve repousar por cerca de 10-15 minutos, visando uma permeação/assimilação mais eficiente do corante pelo tecido afetado.

Após o repouso, deverá se irradiar a unha acometida por um período não superior a 25 minutos (serão estudado tempos de 10, 15, 20, e 25 minutos). O tempo de aplicação será estudado de forma a se obter um ponto otimizado de maior eficiência/rapidez na seção. Durante esse tempo os pacientes poderão ouvir música erudita ou assistir a filmes diversos. Finalizada a aplicação, o paciente é liberado.

As seções se repetirão num intervalo entre 25 dias, até que se obtenha remissões significativas, ou exceda um limite de 6 aplicações sem resultados satisfatórios.

## 2.2- Casuística

Recentemente, Tardivo *et al*<sup>2</sup> num estudo preliminar empregando irradiação por luz policromática filtrada e azul de metileno e azul de toluidina, demonstrou uma eficiência de 85,48% dos pacientes abordados, sem toxicidade.

Aplicações com azul de metileno, envolvendo princípios de sensibilização na inibição do crescimento de diversos fungos foram apreciados por pesquisadores poloneses<sup>46</sup>.

Em casos de líquen plano oral (LPO) a terapia fotodinâmica se mostra simples e eficiente: o procedimento envolve bochecho de uma solução aquosa 5% de azul de metileno, durante 5 minutos. Posteriormente, a região afetada é irradiada com LASER vermelho<sup>45</sup>.

Similarmente ao azul de metileno, o azul de toluidina é também amplamente empregado em TFD, principalmente em doenças relacionadas ao âmbito odontológico, inativação de bactérias, etc<sup>46, 48, 49</sup>.

Também são observados diversos estudos do potencial fungicida na TFD, aplicando-se ALA, inclusive em casos de inibição e controle do *Trichophyton rubrum*<sup>47</sup>. Atualmente, um estudo mostra aplicações de ALA em sistemas para entrega de drogas (*drug delivery*), no qual a droga é contida em adesivos, os quais, distribuem gradualmente o composto pela unha<sup>50</sup>.

### 2.3- Resultados Esperados

Espera-se uma redução de custos na terapia fotodinâmica, que hoje se mostra tão promissora em diversas modalidades clínicas. Essa redução de custos deve ocorrer em função da elaboração de um novo equipamento e do uso de drogas mais acessíveis. A população brasileira muitas vezes desconhece essas terapias em virtude de sua baixa acessibilidade. O presente trabalho, em seu objetivo filosófico, visa a viabilização da terapia fotodinâmica ao povo brasileiro.

### 2.4- Bibliografia

- [1] Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N.; *Química Nova*. 2002, 25(5).
- [2] Tardivo, J. P.; Petri, V.; Bonetti, T. I.; Oliveira, L. S.; Baptista, M. S.; *Jornal Brasileiro de LASER*. 2007, 28-31.
- [3] Câmara, F. P.; Elias, C. A.; *An. Brasil. Derm.* 1978, 53:437.
- [4] Machado, A. E. H.; *Química Nova*. 2000, 23(2):237-242
- [5] Soares, R. R. S., Estudo de propriedades da clorofila a e da feofitina a visando a terapia fotodinâmica. 2006 – Dissertação de mestrado.
- [6] Levy, J.G.- Photodynamic therapy. *J. Trends in Biotechnology*. v. 1, p.14-18, 1995.
- [7] Zheng Huang, M.D., *Technol Cancer Res Treat*. 2005, 4(3): 283–293.
- [8] Pieslinger, A.; Plaetzer, K.; Oberdanner, C. B.; Berlanda, J.; Mair, H.; Krammer, B.; Kiesslich, T.; *Medical LASER Application* 21(4):277-283, 2006
- [9] Juzeniene A, Juzenas P, Ma LW, Iani V, Moan J. *LASERs Med Sci*. 2004;19(3):139-49.

- [10] Schmidt M. H.; Bajic D. M.; Reichert K. W.; Martin T. S.; Meyer G. A.; Whelan H. T.; Hill J. S.; Kaye A. H.; Muller P. J.; Origitano T. C.; *Neurosurgery*. 1996, 38(3):552-557
- [11] Lustig, R. A.; Vogl, T.J.; Fromm, D.; Cuenca, R.; His, A.R.; D'Cruz, A.K.; Krajina, Z.; Turic, M.; Singhal, A.; Chen, J.C.; *Cancer*. 2003;98:1767–1771.
- [12] Chen, J.; Keltner, L.; Christophersen, J.; Zheng, F.; Krouse, M.; Singhal, A.; Wang, S.S.; *Cancer J*. 2002;8:154–163.
- [13] Boehncke, W.H.; Rück, A.; Naumann, J.; Sterry, W.; Kaufmann, R.; *LASERs Surg Med*. 1996, 19:451-457.
- [14] Gray, J.A.; *Clinican Reviews* 12(9):7-88, 2002
- [15] Roberts, D. T.; *Br. J. Dermatol*. 126 (39): 23-7, 1992
- [16] Heikkilä, H.; Stubb, S. *Br. J. Dermatol*. 133: 699-703, 1995
- [17] Charif, M. A.; Elewski, B. E.; Prevalence of onychomycosis in the United States: results of a population based survey. Presented at the 1996 Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Washington DC, May, 1996.
- [18] Araújo, A. J. G.; Bastos, O. M. P.; Souza, M. A. J.; Oliveira, J. C. *An. Bras. Dermatol*. 78(3):299-308, 2003.
- [19] Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R.; Rodríguez-Álvarez, M.; Monroy, E.; Fernandez, R. F.; *Gac. Med. Mex*. 139(3):215-20
- [20] Drake, L. A. *J. Am. Podiatry Med. Assoc*. 87: 507-11, 1997
- [21] Gupta, A. K.; Skinner, A. R.; *Pediatr. Dermatol*. 21(1):74-9, 2004
- [22] Hennequin, C.; Bodemer, C.; Teillac, D.; De Prost, Y.; *J. Mycol. Med*. 6:186-9, 1996
- [23] Arenas, R.; *Gac. Méd. Mex*. 126:84-9, 1990
- [24] Campanha, A. M.; Tasca, R. S.; Svidzinski, T. I. E.; *Lat. Am. J. Pharm*. 26(3):442-8, 2007

- [25] Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R.; *An. Bras. Dermatol.* 79(2):225-232, 2004
- [26] Folheto informativo do fluconazol ratiopharm, disponível em:  
[http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=34322&tipo\\_doc=fi](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=34322&tipo_doc=fi)
- [27]<http://www.consultaremedios.com.br/cr.php?uf=SP&tp=nome&nome=cloridrato%20de%20terbinafina>
- [28] <http://www.consultaremedios.com.br/cr.php?uf=SP&tp=nome&nome=itraconazol>
- [29] Evans EG, Sigurgeirsson B.; *The LION Study Group.* 318:1031-5, 1999
- [30] Ouf, S.A.; Abdel-Kader, M.H.; Shokeir, H.A.; El-Adly, A.A.; *Acta Microbiol. Pol.* 52(1):65-79, 2003
- [31] Resolução-RDC/ANVISA nº 23, de 6 dezembro de 1999 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- [32] Farmacopéia brasileira 2ª Ed. 1959 – pág. 119
- [33] Martindale, 32ª Ed. 1999 – pág 985.
- [34] Krol J - *Cahiers D'Anesthésiologie* 17: 333-334, 1968.
- [35] Ramos, F. C. A. C.; Cunha, M. P. S. L.; *An. Bras. Dermatol.* 57 (1): 45-46, 1982.
- [36] Bucarechi, F.; Miglioli, L.; Bacarat, E. C. E.; Madureira, P. R.; De Capitani, E. M.; Vieira, R. J. J. *J. Pediatr.* 76 (4): 290-4, 2000.
- [37] Gabriel, D. S. in Eficiência fotodinâmica dos fenotiazínicos em mitocôndrias e células tumorais. Dissertação de Mestrado. 2007. Universidade de São Paulo.
- [38] Perussi, J. R.; *Química Nova.* 30(4):988-994, 2007
- [39] Almeida, J. M.; Theodoro, L. H.; Bonfante, S.; Luize, D. S.; Macarini, V. C.; Bosco, A. F.; Nagata, M. J. H.; Garcia, V. G. *Periodontia* 16(4): 34-40, 2006

- [40] Tardivo, J. P. ; Oliveira, L.S. ; Honório, G.S. ; Lima, N.C.P. ; Baptista, M. S. In: II Workshop "Terapia Fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área da Saúde , 2007, São Pedro – SP (Resumo de congresso)
- [41] Begliomini, H.; Carcinoma superficial multifocal do pênis. Ênfase ao teste do azul de toluidina, *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* 28(3):235-8, 2000
- [42] Tremblay, J-F.; Dussault, S.; Viau, G.; Gad, F.; Boushira, M.; Bissonnette, R.; *Photochem. Photobiol. Sci.* 1(11):852-6, 2002
- [43] <http://downloads.labsynth.com.br/fispq/FISPQ-%20Azul%20de%20Toluidina.pdf>
- [44]<http://www.consultaremedios.com.br/cr.php?uf=SP&tp=nome&nome=levulan%20kerastick>
- [45] Aghahosseini, F.; Arbabi-Kalati, F.; Fashtami, L. A.; Djavid, G. E.; Fateh, M.; Beitollahi, J. M.; *LASERs Surg. Med.* 38:33-38, 2006.
- [46] Komerik, N.; Nakanishi, H.; MacRobert, A. J.; Henderson, B; Speight, P.; Wilson, M.; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(3):932-940, 2003
- [47] Carollo, A. R. H., Tedesco, A. C.; Thomazini, J. A.; Bentley, M. V. L. In: II Workshop "Terapia Fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área da Saúde , 2007, São Pedro - SP. (Resumo de congresso)
- [48] Wong, T-W.; Wang, Y-Y.; Sheu, H-M.; Chuang, Y-C; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(3):895-902, 2005
- [49] Qin, Y.; Luan, X.; Bi, L.; He, G.; Bai, X; Zhou, C.; Zhang, Z.; *LASERs in Medical Science* 23(1):49-54, 2008
- [50] Kamp, H.; Tiez, H. J.; Lutz, M.; Piazena, H.; Sowyrda, P.; Lademann, J.; Blume-Peytavi, U.; *Mycoses* 48(2):101-8, 2005

[51] Donnelly, R.; McCarron, P. A.; Lightowler, J. M.; Woolfson, A. D.; *Journal of Controlled Release* 103(2):381-392, 2005.

### **3 Análise crítica de riscos e benefícios.**

Os riscos envolvidos versam sobre uma possível pigmentação sutil azulada temporária da unha durante um período máximo de 24 horas. Essa pigmentação no entanto, nada tem a desfavorecer fora o aspecto estético/social, e é mais facilmente removida pela limpeza do local com algodão embebido em solução de hipoclorito de sódio comercial (diluição 1:100). Em alguns casos poderão ocorrer vermelhidões seguidas ou não de pequenas inflamações locais após a aplicação do protocolo em virtude da inviabilização celular.

Não se empregará seringas, agulhas, cortes e portanto o método tem perspectivas de riscos mínimos ao paciente colaborador.

A equipe executora compromete-se com o sigilo absoluto sobre a identidade do sujeito de pesquisa.

Os sujeito de pesquisa poderão receber benefícios diretos, tais como o usufruto de terapêutica muito menos tóxica e agressiva que o tratamento convencional. Também são previstos resultados positivos mais rápidos, que não somente trarão benefícios no tempo da terapêutica, mas bem como exigirá menor tempo de dedicação à moléstia, em virtude das poucas aplicações: longo tempo de descanso entre uma e outra aplicação.

Os benefícios indiretos são vários, como por exemplo, um maior conhecimento a respeito da eficiência de fontes de luz por LED na terapia fotodinâmica aplicada a dermatoses *in vivo*; contribuição para a elaboração de um protocolo médico otimizado na aplicação da terapia fotodinâmica com LED e azul de metileno/toluidina. Enfim, pode-se destacar, a contribuição na redução de custo do tratamento, por meio de sistemas mais econômicos, preservando entretanto, a mesma eficiência de protocolos já conhecidos e empregados.

#### 4 Cronograma de execução

**Etapa 1:** Confeção da fonte.

**Etapa 2:** Triagem de participantes.

**Etapa 3:** Aplicação da TFD e desenvolvimento de um protocolo eficaz.

**Etapa 4:** Otimizações de metodologias; Divulgação de resultados

Etapas	Ano 2010											
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ag	Set	Out	Nov	Dez
<b><u>Etapa 1</u></b>												
<b><u>Etapa 2</u></b>												
<b><u>Etapa 3</u></b>												
<b><u>Etapa 4</u></b>												

Eventuais mudanças no cronograma serão previamente comunicadas ao Comitê de Ética. Os tempos dispostos visam uma previsão e estão super-dimensionados. Possivelmente as etapas poderão ser concluídas em períodos menores.

O cronograma não será iniciado antes da aprovação do projeto no(s) comitê(s) de ética submetido. Isso infere que a partir da etapa 2 a conclusão das etapas do projeto ficarão submetidas a aprovação do(s) órgão(s) supramencionado(s).

## **5 Critérios para suspender ou encerrar, com respeito ao sujeito de pesquisa.**

Caso os dados de avaliação sejam insuficientes durante o trabalho este deve ser suspenso e reavaliado para uma futura realização.

- No caso da TFD com LED e azul metileno/toluidina a ocorrência de efeito adverso é esperada ser mínima ou inexistente. Já que se trata de uma terapia não invasiva que se vale de substâncias químicas atóxicas existentes em outras modalidades sendo que a mesma TFD usando outro fotosensibilizadores (como ALA ou MALA) tem-se mostrado altamente eficaz e segura.

## **6 Local de Realização**

**Etapa 1:** Laboratório de Eletrônica de Potência – Instituto de Engenharia Elétrica; Laboratório de Bioquímica e Fotobiologia - Instituto de Química. Av. João Naves de Ávila, 2121, 38400-902 Uberlândia - MG, Brasil

**Etapa 2:** Hospital de Clínicas de Uberlândia – Faculdade de Medicina; Av. Pará, 1720, 38400-902 Uberlândia – MG, Brasil.

**Etapa 2:** Hospital de Clínicas de Uberlândia – Faculdade de Medicina; Av. Pará, 1720, 38400-902 Uberlândia – MG, Brasil.

**Etapa 4:** Laboratório de Eletrônica de Potência – Instituto de Engenharia Elétrica; Laboratório de Bioquímica e Fotobiologia – Instituto de Química. Ambos lotados no Campus Santa Mônica; Hospital de Clínicas de Uberlândia – Faculdade de Medicina; lotado no Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia.

## **7 Infra-estrutura necessária e concordância da instituição.**

Os materiais empregados estão detalhados no item 2.1. A concordância da instituição encontra-se nos documentos anexados.

## 8 Orçamento financeiro

Os equipamentos construídos e os materiais empregados no projeto estão listados abaixo:

35 LED de alta potência (630/660 nm).....R\$15,00 [unit.]

Componentes eletrônicos diversos.....R\$ 500,00

Confecção de peças (usinagem e fresa).....R\$ 1000,00

Algodão, hastes flexíveis, soluções do corante, álcool etílico, ácido oléico, propilenoglicol, hipoclorito de sódio.....R\$ 200,00

Deste orçamento, já foram adquiridos os LED, algodão, soluções dos corantes azul de metileno e azul toluidina e álcool etílico. Apenas parte da confecção de peças e de eventuais futuros componentes eletrônicos serão necessários, conforme melhorias ao equipamento sejam necessárias.

Os custos oriundos da pesquisa são financiados pelo CNPq/FAPEMIG, cujo trabalho encontra-se incluso num dos objetivos propostos. Encontra-se anexo a este projeto de pesquisa uma cópia da primeira página do aditivo.

Os pacientes que utilizam do Hospital de Clínicas serão redirecionados à pesquisa reduzindo gastos em transporte, tempo do paciente, e tempo de recrutamento. Essa proposta

foi criada em virtude de gerar o menor desgaste possível ao paciente colaborador da pesquisa.

## **9 Propriedade das informações.**

O presente trabalho visa o desenvolvimento de eventuais dispositivos que necessitam de proteção intelectual. As propriedades intelectuais das tecnologias desenvolvidas pertencerão, conforme acordo entre os mesmos, aos seguintes colaboradores:

❖ Lucas Ferreira de Paula	CPF – 014.810.386-30
❖ Jonas Reginaldo de Britto	CPF – 654.554.019-04
❖ Carlos Alberto de Oliveira	CPF – 055.433.098-99
❖ João Batista Vieira Júnior	CPF – 118.006.661-87
❖ José Joaquim Rodrigues	CPF – 302.334.376-49
❖ Luis Antonio Ortellado Gómez Zelada	CPF – 434.524.347-53
❖ Douglas Eduardo Soares Pereira	CPF – 072.023.906-04

Todos os pesquisadores têm os seus *curricula vitae* na base de dados lattes do CNPq

## **10 Características da população, justificativa de uso de grupos vulneráveis.**

A população utilizada está descrita no item 14, e não se fará uso de grupos vulneráveis no presente trabalho.

### **13 Fontes de material, coleta específica.**

Ensaio *in vitro* serão realizados concomitantemente aos ensaios *in vivo* supramencionados. Para a realização destes ensaios, será necessário a coleta da lâmina ungueal acometida, dos pacientes que se submeterão a pesquisa.

Esse material servirá como amostras para culturas do fungo. As culturas serão cultivadas no laboratório, visando uma dupla finalidade: a identificação da espécie do fungo em questão; fonte de microorganismos para aplicações *in vitro* da TFD, também chamada IFD (Inativação Fotodinâmica)

### **14 Planos de recrutamento, critérios de inclusão e exclusão.**

Inclusão: Pacientes adultos (maiores de 18 anos de idade) homens e mulheres que não estejam que não estejam grávidas ou amamentando e que apresentem onicomicose, em aproximadamente 6 meses sem qualquer tratamento tópico ou oral, saudáveis ou portadores de patologias que facilitem processos infecciosos como diabetes melitus, transplantados, renais crônicos e hepatopatas crônicos.

O projeto como um todo, na intenção de ocupar o menor número de voluntários e ao mesmo tempo obter resultados representativos e relevantes, optou por recrutar 30 pessoas, desde que enquadrem nos critérios descritos neste item (14).

Os pacientes deverão ter a infecção fungica confirmada por micologia direta e cultura.

Critério de exclusão: Crianças e adolescentes menores de 18 anos, mulheres grávidas ou em amamentação; pacientes portadores de porfiria e outras doenças causadas ou exacerbadas pela luz como Lupus eritematoso, erupção polimorfa à luz, pessoas em uso de drogas fotossensíveis como tetraciclinas, cloroquina e derivados trazídicos; pessoas em comprovada alergia ao azul de metileno/toluidina.

Obs: O controle poderá ser feito através das unhas sãs dos próprios pacientes.

#### **15 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se anexo a este projeto de pesquisa.

#### **16 Justificativa de inclusão de sujeitos sadios**

Indivíduos não acometidos pela dermatose, se tornam necessários para a formação de um grupo controle, visando aferir o protocolo, e servir de referência para diversos estudos envolvidos.

## **9. ANEXOS**

**10.1 Artigo Aceito para publicação – Proof do artigo enviado ao Journal of the Brazilian Chemical Society já aceito para publicação.**

REF.: 399/09V3

To Prof. de Paula, Lucas  
Universidade Federal de Uberlândia  
Uberlândia, Minas Gerais

I am pleased to inform you that your paper "A COMPARATIVE STUDY OF IRRADIATION SYSTEMS FOR PHOTOINACTIVATION OF MICROORGANISMS" [REF.: 399/09V3] has been accepted for publication.

Please check at EDITOR, Referee and/or Editorial Manager's Comments if extra corrections and modifications should be incorporated in the revised final version files.

Follow the Instructions below to send your files.

=====  
Editor's Report:  
-----

Recommendation:Publish

Regards  
Watson Loh - - JBCS Editor

=====

## A Comparative Study of Irradiation Systems for Photoinactivation of Microorganisms

Lucas F. de Paula,\*<sup>a</sup> Renata O. Santos,<sup>a</sup> Henrique D. Menezes,<sup>a</sup> Jonas R. de Britto,<sup>b</sup>  
João B. Vieira Jr.,<sup>b</sup> Paulo P. Gontijo Filho<sup>c</sup> and Carlos A. de Oliveira<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Química, <sup>b</sup>Faculdade de Engenharia Elétrica and <sup>c</sup>Núcleo de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Uberlândia, 38408-100 Uberlândia-MG, Brazil

Estudou-se a construção de sistemas de LED aplicados a processos de fotossensitização. Visando à obtenção de dispositivos mais eficientes avaliou-se a aplicação de LED de alta potência (HPLED), que apresenta maior fluxo fotônico, tendendo a excitar uma maior fração de moléculas. Foram descritos detalhes de construção de 3 diferentes sistemas de irradiação completamente distintos (lâmpada halógena filtrada, LED convencional, HPLED), utilizando azul de metileno como fotossensibilizador. A comparação entre a eficiência de cada equipamento foi realizada através da cinética de fotooxidação de 1,3-Diphenylisobenzofuran e inativação de *Staphylococcus aureus*. A emissão de luz de cada equipamento, sobreposta à absorção do fotossensibilizador, também se mostrou um importante parâmetro na estimativa da eficiência dos equipamentos. Foi observada uma inibição bacteriana superior a 99% para concentrações de  $5 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> de fotossensibilizador, no sistema que emprega HPLED. Os equipamentos baseados em LED, apresentaram resultados satisfatórios além de baixo custo e simples montagem.

The construction of LED systems applied to photosensitization processes was studied. Aiming to obtain more efficient devices it was evaluated the use of high intensity LED (HPLED), that present greater photonic flux, tending to excite a greater fraction of molecules. Construction details for 3 different irradiation systems were described (filtered halogen bulbs, conventional LED, HPLED), using methylene blue as a photosensitizer. A comparison between the efficiency of the equipments was carried out through the kinetics of photooxidation of 1,3-Diphenylisobenzofuran and *Staphylococcus aureus* photoinactivation. The overlap between the light emitted from each equipment and the photosensitizer absorption, was also an important parameter in estimating the efficiency of the equipment. Bacterial inhibition higher than 99% for concentrations of  $5 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> of the photosensitizer was observed, in the system that uses HPLED. The equipments based on LED showed satisfactory results, besides their low cost and simple to assembling.

**Keywords:** high power LED, *Staphylococcus aureus*, methylene blue, irradiation systems

### Introduction

Photodynamic Inactivation (PDI)<sup>1</sup> or Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT)<sup>2</sup> is the name of a process, derived from Photodynamic Therapy, that causes the death of microorganisms under the action of visible light and a specific drug, also called photosensitizer.<sup>3</sup> The electronic excitation of the photosensitizer in the presence of oxygen implies in the generation of a large number of reactive oxygen species (ROS), as for example, singlet oxygen,<sup>4,5</sup> in a process known as photosensitization.

Since 1976, the oxidative action of singlet oxygen and other ROS on tumor cells has been reported in the

medical and scientific communities.<sup>5,6</sup> Around the world, several research results have been published on the use of photosensitization to fight diseases caused by fungi, viruses, bacteria and yeasts.<sup>3,5,7-11</sup>

Among the photosensitizers cited in the literature,<sup>12-16</sup> methylene blue (MB), a phenothiazinic dye, has some convenient characteristics: it presents good photodynamic activity compared to different substrates,<sup>17-19</sup> is nontoxic and relatively inert on living organisms.<sup>20</sup> It is also known for its anti-septic action<sup>21</sup> and has been administrated intravenously in some clinical cases (e. g., the treatment of methemoglobinemia).<sup>22,23</sup>

The light used in the photoinactivation systems needs to comply with certain requirements: emission filtered with low interference (*i.e.*, relative monochromaticity);

\*e-mail: msc\_lucasferreira@yahoo.com.br

appreciable area of incidence; adjusted spectral emission (near the drug absorption peak); low heating; appreciable intensity.<sup>24</sup> Therefore, light emitting diodes (LED) present some very desirable characteristics such as physical resistance (they do not have bulbs, they do not break and they are quite robust); extended duration (useful lifetime nearly 100,000 hours); spectral emission near to monochromatic systems; availability in several colors; low heat emission;<sup>25,26</sup> aside from having lower cost *per* unit of power when compared to laser diode systems.<sup>27</sup>

In recent years, several publications point out to the use of LED as a source of irradiation to satisfactorily promote the excitement of photosensitizers.<sup>28-31</sup> However, the present work aims at comparing and demonstrating advantages in the use of high intensity LED, in detriment to conventional LED, aside from providing guidelines for constructing an irradiation equipment based on LED arrays. Conventional colored 3 and 5 mm LED, widely found on the market, normally operate under a forward current of 20 mA, and have decreased rates of luminous emission (normally not exceeding 5,000 mcd).<sup>32</sup> With the intention of making up for this disadvantage, two alternatives can be used: (i) the confection of LED arrays that not only increase the incidence area, but also potentialize the intensity of emitted radiation; (ii) application of high power LED (AMS-II). They are more powerful than the previous ones, and have high rates of luminous conversion - about 33 lm W<sup>-1</sup> for the red AMS-II.<sup>26</sup> This indicates that they use less energy to emit the same luminous amount, aside from maintaining good characteristics as durability and emission close to monochromatic.

The photodynamic action of MB was explored in the sense of correlating the efficiency of three different irradiation sources: (i) an equipment issuing polychromatic filtered radiation coming from a halogen lamp called PHLS (Polychromatic Halogen Lamp System); (ii) matrix of 600 high brightness conventional

LED, called LED600; (iii) irradiation equipment emitted by high intensity LED, assembled for a better performance in the methylene blue sensitization and the analogous ones, denominated AMS-II.

The effective irradiance and the overlap integral with the absorption band of MB of each equipment were analyzed. Their efficiencies in ROS generation were analyzed by means of a kinetic study of discoloration of 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF), a colorful molecule that quickly suffers oxidation in the presence of singlet oxygen, forming *o*-dibenzoylbenzene (DBB).<sup>33</sup> As a microorganism model, for implementing and measuring photoinactivation efficiency, *Staphylococcus aureus*, which is a pathogenic gram-positive bacteria widely studied and responsible for several reports of hospital infection<sup>34</sup> was used.

## Experimental

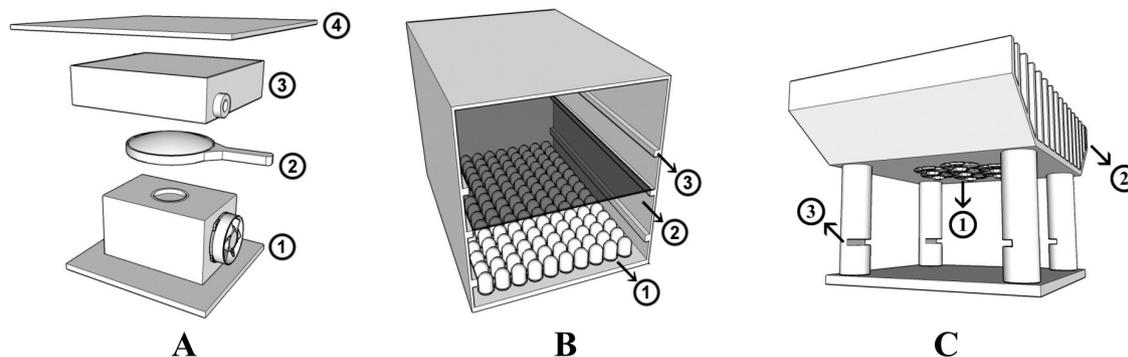
### PHLS setup

A halogen lamp used in overhead projectors (OSRAM, model ENH, 250W) was fitted to a metallic box. A 100% reading magnifying lens was fixed at a distance of 7 cm from the light bulb. For refrigeration, a cooler was inserted in the metallic box, and was fitted to a glass cube near the irradiation point of the sample being rectangular in shape for circulating water on the inside.

The light given off by the light bulb was then filtered to eliminate unnecessary wavelengths using an optic filter. The filter was obtained commercially and is made of pigmented polyester. The filter was fitted on the top of the glass box. A schematic view of this setup is shown in Figure 1A.

### LED600 equipment

Under a typical circuit board, the matrix of 600 high brightness red LED (ZX, 8000 mcd) was made. This



**Figure 1.** A) Equipment PHLS (1) Metal carcasses with the coupled lamp and cooler, (2) Magnifying glass, (3) Glass box, (4) Optical filter; B) LED600 equipment (1) Arrangement of high brightness LED, (2) Translucent mobile support for sample setting, (3) Height groove, for support setting; C) AMS-II equipment (1) Arrangement of high power LED, (2) Heat processor dissipater, (3) Groove for support setting for the insertion of the sample.

array was organized in 150 clusters connected in parallel, each cluster having 4 LED in series. This entire array was connected and fed by a DC power supply, providing 2.42 A current.

This circuit board was fixed to a rectangular metallic box. It was welded onto the metallic structures, on the inside there are some structures that allow for sample fixation. The described structure is shown in the Figure 1B.

#### AMS-II equipment

Seven High Intensity LEDs were assembled in a serial array (Figure 1C) (Edison, model IR Edixeon). The LED was driven by a Buck CC/CC converter that delivers an output voltage of 22VDC and a constant output current of 350 mA, from a universal input voltage (100-240 V<sub>AC</sub>). Therefore the total power given off by the LED is about 7.5 W.

#### Acquisition of irradiance spectra and measurements

The profile of the emitted radiation of the above-mentioned light sources was obtained with the aid of a setup based on an Ocean Optics, model SD2000 fiber optics spectrometer with an integrated time of 35 ms.

The optical power (P) was obtained with the aid of a power meter Ophir, model Orion, with a photodiode sensor model PD-300, spectral range of 350-1100 nm.

Aiming at the comparison between the proposed systems, an integral of overlapping was estimated (R) between the absorption of the methylene blue (ABS<sub>PS</sub>) and the emission of the irradiation equipment (E<sub>EQUIP</sub>) (equation 1), according to the method proposed by Bonacin *et al.*<sup>31</sup>

$$R = \int \text{ABS}_{\text{PS}} E_{\text{EQUIP}} d\lambda \quad (1)$$

Because the irradiation intensity does not vary with time, it is possible to estimate the relative fraction of photosensitizer excitement (R) which is an important parameter for comparing the efficiency between the equipments described.

Due to the fact that the concentration of dye used is the same, the greater or lesser values of R are associated only to the coupled emission with the absorption of the dye, and represented a magnitude of excitement of the dye molecules.

#### Methylene blue

Methylene blue solutions (Sigma) in the concentrations  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$  and  $5 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>, have been prepared,

in a laminar flow hood, through the dissolution of the dye in sterile physiological serum (sodium chloride saline solution 0.9 wt% sterilized by autoclave) and deposited in Eppendorf tubes before use.

The methylene blue absorption spectrum in physiological solution, in a solution 10<sup>-6</sup> mol dm<sup>-3</sup>, was measured using a Shimadzu UV-2501 spectrophotometer.

#### DPBF oxidation

Stock solutions (10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup>) of DPBF (Sigma) were diluted in absolute methanol, resulting in a final concentration of 10<sup>-5</sup> mol dm<sup>-3</sup> and 10<sup>-6</sup> mol dm<sup>-3</sup> of methylene blue. All these solutions were prepared at the moment of use, and protected from light before the experiments were carried out.

The solutions were irradiated using an open quartz cuvette (Hellma 110-QS) with a 1 cm optical pathway, being stirred constantly, at intervals of 5 seconds of irradiation, and absorption was read at 408 nm, with the aid of a spectrophotometer.

Sodium azide (Aldrich, 99.99%) was used as a singlet oxygen quencher in some experiments.

A comparative measure at the number of photons absorbed by the concentration of oxidable substrate was used as to help estimating the efficiency of each equipment. Consequently, the equipment that promotes a greater substrate degradation emitting a smaller quantity of photons tends to be more efficient.

#### Bacterial suspension

Determined *S. aureus* strain (ATCC 25923), was kindly provided by the Laboratório de Microbiologia, Universidade Federal de Uberlândia. This strain was transferred to a nutritional medium prepared with the following composition: 1.25% meat extract 'lab lemco' (Oxoid), 0.50% tryptone (Oxoid), 1.00% peptone (Biobrás), 0.50% sodium chloride (Vetec, 99%), 0.25% sodium phosphate dibasic heptahydrated (Cinética química, 99%), 2.00% D-glucose (Synth, 99.9%).

A secondary culture was carried out in agar Cistine-Lactose-Electrolyte-Deficient – CLED (Oxoid), used for the growth and isolation of CFU's.

From this culture a bacterial suspension was prepared in sterile physiological serum/saline. In the bacteriological experiment a concentration of 0.1 in the McFarland scale was used. This stock suspension was diluted in a 1:10 proportion, which corresponds to a cell density of approximately  $3 \times 10^6$  colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup>.

### Incubation and irradiation

500  $\mu\text{L}$  of bacterial suspension and 500  $\mu\text{L}$  of methylene blue solution were incubated, in the dark, for 30 min. This experiment was repeated for each concentration of methylene blue prepared. All experiments were carried out in triplicate.

After the incubation period, the samples were irradiated, for 20 minutes, without agitation, and subsequently 100  $\mu\text{L}$  of the suspension were transferred to Petri dishes containing the casting growth medium and kept in the bacteriological stove at 35  $^{\circ}\text{C}$ . This medium was prepared by adding 2% of agar to the nutritional broth formula. After 24 hours of incubation, colony counting was carried out using a colony counter PHOENIX (CP 602).

## Results and Discussion

### Development of the equipment

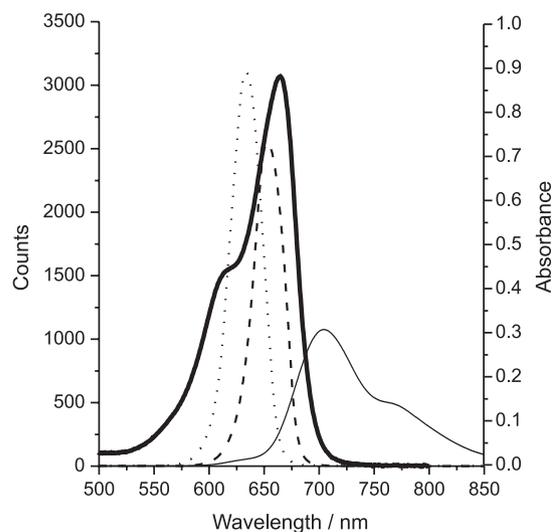
The LED of the AMS-II equipment was arrayed in series, because in this way the equipment would be better adjusted to the photochemical processes (satisfactory intensity, homogeneous, fixed and steady irradiance). Arraying series and regulating the current (and not the tension) through of the LED, is preferred for these applications, provided: (i) The curve between the current and LED voltage is very abrupt;<sup>26</sup> Small changes in the voltage are expressed in great variations of current. Once the luminous intensity of the LED alternates more linearly with the current, subtle alterations in the voltage would imply in drastic changes in the intensity. While simple systems of current control, tend to ensure greater confidence in the luminous intensity oscillation. (ii) In regard to the voltage and the natural negative temperature coefficient of LED, arrays connected in parallel cannot guarantee that the current (and thus the brightness) entering each LED is necessarily equal. When two diodes are connected in parallel and one of them heats a little more than the other, this diode tends to drain more current, becoming hotter and in this way contributes gradually to a cascade effect that normally culminates in overheating.

LED600, unfortunately, for practical reasons, cannot be arrayed in series, since the tension in components in series is cumulative, and, therefore the equipment would tend to consume a tension of nearly 1320 Volts (assuming 2.2 V as the approach tension of each diode), making the project impracticable. In practice it was observed that for the array in LED600 having been carried in a rather compact form, the homogeneity is not so compromised, and the current limitation, for the use of an appropriate source, reduces part

of the problems related to the arrays in parallel. Moreover, LED600 has innumerable components. If it was mounted in series and one of the diodes were damaged, opening the circuit, all illumination of the set would be compromised. For these and other reasons the AMS-II equipment was theoretically considered as LED600 improvement, developed to work in series, with a fixed current.

The production cost of the PHLS is at least twice less costly than the other devices developed. This equipment is also much more accessible than analogous commercial equipment. The lens used greatly reduce the area of homogeneous radiation, however, tests performed with the spectrometer indicated a scoring higher than 50% in the value of light intensity, when in the presence of the lens. In the absence of refrigeration systems, the sample can reach temperatures of about 52  $^{\circ}\text{C}$ , favoring the denaturing of DNA and proteins. In this way, the glass box gives off the generated heat efficiently, guaranteeing that the temperature of the sample is raised at the most 3  $^{\circ}\text{C}$ .

The emission spectrum of the equipment studied, superimposed with the photosensitizer absorption used is shown in Figure 2.



**Figure 2.** Absorption spectrum for methylene blue (—); emission spectrum of PHLS (—), LED600 (·····) and AMS-II (----).

LED600 presents a wide emission area: 360  $\text{cm}^2$ , sufficient homogeneity (seen with spectrometer) and low heating. For this equipment we kept the distance of 11 cm for a better homogeneity/intensity relation, which was used in the microbiological experiments and in the degradation of DPBF. The systems based on LED arrays should present an ideal working distance seeing that, in a LED, the polymeric pack acts as a lens: a greater proximity means that the sample is very near to the focus, and, therefore, the irradiation is not homogeneous; the increase in the distance

**Table 1.** Optical Power (P), Irradiation Area (A), Irradiance (Ir) and estimated excited fraction of photosensitizer (R), in the conditions used

Equipment	P / mW	A <sup>a</sup> / cm <sup>2</sup>	Ir / (mW cm <sup>-2</sup> )	Φ / (Einstein s <sup>-1</sup> )	R <sup>b</sup>
PHLS	2.90	132	1.80	$1.7 \times 10^{-8}$	6.33
LED600	20.11	360	12.46	$1.6 \times 10^{-7}$	18.58
AMS-II	19.69	95	12.21	$1.07 \times 10^{-7}$	31.36

<sup>a</sup>Homogeneous irradiation area. Refers only to the possibility of irradiation of greater numbers of samples at the same time. Maximum variation in  $\pm 5\%$  of intensity. <sup>b</sup>Calculated with respect to methylene blue  $10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> in sodium chloride 0.9%.

tends to improve the distribution of the radiation, on the other hand great distances of the light source compromise the intensity of the light received.

AMS-II, although having intensity very close to LED600, has the peak of emission at 652 nm, being still closer to the maximum absorption of the drug (663 nm). Emission of AMS-II is not only more appropriate for this drug, as it is also very homogeneous, as seen in additional tests with the spectrometer. The emission area of 95 cm<sup>2</sup> (Table 1) could be increased by the simple addition of more LED in the array. This system presented irradiance values near 43.35 mW cm<sup>-2</sup>. The information on the irradiation area with homogeneous intensity, optical power, irradiance, and a fraction of excited molecules obtained from each equipment is summarized in Table 1.

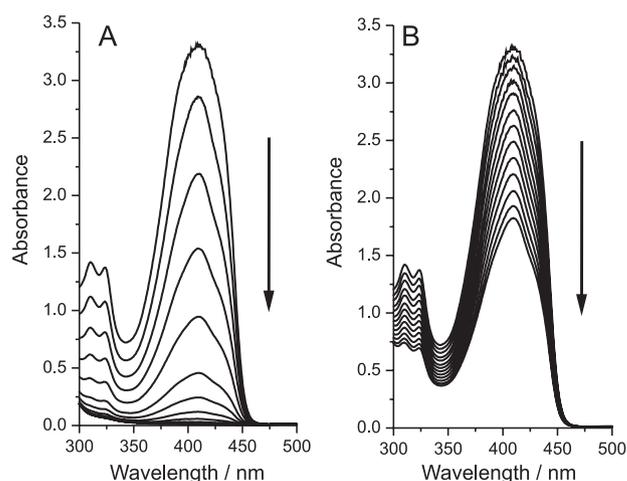
The useful fraction of light that excites the fenotiazinic coloring is different for each equipment. It is possible to observe that the emission region of LED is sufficiently adjusted for the region of better drug electronic excitement, since PHLS presents low magnitude in the excitement of the photosensitizer ( $R = 6.33$ ), basically in regard to the reduced photonic emission in the region of the band of absorption of methylene blue. The PHLS region emitted is sufficiently appropriate for other drugs, as for example, the class of phthalocyanines, since the absorption peak of the Q band of these drugs is located near the region between 675-700 nm.<sup>35</sup> These emissions are normally difficult to be obtained using conventional LED, because commercially available LED emission values above 650-660 nm are not usual.

Even though the LED600 and AMS-II are close, it is expected that AMS-II would have greater efficiency in generating reactive species due to its irradiation being capable of exciting a greater fraction of molecules of the photosensitizer ( $R = 31.36$ ) compared to the rest of the equipment. This phenomenon can be explained because of the emission of this equipment found in the band of greater light absorption by the photosensitizer.

#### Confirmation of singlet oxygen presence

Solutions with sodium azide (NaN<sub>3</sub>) were used in order to give evidence of the participation of singlet oxygen in the process (Figure 3). Sodium azide is known as a strong

singlet oxygen quencher ( $10^8$  dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O).<sup>33,37,38</sup> In all the equipments similar profiles of DPBF oxidation and suppression by azide were observed, Figure 3 shows the results observed with the LED600 equipment.



**Figure 3.** Photo-induced oxidizing of DPBF in LED600, in the absence of NaN<sub>3</sub> (A), and in the presence of NaN<sub>3</sub> (B). Each spectrum corresponds to 5 seconds of irradiation.

It is possible to observe in Figure 3B, that in the presence of NaN<sub>3</sub>, a reduction in the oxidation speed of DPBF occurs. The absorption peak in the DPBF region is found in the 429 nm region and shows the Figure that the mechanism of oxidation by participation of singlet oxygen is predominant.

#### Kinetic comparison of photo oxidation of DPBF

A kinetic study allows the quantification ion of to express the efficiency in the generation of ROS by emitted light of equipment built in the photo degradation of DPBF. Equation 2 expresses the degradation of the oxidable substract by the action of singlet oxygen. The concentration of singlet oxygen can be admitted as constant because the solutions were keeping contact with air and under constant agitation. Thus, it is possible to incorporate [<sup>1</sup>O<sub>2</sub>] into the kinetic constant k, resulting in a pseudo-first order constant, k'. In this way, the resultant kinetics is of pseudo-first order (equation 3 and 4). After the integration the equation obtained for the process is express in equation 5.<sup>33,36</sup>

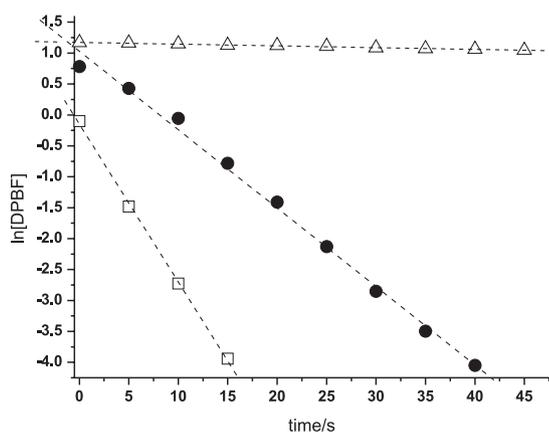


$$v = \frac{d[\text{DPBF}]}{dt} = -k[{}^1\text{O}_2][\text{DPBF}] \quad (3)$$

$$\frac{d[\text{DPBF}]}{dt} = -k'[\text{DPBF}] \quad (4)$$

$$\ln\left(\frac{[\text{DPBF}]}{[\text{DPBF}]_0}\right) = -k't \quad (5)$$

A reduction in the concentration of DPBF in regard to time is shown in Figure 4, for all equipments.



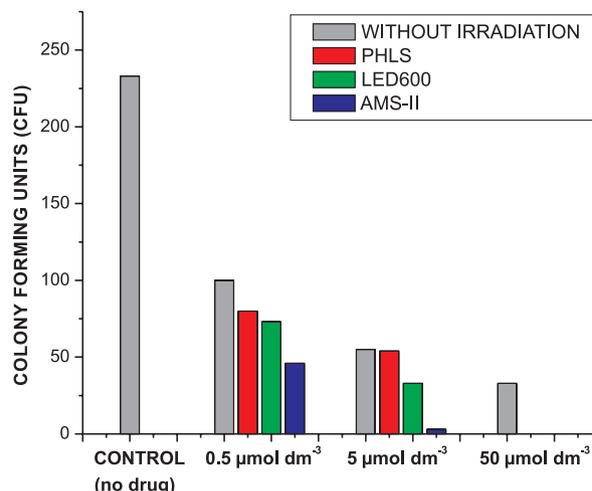
**Figure 4.** Kinetics of pseudo-first order corresponding to the degradation of DPBF induced by irradiation of various equipments developed. ( $\Delta$ ) PHLS; ( $\bullet$ ) LED600; ( $\square$ ) AMS-II.

Each spectrum was obtained after 5 seconds of exposition to emitted light by the equipment. Thus, it is observed that for the AMS-II, only 20 seconds were sufficient for a reduction greater than 98% of intensity of the DPBF band.

These results suggest that AMS-II presented better performance. These tests are also in accordance with the values shown in Table 1. In these experimental conditions, it is still possible to say that AMS-II presents twice the efficiency of LED600 ( $k'_{\text{AMS}} = 0.25532 \text{ s}^{-1}$ ;  $k'_{\text{LED}} = 0.12668 \text{ s}^{-1}$ ). However, PHLS, in view of the small emission in the useful working band, presents an efficiency quite reduced when compared to LED-based equipments.

#### Photodynamic inactivation

Methylene blue, in the absence and in the presence of light, presents bactericide action in particular against gram-positive bacteria. These effects are described in the literature.<sup>39,40</sup> The results of the bacterial inhibition by the presence and absence of light, are arranged in Figure 5. The samples were irradiated for 20 minutes.



**Figure 5.** Bacteria count before and after the exposure of light, under three different concentrations of methylene blue:  $5 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Solutions in the same concentrations and non-irradiated were used as control.

The bacterial inhibition in the dark, for the more diluted solution ( $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ), presents a reduction, of approximately 50%, in the number of colony forming units. In the equipment of greater efficiency, AMS-II, methylene blue under irradiation photo inactivated 75% of the bacteria reducing by 50% of the colony forming units compared with the dark control.

In all the other concentrations, the AMS-II equipment presented photo inactivation superior to 99%. The other equipments, LED600 and HPLS also presented satisfactory performances of photo inactivation. At the concentration of  $5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  and after light application, there was no colony formation. Therefore, all the equipments described operate satisfactorily against growth inhibition of *Staphylococcus aureus* in vitro. The obtained results in photodynamic inactivation agree proportionally to the results obtained with the DPBF oxidation and with the respective R values of each equipment.

## Conclusions

All the equipments built proved to be capable of generating oxygen singlet, as was observed in the discoloration of the DPBF, in the suppression by  $\text{NaN}_3$  and photo inactivity of *Staphylococcus aureus*.

The study enables one to conclude that high power LED equipment proved to be able to excite a more significant fraction of molecules of the photo synthesizer, and consequently showed a more significant generation of oxygen singlet, as was observed more significantly by the magnitude of the kinetics of discoloration of DPBF, and bacterial inhibition. The reasons for this are relatively

simple: the high powered LED used emits in wavelengths near to the peak methylene blue absorption aside from having high fluency. The system that uses a halogen bulb presents low photonic emissions, even though other optic filters may be used.

High powered LED are more effective photochemically aside from showing cost advantages and set up practicality.

## Acknowledgments

The authors are indebted to Prof. Dr. Antonio Eduardo da Hora Machado for his valuable contribution to this study. To Laboratório de Fotoquímica and Laboratório de Fotoquímica de Lignocelulósicos from Universidade Federal de Uberlândia, for the concession of the infrastructure and materials. To CNPq, FAPEMIG and Nanobrax (www.nanobrax.com) for research support.

## References

- Gad, F.; Zahra, T.; Hasan, T.; Hamblin, M. R.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2173.
- Wainwright, M.; *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *42*, 13.
- Perussi, J. R.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 988.
- Machado, A. E. H.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 237.
- Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q.; *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889.
- Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J.; *Cancer Res.* **1976**, *36*, 2326.
- Komerik, N.; Nakanishi, H.; MacRobert, A. J.; Henderson, B.; Speight, P.; Wilson, M.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 932.
- Wong, T-W.; Wang, Y-Y.; Sheu, H-M.; Chuang, Y-C; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 895.
- Qin, Y.; Luan, X.; Bi, L.; He, G.; Bai, X.; Zhou, C.; Zhang, Z.; *Lasers Med. Sci.* **2008**, *23*, 49.
- Alaya, F.; Grimaldi, E.; Perfetto, B.; Donnarumma, M.; De Filippis, A.; Donnarumma, G.; Tufano, M. A.; *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2008**, *24*, 237
- Donnelly, R. F.; McCarron, P. A.; Tunney, M.M.; *Microbiol. Res.* **2008**, *163*, 1.
- Huang, Z.; *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2008**, *5*, 285.
- Alves, E.; Costa, L.; Carvalho, C. M.; Tomé, J. P.; Faustino, M. A.; Neves, M. G.; Tomé, A. C.; Cavaleiro, J. A.; Cunha, A.; Almeida, A.; *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 70.
- Tirand, L.; Thomas, N.; Dodeller, M.; Dumas, D.; Frochot, C.; Maunit, B.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M.; *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 806.
- Stukavec, J.; Duchac, V.; Horak, L.; Pouckova, P.; *Photomed. Laser Surg.* **2009**, *27*, 107.
- Marotti, J.; Aranha, A. C.; Eduardo C. D.; Ribeiro, M. S.; *Photomed. Laser Surg.* **2009**, *27*, 357.
- Almeida, J. M.; Theodoro, L. H.; Bonfante, S.; Luize, D. S.; Macarini, V. C.; Bosco, A. F.; Nagata, M. J. H.; Garcia, V. G.; *Periodontia* **2006**, *16*, 34.
- Câmara, F. P.; Elias, C. A.; *An. Bras. Dermatol.* **1978**, *4*, 53.
- Tardivo, J. P.; Petri, V.; Bonetti, T. I.; Oliveira, L. S.; Baptista, M. S.; *Jornal Brasileiro de Laser* **2007**, *1*, 28.
- Tardivo, J. P.; Giglio, A. D.; Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; Turchiello, R. F.; Baptista, M. S.; *Photodiagnosis Photodynamic Ther.* **2005**, *2*, 175.
- Farmacopéia Brasileira*, 2a. ed., Atheneu São Paulo, 1959, p. 119.
- Krol, J.; *Cahiers D'Anesthésiologie* **1968**, *17*, 333.
- Dahshan, A.; Donovan, G. K.; *Pediatrics* **2006**, *117*, e806.
- Babilas, P.; Landthaler, M.; Szeimies, R-M.; *Eur. J. Dermatol.* **2006**, *16*, 340.
- Demian, A. E.; Britto, J. R.; de Freitas, L. C.; Farias, V. J.; Coelho, E. A. A.; Vieira, J. B.; *12<sup>th</sup> European Conference on Power Electronics and Applications*, Aalborg, Denmark, 2007.
- Phillips Lumileds Lighting Company, *Datasheet DS45*, March 2006.
- Patrice, T. In *Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology*; Hader, D. P.; Jori, G., eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1994, ch. 7.
- Ferreira, I.; Rahal, S. C.; Rocha, N. S.; Gouveia, A. H.; Corrêa, T. P.; Carvalho, Y. K.; Bagnato, V. S.; *Veterinary Dermatology* **2009**, *20*, 174.
- Szeimies, R. M.; Matheson, R. T.; Davis, S. A.; Bhatia, A. C.; Frambach, Y.; Klövekorn, W.; Fesq, H.; Berking, C.; Reifenberg, J.; Thaçi, D.; *Dermatol. Surg.* **2009**, *35*, 586.
- Barolet, D.; *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2008**, *27*, 227.
- Bonacin, J. A.; Engelmann, F. M.; Severino, D.; Toma, H. E.; Baptista, M. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 31.
- Kingbright Corporation, *Datasheet WP7113PR51C/A*, August 2007.
- Bell, J. A.; MacGillivray, J. D.; *J. Chem. Educ.* **1974**, *51*, 677.
- Rubinstein, E.; *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *32*, S18.
- Rosenthal, I.; *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53*, 859.
- Young, R. H.; Brewer, D.; Keller, R. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 375.
- Foot, C. S.; *Org. Chem* **1979**, *40*, 139.
- Harbour, J. R.; Issler, S. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 903.
- Li, W. Y.; Xu, J. G.; He, X. W.; *Anal. Lett.* **2000**, *33*, 2453.
- Rohs, R.; Sklenar, H.; *Indian J. Biochem. Biophys.* **2001**, *38*, 1.
- Zhao, G.-C.; Zhu, J.-J.; Zhang, J.-J.; Chen, H.-Y.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *394*, 337.

Received: June 6, 2009

Web Release Date: December 21, 2009