



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
INFRAESTRUTURA E TERRITÓRIO (ILATIT)**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERDISCIPLINAR EM ENERGIA E
SUSTENTABILIDADE**

**UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS PORFIRINÓIDES NA
INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS USANDO TERAPIA FOTODINÂMICA**

ANDRÉIA DA CRUZ RODRIGUES

Foz do Iguaçu
2022

**UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS PORFIRINÓIDES NA
INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS USANDO TERAPIA FOTODINÂMICA**

ANDRÉIA DA CRUZ RODRIGUES

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa De Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia E Sustentabilidade da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito à obtenção do título de Mestre em Energia e Sustentabilidade.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marciana Pierina Uliana Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

R969

Rodrigues, Andréia da Cruz.

Utilização de derivados de produtos naturais porfirinóides na inativação de microrganismos usando terapia fotodinâmica / Andréia da Cruz Rodrigues. - Foz do Iguaçu-PR, 2022.
67 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana. Instituto Latino-Americano de Infraestrutura e Território. Programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade. Foz do Iguaçu-PR, 2022.

Orientador: Marciana Pierina Uliana Machado.

Coorientador: Michel Rodrigo Zambrano Passarini.

1. Bacterioclorina. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Fotoinativação. I. Machado, Marciana Pierina Uliana. II. Passarini, Michel Rodrigo Zambrano. III. Título.

CDU 615.285

ANDRÉIA DA CRUZ RODRIGUES

**UTILIZAÇÃO DE DERIVADOS DE PRODUTOS NATURAIS PORFIRINÓIDES NA
INATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS USANDO TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa De Pós-Graduação Interdisciplinar em Energia E Sustentabilidade da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito à obtenção do título de Mestre em Energia e Sustentabilidade.

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Prof^a Dr^a Marciana Pierina Uliana Machado
UNILA



Prof. Dra. Caroline da Costa Silva Gonçalves
UNILA



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Foz do Iguaçu, 20 de abril de 2022.

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Andréia da Cruz Rodrigues

Curso: Programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade

	Tipo de Documento
(.....) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(.....) trabalho de conclusão de curso
(X) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(X) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Utilização de derivados de produtos naturais porfirinóides na inativação de microrganismos usando terapia fotodinâmica.

Nome do orientador(a): Marciana Pierina Uliana Machado

Data da Defesa: 20/04/2022

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

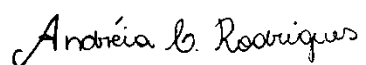
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 20 de abril de 2022.


Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho aos meus pais, minha família e meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo privilégio da vida.

Aos meus pais por sempre me apoiarem e fazerem de tudo para eu alcançar meus sonhos.

A minha professora orientadora Dr^a Marciana não só pela constante orientação neste trabalho, mas também por dispor do seu tempo para me ensinar e ajudar na parte experimental e sobretudo pela sua amizade e sua compreensão

Aos professores da banca pelas orientações e dicas e contribuições

A Universidade Federal da Integração Latino-americana pelo apoio sempre concedido

A DS-UNILA pelo auxílio financeiro

A coordenação e secretaria do mestrado Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade por todo apoio, ajuda e esclarecimentos

Aos professores do mestrado Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade por compartilharem seu conhecimento

Aos colegas de curso pela parceria compartilhamento de experiência e saberes durante essa trajetória

As meninas do Laboratório G011 por toda ajuda e auxílio durante a minha pesquisa

A colega Juliana por dedicar seu tempo, esforço e paciência para me assistir nas dúvidas e me auxiliar.

Sendo assim, agradeço todos aqueles que dê alguma forma me auxiliaram na busca e construção desse sonho.

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir.

Augusto Cury

RODRIGUES, Andréia da Cruz. **Utilização de derivados de produtos naturais porfirinóides na inativação de microrganismos usando a terapia fotodinâmica.** 2022. 67 páginas. Dissertação de mestrado (Mestrado Interdisciplinar em Energia e Sustentabilidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

RESUMO

O uso de fotossensibilizadores derivados de produtos naturais porfirinóides tem se mostrado promissores quando associados a Terapia Fotodinâmica (TFD). Esta terapia é uma técnica que utiliza um fotossensibilizador (de origem natural ou sintetizado), luz e oxigênio molecular. A combinação destes três componentes levam a formação de espécies reativas que causam a morte celular. A TFD vem se destacando em aplicações na área da saúde, como no tratamento de câncer, tratamentos dermatológicos, tratamentos de micoses e outros. No entanto, ainda é necessário desenvolver novos fotossensibilizadores, mais eficientes. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi obter um novo fotossensibilizador, com bons resultados frente a inativação de microrganismos, principalmente aqueles resistentes a diversos tipos de medicamentos. Inicialmente a bactéria púrpura (*Rhodopseudomonas faecalis*) foi cultivada em laboratório. Após foi realizada a extração do pigmento bacterioclorofila a utilizando uma solução metanol/H₂SO₄ para obter o fotossensibilizador chamado bacterioclorina. A partir da bacterioclorina foram realizadas modificações estruturais a fim de torná-la mais eficiente na inativação de microrganismos de forma efetiva e sustentável. Essa reação foi mantida sob atmosfera de nitrogênio para evitar oxidação e protegida da luz para não fotodegradar. Após o processo de extração, foi realizada uma reação de transesterificação com uma solução de metanol/H₂SO₄ (5%). Na sequência foi inserido na bacterioclorina o substituinte Trizma® [Tris(hidroximetil) aminometano] a fim de aumentar sua solubilidade. Por último, foram realizados os testes de fotoinativação de microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*), utilizando a TFD, a fonte de irradiação foi uma biotable (780 nm). Os resultados demonstraram que a fotoinativação foi promissora para inativação dos microrganismos testados, exceto em *Pseudomonas aeruginosa*. Com esse estudo foi possível obter dois fotossensibilizadores porfirinóides do tipo bacterioclorina (oriundo de uma bactéria) que é eficiente na inativação de microrganismos causadores de doenças, e que possa vir a sanar problemas na saúde, podendo assim auxiliar a sociedade através de tecnologias associadas com produtos naturais de forma mais sustentável, objetivando melhorias na área saúde e conseqüentemente no bem-estar da sociedade.

Palavras-chave: Bacterioclorina. Terapia fotodinâmica. Fotoinativação.

RODRIGUES, Andréia da Cruz. **Use of derivatives os natural porphyrinoids in the inactivation of microorganisms using photodynamic therapy**

2022. 67 pages. Dissertation Interdisciplinary Postgraduate Program in Energy and Sustainability Federal University of Latin American Integration (UNILA), Foz do Iguaçu, 2022.

ABSTRACT

The use of photosensitizers derived from porphyrinoid natural products has shown promise when associated with photodynamic therapy (PDT). This therapy is a technique that uses a photosensitizer (natural or synthesized), light and molecular oxygen. The combination of these three components leads to the formation of reactive species that cause cell death. PDT has been standing out in applications in the health area, such as cancer treatment, dermatological treatments, mycosis treatments and others. However, it is still necessary to develop new, more efficient photosensitizers. In this sense, the objective of this work was to obtain a new photosensitizer, with good results against the inactivation of microorganisms, especially those resistant to different types of drugs. Initially, the purple bacterium (*Rhodopseudomonas faecalis*) was cultivated in the laboratory. Afterwards, the bacteriochlorophyll *a* pigment was extracted using a methanol/H₂SO₄ solution to obtain the photosensitizer called bacteriochlorin. From the bacteriochlorin, structural modifications were carried out in order to make it more efficient in effectively and sustainably inactivating microorganisms. This reaction was maintained under a nitrogen atmosphere to avoid oxidation and protected from light to prevent photodegradation. After the extraction process, a transesterification reaction was carried out with a solution of methanol/H₂SO₄ (5%). Subsequently, the substituent Trizma® [Tris(hydroxymethyl)aminomethane] was inserted into the bacteriochlorin in order to increase its solubility. Finally, the photoinactivation tests of microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas aeruginosa*) were performed, using PDT, the irradiation source was a biotable (780 nm). The results showed that photoinactivation was promising for the inactivation of the tested microorganisms, except for *Pseudomonas aeruginosa*. With this study, it was possible to obtain two bacteriochlorin-type porphyrinoid photosensitizers (derived from a bacterium) that are efficient in inactivating disease-causing microorganisms, and that may solve health problems, thus being able to help society through technologies associated with products natural resources in a more sustainable way, aiming at improvements in the health area and, consequently, in the well-being of society.

Key words: Bacteriochlorin. Photodynamic therapy. Photoinactivation.

RODRIGUES, Andréia da Cruz. **Uso de derivados de productos naturales porfirinoides en la inactivación de microorganismos mediante terapia fotodinámica.** 2022. 67 paginas. Tesis de Maestría (Maestría Interdisciplinaria en Energía y Sustentabilidad) – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2022.

RESUMEN

El uso de fotosensibilizadores derivados de productos naturales de porfirinoides se ha mostrado prometedor cuando se asocia con la terapia fotodinámica (PDT). Esta terapia es una técnica que utiliza un fotosensibilizador (natural o sintetizado), luz y oxígeno molecular. La combinación de estos tres componentes da lugar a la formación de especies reactivas que provocan la muerte celular. La PDT viene destacándose en aplicaciones en el área de la salud, como tratamiento del cáncer, tratamientos dermatológicos, tratamientos de micosis y otros. Sin embargo, todavía es necesario desarrollar nuevos fotosensibilizadores más eficientes. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue obtener un nuevo fotosensibilizador, con buenos resultados frente a la inactivación de microorganismos, especialmente aquellos resistentes a diferentes tipos de fármacos. Inicialmente, la bacteria púrpura (*Rhodopseudomonas faecalis*) se cultivó en el laboratorio. Posteriormente, se extrajo el pigmento de bacterioclorofila *a* mediante una solución de metanol/H₂SO₄ para obtener el fotosensibilizante denominado bacterioclorina. A partir de la bacterioclorina se realizaron modificaciones estructurales con el fin de hacerla más eficiente en la inactivación efectiva y sostenible de microorganismos. Esta reacción se mantuvo en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación y protegida de la luz para evitar la fotodegradación. Luego del proceso de extracción, se llevó a cabo una reacción de transesterificación con una solución de metanol/H₂SO₄ (5%). Posteriormente, se insertó en la bacterioclorina el sustituyente Trizma® [Tris(hidroximetil)aminometano] para aumentar su solubilidad. Finalmente, se realizaron las pruebas de fotoinactivación de microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* y *Pseudomonas aeruginosa*), utilizando PDT, la fuente de irradiación fue una biotabla (780 nm). Los resultados mostraron que la fotoinactivación fue prometedora para la inactivación de los microorganismos probados, a excepción de *Pseudomonas aeruginosa*. Con este estudio se logró obtener dos fotosensibilizadores porfirinoides tipo bacterioclorina (derivados de una bacteria) que son eficientes en la inactivación de microorganismos causantes de enfermedades, y que pueden solucionar problemas de salud, pudiendo así ayudar a la sociedad a través de tecnologías asociadas a productos naturales recursos de forma más sostenible, visando mejoras en el área de la salud y, consecuentemente, en el bienestar de la sociedad.

Palabras clave: Bacterioclorina. Terapia Fotodinámica. Fotoinactivación.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Objetivos do Desenvolvimento Sustentável.....	13
Figura 02 – Exemplos de fármacos provenientes de plantas	15
Figura 03 – Estruturas das moléculas de clorofila, hematoporfirina e Tookad solúvel®.....	16
Figura 04 – Diagrama de Jablonski modificado	18
Figura 05 – Esquema do processo da Terapia Fotodinâmica	19
Figura 06 – Representação das posições dos anéis pirrólicos em diferentes fotossensibilizadores.....	20
Figura 07 – Espectros de UV-vis característicos de: a) porfirinas, b) clorinas, c) bacterioclorinas e d) isobacterioclorinas.....	21
Figura 08 – Imagem ilustrativa do comprimento de onda e seu alcance no tecido	22
Figura 09 – Estruturas da clorofila e do Photodithazine®.....	23
Figura 10 – Espectros de UV-vis da porfirina, clorina e bacterioclorina.....	24
Figura 11 – Árvore filogenética e relações metabólicas dos principais gêneros de Proteobacteria	25
Figura 12 – Espectro de UV-Vis da Bacterioclorina Trizma	30
Figura 13 – Gráfico de fotodegradação das bacterioclorinas.....	31
Figura 14 – Estruturas dos fotossensibilizadores selecionados para a avaliação em terapia fotodinâmica.....	32
Figura 15 – Imagem da <i>biotable</i> (fonte de iluminação em 780 nm).....	32
Figura 16 – Gráfico da fotoinativação do <i>S.aureus</i> com 10 J/cm ²	33
Figura 17 – Gráfico da fotoinativação do <i>S.aureus</i> com 20 J/cm ²	34
Figura 18 – Gráfico da fotoinativação do <i>S.aureus</i> com 30 J/cm ²	35
Figura 19 – Gráfico da fotoinativação do <i>M. luteus</i> com 10 J/cm ²	37
Figura 20 – Gráfico da fotoinativação do <i>M. luteus</i> com 20 J/cm ²	38
Figura 21 – Gráfico da fotoinativação do <i>M. luteus</i> com 30 J/cm ²	39
Figura 22 – Gráfico da fotoinativação do <i>M. luteus</i> com 30J/cm ² e 45, 60 e 75 µM	39
Figura 23 – Gráfico da fotoinativação da <i>P. aeruginosa</i>	41
Figura 24 – Gráfico da <i>C. albicans</i> ATCC 475 com 30 J/cm ²	43
Figura 25 – Gráfico da <i>C. albicans</i> ATCC 475 com 30 J/cm ²	44
Figura 26 – Gráfico da <i>C. albicans</i> ATCC 90028 com 30 J/cm ²	45
Figura 27 – Gráfico da <i>C. albicans</i> ATCC 90028 com 45 J/cm ²	46
Figura 28 – Fluxograma do procedimento experimental.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Dados estatísticos ANOVA.....	48
---	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01 – Síntese dos FS escolhidos para o estudo.....	29
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 PARADIGMAS DA SUSTENTABILIDADE	13
1.2 FÁRMACOS NATURAIS.....	14
1.3 PRODUTOS NATURAIS PORFIRINÓIDES.....	15
1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA	16
1.5 FOTOSENSIBILIZADORES	19
1.6 BACTÉRIAS PÚRPURAS NÃO SULFUROSAS.....	25
1.7 FOTOINATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS	26
1.8 OBJETIVOS.....	28
2 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
2.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS E TESTE DE FOTODEGRADAÇÃO.....	29
2.2 AVALIAÇÃO FOTODINÂMICA.....	33
2.2.1 Fotoinativação do microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.2.2 Fotoinativação do microrganismo <i>Micrococcus luteus</i>	37
2.2.3 Fotoinativação do microrganismo <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
2.2.4 Fotoinativação do microrganismo <i>Candida albicans</i>	43
2.3 DADOS ESTATÍSTICOS.....	48
3 CONCLUSÃO.....	49
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	50
REFERÊNCIAS	55
ANEXOS.....	62

1 INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO GERAL

O bem-estar e saúde são prioridades na vida do ser humano o qual, a milênios vem buscando maneiras de sanar os problemas e induzir a cura para diversas doenças. Muitas técnicas medicinais foram descobertas para auxiliar a medicina e oferecer um tratamento adequado, com qualidade e humanizado.

Nos tempos antigos até os nossos dias atuais, ervas, plantas e diversos produtos naturais oriundos do meio ambiente, fazem parte do processo de cura de muitas afecções, tornando-se por muitas vezes o único recurso disponível. Gerações passaram e o conhecimento a respeito dessas plantas e demais substâncias bem como a sua utilização, assim, estes compostos se tornaram alvo de estudos em laboratórios, com isso medicamentos foram formulados a base de toxinas e substâncias farmacológicas presentes nas estruturas vegetativas (LAHLOU, 2013; SANTOS, 2013).

Esse processo deu margem a procura de outros produtos naturais para auxiliarem na saúde populacional, considerando a sua origem natural, o fácil acesso e o benefício que causam. Além disso, o ramo que utiliza esses produtos naturais também se expandiu, métodos alternativos de combate a doenças foram desenvolvidos, e uma delas é denominada Terapia Fotodinâmica (TFD), que é uma técnica médico terapêutica que se estende desde a inativação de agentes patológicos, redução de tumores (e posteriormente a cura), tratamentos odontológicos, até a erradicação de larvas de *Aedes aegypti* no meio natural (BAGNATO, 2017).

A TFD é uma técnica promissora, pois é considerada pouco invasiva, dando condições maiores de bem-estar aos pacientes, e também pode ser associada as demais intervenções médicas. Das extensões da Terapia Fotodinâmica a fotoinativação é a que consiste em inativar microrganismos capazes de causar infecções, utilizando compostos extraídos de produtos naturais como elemento essencial para a aplicação da técnica (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; SILVA et al., 2014).

Essa é a abordagem principal desta dissertação, a aplicação da fotoinativação, usando compostos extraídos da natureza, gerando um ciclo sustentável e promissor na pesquisa com produtos naturais e sua capacidade de combater doenças infecciosas.

1.1 PARADIGMAS DA SUSTENTABILIDADE

A importância da pesquisa em sustentabilidade vem de um desses viés, encontrar maneiras favoráveis tecnologicamente, utilizando a natureza, sem degradá-la ou diminuir essa degradação usando ferramentas mais eficientes, podendo inclusive reutilizar resíduos de outros produtos (KEMERICH et al., 2014).

A Organização das Nações Unidas (ONU), disponibilizou dezessete metas para o desenvolvimento sustentável, para serem implementadas nos próximos anos (Figura 1), essas metas servem para guiar as pesquisas e propor mudanças significativas nos problemas sociais atuais (ONU BRASIL, 2020).

Figura 1. Objetivos do Desenvolvimento Sustentável.



Fonte: ONU BRASIL, 2020.

Dentre essas metas, a pesquisa com TFD e o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores (FS), se adéquam no Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3, que se refere à saúde e bem-estar, colaborar com pesquisas e desenvolvimento de vacinas e medicamentos para o tratamento de patologias transmissíveis e não transmissíveis nos países em desenvolvimento, fornecendo acesso a medicamentos essenciais e vacinas a preços acessíveis (ONU BRASIL, 2020).

Segundo Aquino (2020), os objetivos de desenvolvimento sustentável partiram das decorrências da Rio+20, e foram construídos a partir de três pilares de desenvolvimento, o econômico, o social e o ambiental. Procuram garantir direitos humanos, combater a desigualdade e injustiça, e dar maior acessibilidade à saúde, bem como solucionar problemas globais atuais.

Partindo desse ponto, a sociedade vem buscando diferentes alternativas para melhoria da manutenção da vida e da sociedade, fontes renováveis de energia, medicamentos alternativos eficientes, biocombustíveis, processos viáveis que ajudem na qualidade de vida e do meio ambiente.

1.2 FÁRMACOS NATURAIS

Desde os tempos remotos, extratos de plantas, microrganismos, minerais e animais, eram os únicos recursos disponíveis para ajudar no tratamento de afecções e doenças (LAHLOU, 2013).

Produtos naturais são compostos químicos ou substâncias oriundas de seres vivos da natureza, apresentando desempenho farmacológico ou biológico, posteriormente sendo utilizado na exploração de novos fármacos (LAHLOU, 2013).

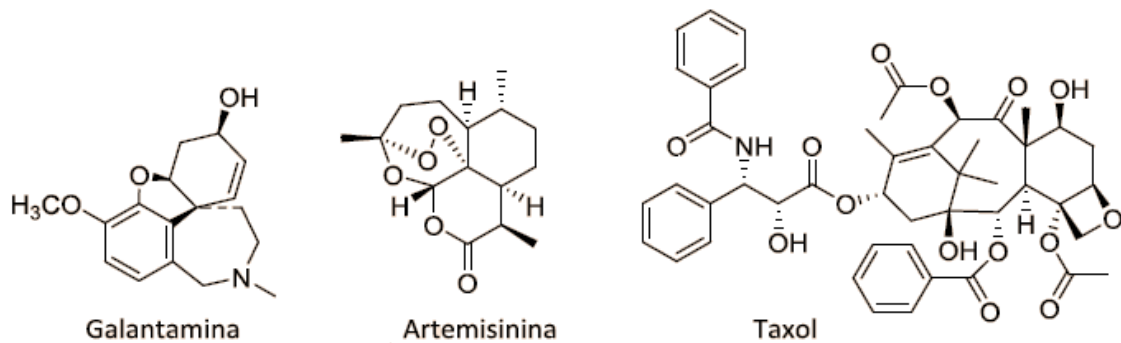
Os produtos naturais possuem diversas formas de uso, como por exemplo *in natura* (plantas medicinais), preparados fitoterápicos (quimicamente caracterizados em fórmulas farmacêuticas), substâncias puras (penicilina), além disso suas estruturas químicas podem ser manipuladas e utilizadas na síntese de outros derivados ajudando nas suas propriedades farmacológicas (RODRIGUES, 2018).

Os compostos com atividades biológicas são alvos de interesse na área farmacêutica, inspirando a busca de novas drogas medicamentosas. O uso clínico de medicamentos são de procedência *in natura* (natural) ou quimicamente sintetizados a partir deles. Assim, plantas e outros seres vivos são interessantes na produção de novos compostos por possuírem uma fonte de substâncias que produzem em seu metabolismo e que auxiliam em sua evolução e defesa (SANTOS, 2013).

A exploração dos produtos naturais bioativos com características físico-químicas com a diversidade de elementos farmacológicos, são importantes no andamento das descobertas de novos fármacos. Dados do *Dictionary of Natural Products* supõe que cerca de 80% dos compostos catalogados possuem propriedades pertinentes para serem referências de fármacos (BERLINCK et al., 2017).

As plantas com interesse farmacológico passam por processos de extração, fracionamento, purificação e isolamento, resultando em algumas substâncias bioativas que posteriormente são identificadas e testadas, dando origem a um novo fármaco. Encontram-se exemplos de fármacos provenientes de plantas e usados no tratamento de doenças como Alzheimer, malária e câncer, por essa ordem, galantamina, artemisinina e o taxol (Figura 2) (CASANOVA; COSTA, 2017).

Figura 2. Exemplos de fármacos provenientes de plantas



Fonte: CASANOVA; COSTA, 2017.

1.3 PRODUTOS NATURAIS PORFIRINÓIDES

A indústria farmacêutica busca inspiração em produtos naturais, uma vez que existe uma grande quantidade de fármacos em uso clínicos que são de origem natural, ou quimicamente modificados, como antibióticos por exemplo, no entanto o nível que os fármacos estão sendo utilizados pela população é muito alto, o que vem trazendo consequências no controle de infecções, viabilizando a propagação de espécies resistentes, como é o caso de algumas bactérias (BAGNATO, 2017).

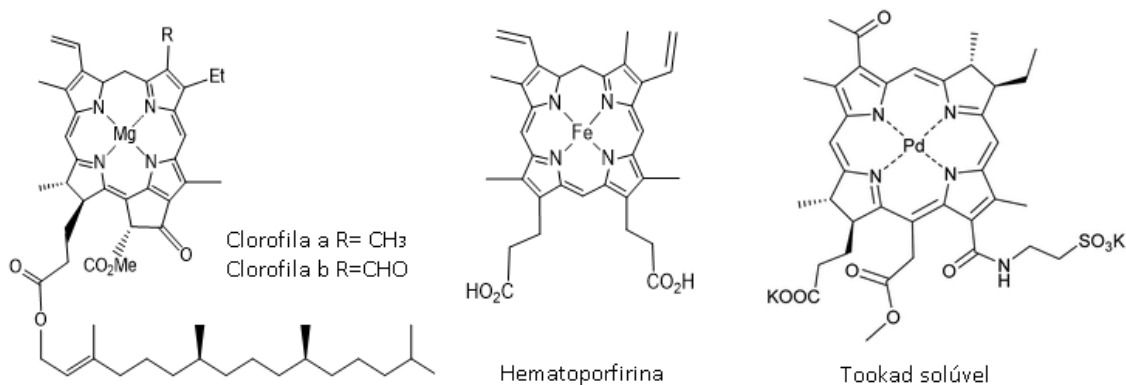
Os derivados porfirinóides, podem ser provenientes de produtos naturais ou podem ser sintetizados em laboratório, os mesmos apresentam funções vitais em alguns casos. Temos como um exemplo o pigmento clorofila, fundamental para a vida vegetal, pois é responsável pela fotossíntese. A fotossíntese envolve uma reação de fotocatalise, sendo assim, a natureza nos dá indícios de que a fotocatalise é efetiva até mesmo em processos bastante complexos, proporcionando uma inspiração sobre o uso de reações fotocatalisadas na terapia fotodinâmica (TFD) (BATTERSBY, 2000).

A hematoporfirina, outro composto porfirínóide de extrema importância (Figura 3), presente no sangue é responsável pelo transporte de oxigênio, sendo fundamental para a vida (FERREIRA, 2015).

Alguns pigmentos orgânicos, do tipo clorofila, bacterioclorofila, curcumina e outros, têm chamado atenção nos últimos anos devido a sua eficiência frente a TFD, pois quando ativados com luz na presença de oxigênio, geram espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais, as quais são utilizadas em processo terapêutico conhecido como Terapia Fotodinâmica (GUOLIN et al., 2003).

A bacterioclorina é um exemplo de produto porfirínóide que é extraída de uma bactéria purpura e modificada em laboratório a fim de tornar-se mais efetiva para utilização em TFD. A bacterioclorina foi denominada **TOOKAD Solúvel®** e está sendo comercializada para o tratamento de câncer de próstata, com resultados bastante promissores (STRATEN et al., 2017) (Figura 3).

Figura 3. Estruturas das moléculas de clorofila, hematoporfirina e Tookad solúvel®



Fonte: AUTORA, 2020.

1.4 TERAPIA FOTODINÂMICA

A TFD é uma técnica médico terapêutica, empregada em várias áreas da saúde com enfoque no tratamento eficiente e menos prejudicial ao paciente e seu corpo. Uma dessas áreas é a dermatologia, a qual utilizada a TFD em tratamentos de afecções de pele, variando desde pequenas infecções causadas por bactérias a neoplasias (HAMBLIN; JORI, 2011).

Apesar de ser um modelo medicinal empregado em maior abrangência e

estudado nas últimas décadas, a TFD é milenar, porém pouco difundida no passado. Ela começou a ser estudada em 1900 na Alemanha por Oscar Raab pesquisador sob a orientação de Hermann von Tappeiner. Ele observou que as células do *Paramecium caudatum* quando expostas à luz e em contato com a acridina morriam aceleradamente. Ainda, reparou que em dias de intempérie, essas células se comportavam de maneira diferente, sendo assim o início da utilização da terapia fotodinâmica (MOAN; PENG, 2003).

Conforme Ferreira (2015), embora haja várias descobertas sobre a TFD no século XX, como por exemplo, em 1924, Policar observou que havia uma grande quantidade de hematoporfirina concentrada nas células tumorais, e que elas agiam com a infusão de luz no local destruindo-as. Foi somente na década de 60 que os resultantes da hematoporfirina foram empregados para identificar tumores.

Em 1978, foi realizado o primeiro teste clínico utilizando a hematoporfirina como agente sensibilizador para vários tipos de câncer, tais como, mama, cólon, pele e próstata. Essas descrições foram realizadas por Dougherty, que, além disso, foi o responsável por purificar a hematoporfirina dando origem ao composto denominado de Photofrin II que em 1993 no Canadá, foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como sendo o primeiro fotossensibilizador, sendo disponível para ser comercializado para o tratamento do câncer (DHANESHWAR et al., 2014).

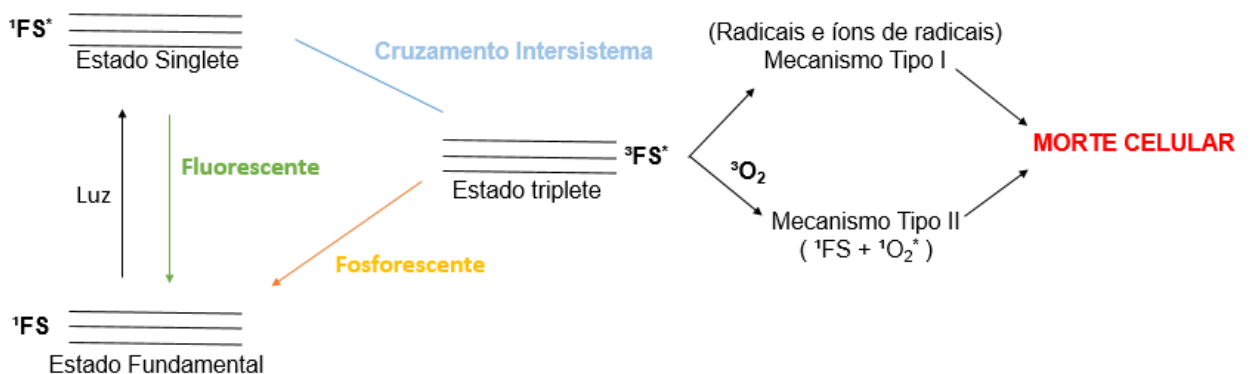
A TFD é uma técnica terapêutica fotoquímica que utiliza três componentes essenciais, a luz, um agente fotossensibilizador (FS) e o oxigênio. Quando associados, geram espécies reativas que levam a destruição do tecido específico (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Após receber um comprimento de onda específico, o FS é estimulado para seu estado eletrônico mais excitado (estado singleto - $1FS^*$), quando retorna ao seu estado fundamental, ele é capaz de emitir energia em forma de luz fluorescente ou ainda pode fazer com que aconteça um processo de inversão de spin (cruzamento de sistemas) favorecendo seu deslocamento para o estado mais energético (triplete excitado - $3FS^*$). Quando o FS excitado volta ao seu estado fundamental, ele perde fosforescência, mas no estado triplete excitado, alguns pigmentos dispõem de níveis de energia apropriados para efetivar transferências de energia para o oxigênio molecular (O_2). Assim, o oxigênio molecular que ocorre espontaneamente no estado triplete (3O_2) é fotoexcitado pelo agente fotossensibilizador ($^3FS^*$) em direção ao estado singleto (1O_2), conforme demonstrado na figura 4 (De OLIVEIRA et al., 2015).

O oxigênio singleto é bastante reativo, causando danos as células e posteriormente causando a morte das mesmas (apoptose/necrose), essa ação é chamado de mecanismo tipo II. (MANOEL et al., 2014). No processo que denominamos como o mecanismo tipo I é quando há a formação de espécies radicais ou peróxidos, esse fenômeno pode acontecer em maior ou menor número dependendo do FS utilizado. Nos dois mecanismos, ocorrem o desenvolvimento de espécies reativas do oxigênio (ROS), e na TFD os mais significativos para serem usados é o oxigênio singleto, formado através do mecanismo II (De OLIVEIRA et al. 2015; MANOEL et al., 2014).

Os componentes, luz, fotossensibilizador e oxigênio, individualmente não são considerados tóxicos, mas em conjunto, produzem espécies reativas de oxigênio (oxigênio singleto) ou espécies radicalares que oxidam moléculas bioativas causando a morte celular (SHARMA, 2013).

Figura 4. Diagrama de Jablonski modificado.



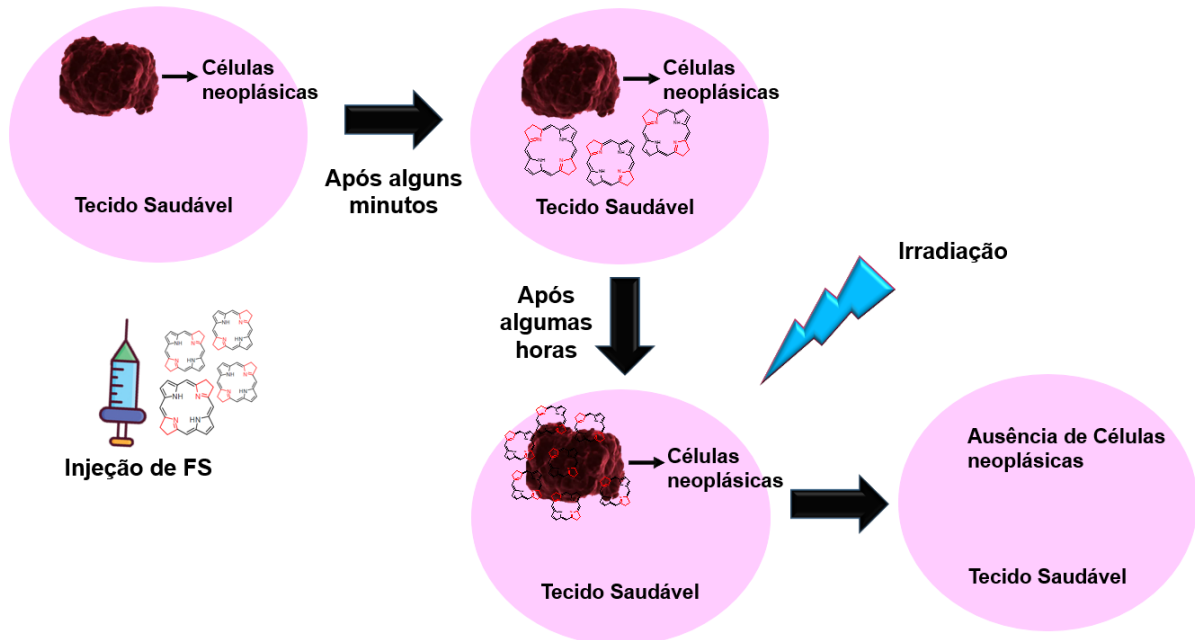
Fonte: Adaptado de De OLIVEIRA et al., 2015.

A TFD tem sido utilizada de forma sistêmica ou tópica. Muitas vezes ela auxilia e podendo competir com quimioterapia e radioterapia utilizada no tratamento de vários tipos de câncer, com a vantagem de ser menos agressiva (PELLOSI et al., 2016).

Uma vantagem de utilizar a TFD é atingir o tecido desejado sem comprometer os demais, se tornando uma técnica mais seletiva, visto que na maioria das vezes o FS se localiza nos tecidos doentes. Na figura 5, temos uma representação de como funciona a TFD em um tratamento de forma sistêmica. Inicialmente, o fotossensibilizador é aplicado no paciente, após algumas horas o fotossensibilizador se localiza no tecido doente, após, ele é irradiado com um comprimento de luz específica a fim de ativá-lo. O mesmo, na presença de oxigênio, gera espécies reativas de oxigênio

que poderão causar danos nas células doentes, como por exemplo, reações de oxidação, danificando as mesmas e conseqüentemente levando a morte celular (VOLLET-FILHO; INADA, 2017).

Figura 5. Esquema do processo da Terapia Fotodinâmica.



Fonte: AUTOR, 2020.

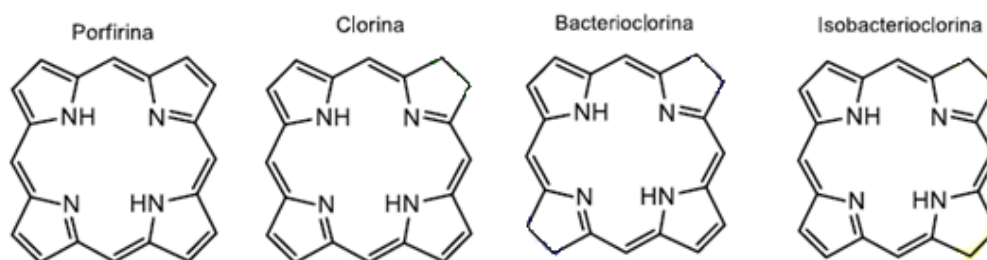
Essa técnica medicinal pode ser utilizada também de forma agregada a outras técnicas mais convencionais, como a quimioterapia e a radioterapia, podendo atuar na redução de tumores antes de uma intervenção cirúrgica (FERREIRA, 2015).

1.5 FOTOSSENSIBILIZADORES

Os FS, como o próprio nome se refere, são compostos sensíveis a luz, os compostos porfirínicos propriamente ditos, são classificados em quatro classes, (Figura 6) os quais apresentam em suas estruturas quatro anéis pirrólicos ligados entre si por átomos de carbono, com uma conjugação de elétrons, o que conferem uma emissão de luz no espectro do visível e ultravioleta próximo (BAGNATO, 2017; De OLIVEIRA et al., 2015).

Os compostos porfirínicos se classificam em: clorinas, porfirinas, isobacterioclorinas e bacterioclorinas, as quais diferem no número de elétrons e na posição das duplas ligações (FUJITA, 2015).

Figura 6. Representação das posições dos anéis pirrólicos em diferentes fotossensibilizadores.



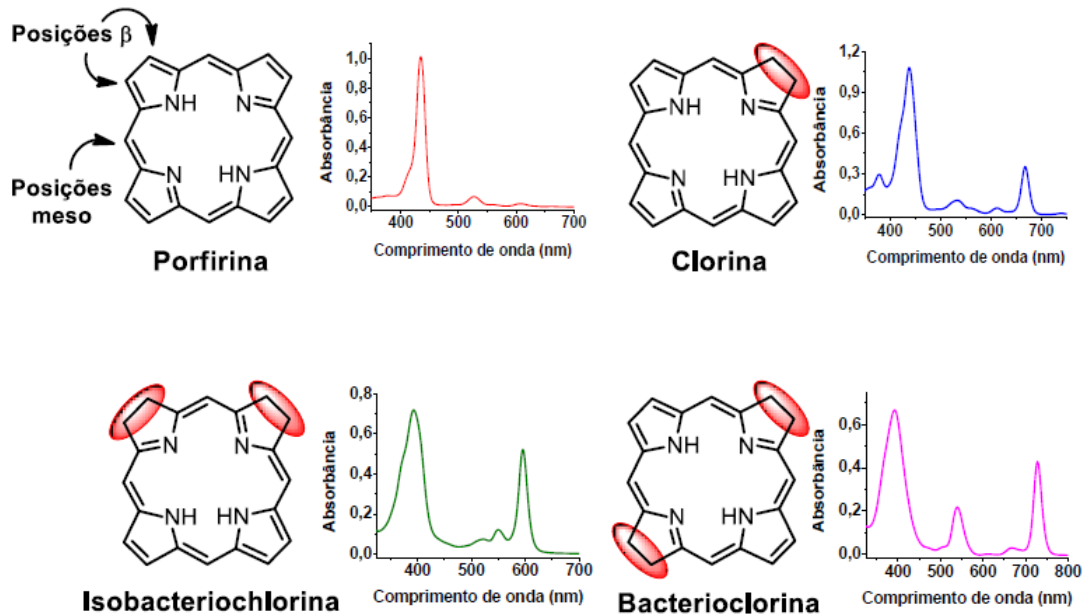
Fonte: PEREIRA, 2020.

De acordo com Carey e Sundberg (2007), estas substâncias tetrapirrólicas são consideradas todas aromáticas, independentemente de seu número de elétrons π . As porfirinas possuem vinte e dois elétrons π , porém somente dezoito compõem a estabilização aromática do agrupamento. As clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas também são aromáticas conforme a disposição de Hückel para o quesito aromaticidade de compostos possuindo $(4n+2)$ elétrons π .

A alta quantidade de ligações duplas nos compostos porfirinóides, fazem com que estes compostos apresentem absorção na região do visível no espectro eletromagnético, que pode ser observada pela apresentação de cor, sendo um fator típico dessas substâncias (GOUTERMAN, 1978).

Tais estruturas apresentam o espectro do visível característico por bandas de absorção de luz, sendo elas, banda Soret com absorção aproximadamente em 400 nm e refletem 18 elétrons π dando o aspecto de aromaticidade marcante dos compostos, e a banda Q, que é constituída ainda por outras quatro bandas de menor intensidade, que é entre 480 nm e 800 nm (Figura 7). Espectros de ultravioleta do visível nas substâncias derivadas das porfirinas reduzidas, clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas, expressam distinções consideráveis, especialmente nas bandas Q, que exibem anéis aromáticos com núcleos conjugados. Por isso a técnica de UV-vis é utilizada no reconhecimento dos diferentes compostos tetrapirrólicos (DOLPHIN et al., 1994).

Figura 7. Espectros de UV-vis característicos de porfirinas, clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas.



Fonte: ASSIS, 2016.

Os fotossensibilizadores para serem empregados na terapia fotodinâmica precisam possuir algumas características essenciais para que se caracterizem como um bom composto fotossintetizante. Tais elementos apropriados são: possuir características fotofísicas favoráveis, baixa toxicidade no escuro, uma fotossensibilidade pouco prolongada, formulação simples sendo reproduzível e estável, rápida eliminação do organismo, propensão na obtenção em escala industrial e custo acessível, ampla afinidade de absorção no tecido doente em relação ao tecido saudável, entre outros (SIMPLICIO et al., 2002).

Ao longo dos anos, os fotossensibilizadores foram passando por alterações para garantir uma melhor eficácia na terapia fotodinâmica, e constituíram três gerações de fotossensibilizadores. Os de primeira geração foram classificados como os derivados da hematoporfirina, que originou o fármaco Photofrin®, mas como apresentava poucas características ideais (como por exemplo sua atividade fotossensível longa), é bastante desvantajosa sua utilização. Os de segunda geração foram projetados com o intuito de diminuir a fotossensibilidade prolongada e conseguirem absorver um comprimento de onda maior, próximo ao vermelho os principais fotossensibilizadores incluídos nessa geração são, o Visudyne®, Foscan®, Photoditazine® e o Levulan® (ULIANA et al., 2017).

Os fotossensibilizadores considerados de terceira geração, ou a geração de fármacos mais inteligentes, foram desenvolvidos a partir dos da segunda geração e

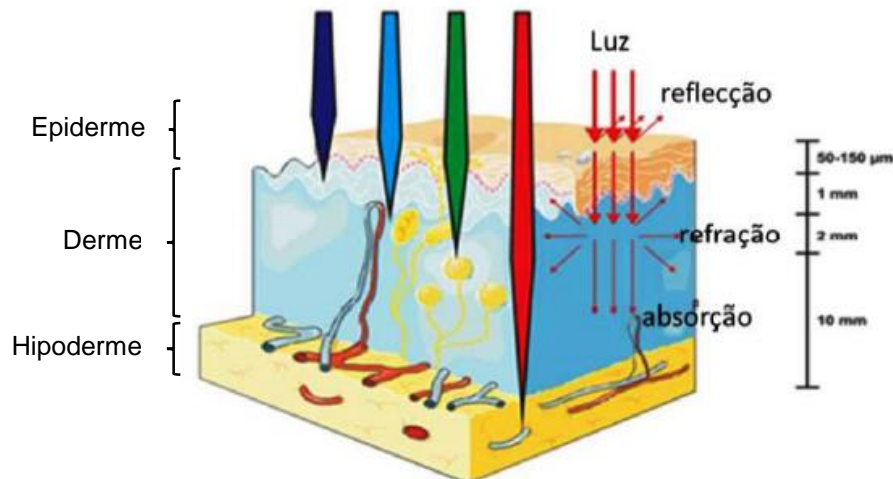
combinados com anticorpos, polímeros, e outras moléculas que orientam seletivamente o fotossensibilizador para o tecido doente (YOON et al., 2013).

Em relação a influência da luz nos fotossensibilizadores e sua interação com o tecido, é uma função complexa e são dependentes do comprimento de onda que é emitido, isso comanda sua absorção e seu espalhamento no tecido (HENDERSON; DOUGHERTY, 1992).

De acordo com Menezes e Perussi (2006) e Carvalho (2001), os tecidos normais englobam várias substâncias que absorvem ou espalham radiação eletromagnética, exemplo disso são as proteínas e o Ácido Desoxirribonucleico (DNA) que absorvem na faixa ultravioleta de 200-350 nm, a melanina e a hemoglobina que absorvem na faixa verde-amarelo 495-590 nm e a água que absorve na região do infravermelho, aproximadamente em 1200 nm.

A janela terapêutica é considerada em um comprimento de onda eletromagnética entre 600-800 nm, e é o comprimento ideal para implementação na TFD, sendo também onde o tecido acaba tornando-se “translúcido”, conforme figura 8 (VOLLET-FILHO; INADA, 2017).

Figura 8. Imagem ilustrativa do comprimento de onda e seu alcance no tecido.



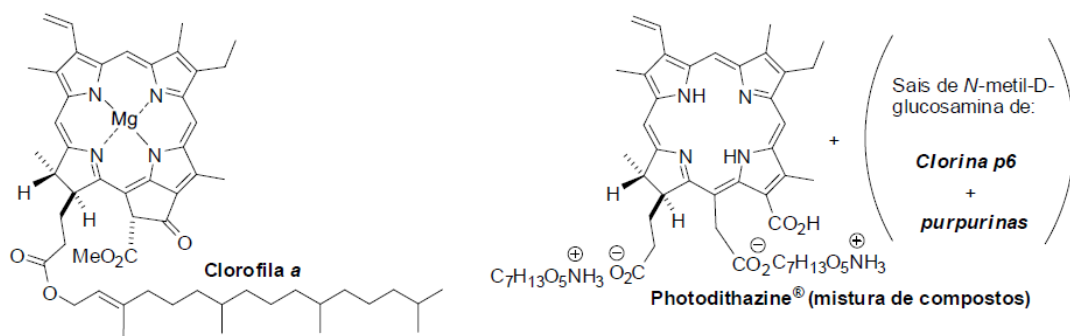
Fonte: Adaptado de AGOSTINIS et al., 2011.

Já existem vários fotossensibilizadores aprovados para serem comercializados e usados clinicamente, tais como, Photofrin® (tratamento de câncer), Foscan® (tratamento de carcinomas espinocelulares), algumas formulações do ácido aminolevulínico (ALA) e seu derivado éster metílico (M-ALA) que são pró-fármacos

(produzem porfirinas no organismo) para o tratamento de dermatologia oncológica e estética, bem como o Photogem® (tratamento de neoplasias no sistema reprodutivo feminino), Tookad® (tratamento de câncer de próstata), Photodithazine® (combate a células neoplásicas), sendo que alguns de primeira geração, podem ter sua atuação menos eficiente do que os compostos da segunda e terceira geração (STRATEN et al., 2017).

Os precursores dos fotossensibilizadores mais utilizados são substâncias oriundas de produtos naturais e empregadas na ciência como fim terapêutico (Figura 9). Um exemplo é a hematoporfirina, que é encontrada no sangue e responsável por transportar oxigênio as células e tecidos, e a clorofila *a* e *b*, que são fundamentais no processo de fotossíntese nos vegetais, que podem ser encontradas em cianobactérias, como a *Spirulina máxima* (ULIANA et al., 2017).

Figura 9. Estruturas da clorofila e do Photodithazine®.



Fonte: ULIANA et al., 2017.

A curcumina também é um exemplo de substância fotossensibilizadora, no entanto não é um produto porfirinóide, ela provem de uma planta denominada açafrão-da-terra (*Curcuma longa*), e é bastante sensível a luz, sendo utilizada em vários ramos da TFD, podemos citar sua ação contra fungos causadores de micose, infecção de garganta, até o controle do mosquito *Aedes aegypti* transmissor da dengue (SOUZA et al., 2017).

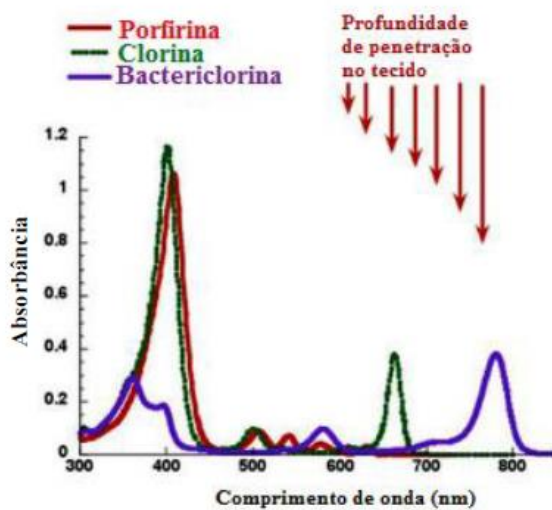
Em um estudo de inativação de *Trichophyton mentagrophytes* usando os FS Photogem®, Curcumina, Clorina e-6 e Clorina butil, a curcumina foi eficaz, além disso utilizando uma concentração 100 vezes menor que os outros FS, sendo indicada para o tratamento de onicomicose causada por esse fungo (SILVA et al., 2022).

As bacterioclorinas são compostos tetrapirrólicos, normalmente encontrada em bactérias púrpuras, na sua estrutura se encontram dois de seus anéis pirrólicos reduzidos. Estas apresentam uma absorção de luz na região do vermelho e

infravermelho próximo, o que é bastante interessante para sua utilização frente a terapia fotodinâmica (TFD), uma vez que apresenta maior penetração na pele, permitindo assim tratar lesões mais profundas. Uma bacterioclorina que está sendo utilizada como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica, e está apresentando excelentes resultados é a bacterioclorina chamada Tookad solúvel® (Figura 3), que está sendo usada para o tratamento de câncer de próstata (CHEN, 2002).

Bacterioclorinas e clorinas são os FS mais indicados e atribuídos a TFD, isso se deve pelo fato de ambas terem uma banda maior de absorção (Figura 10), por tal motivo, são consideradas fotossensibilizadores de segunda geração, e por conseguirem atuar em lesões maiores, por efeito da infiltração do infravermelho (De OLIVEIRA et al., 2015).

Figura 10. Espectros de UV-vis da porfirina, clorina e bacterioclorina.



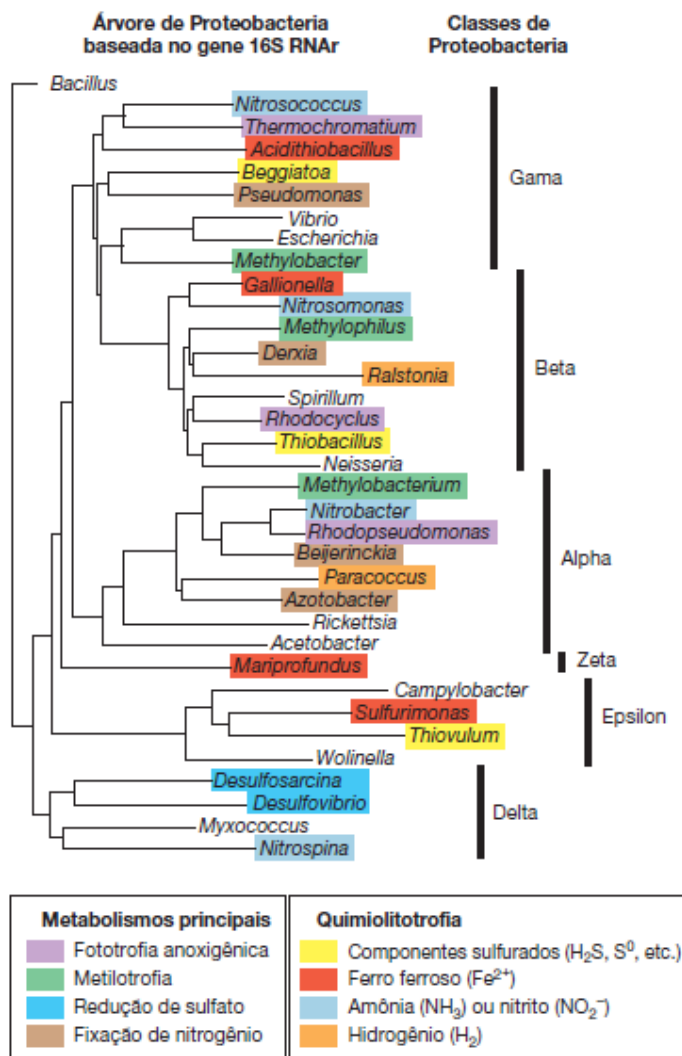
Fonte: Adaptado de BAYONA et al., 2016.

1.6 BACTÉRIAS PÚRPURAS NÃO SULFUROSAS

Bacterioclorinas são oriundas de bactérias púrpuras, classificadas no Filo Proteobactérias (Figura 11), pertencentes ao grupo das bactérias fotossintetizantes, seu pigmento também é chamado de bacterioclorofila *a* e absorvem a luz no vermelho e infravermelho próximo (ANDRADE, 2007).

Podem ser sulforosas e não sulforosas, bactérias púrpuras não sulforosas (BPNS) são considerados os microrganismos com o metabolismo mais diversificado de todos, conseguem sintetizar carotenoides que podem oferecer a eles uma diversidade de cores, variando de púrpura, vermelha, a cor de laranja, um exemplo de BPNS é a espécie *Rhodopseudomonas faecalis* (MADIGAN et al., 2016).

Figura 11. Árvore filogenética e relações metabólicas dos principais gêneros de Proteobactéria.



Fonte: MADIGAN et al., 2016.

As BPNS podem ser fototróficas, ou seja, obtêm sua energia pela luz no processo de fotossíntese anoxigênica, por esse motivo elas são encontradas em lagos e lagoas depositadas em lugares mais profundos, e ainda possuem uma gama de mecanismos que permitem seu crescimento de forma aeróbia e anaeróticamente. Além disso, são capazes de apresentar diversos mecanismos, como estruturas morfológicas e celulares, elementos bioquímicos, e também produção de variados pigmentos como a bacterioclorofila *a* (TAUFEMBACK, 2019).

1.7 FOTOINATIVAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A microbiota humana está localizada na pele, cavidade oral, trato gastrointestinal e urogenital, sistema respiratório e olhos. Nessas regiões, 70% dessas bactérias residem no trato gastrointestinal, ajudando na digestão e na defesa contra patógenos (ANTUNES, 2014).

As bactérias são agentes microscópicos que atuam no corpo humano e no ambiente como um todo, grande parte delas, auxiliam nos processos químicos e biológicos, porém quando encontrada de forma exacerbada e em condições desfavoráveis acabam desenvolvendo infecções (RAVEN et al., 2001).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2017 divulgou a lista de agentes patogênicos prioritários, que são resistentes a antibióticos. A lista traz em particular a ameaça de bactérias gram-negativas resistentes a diversos antibióticos, podendo ainda transmitir seu material genético permitindo assim, que outras bactérias se tornem resistentes (OPAS Brasil, 2017).

Elementos únicos de cada microrganismo colaboram com sua patogenicidade, ou seja, com a capacidade do mesmo de causar infecções e doenças. Existem diferentes mecanismos para se tornarem mais resistentes ou susceptíveis biologicamente. Alguns desses mecanismos são a capacidade de serem microrganismos oportunistas, serem altamente virulentos, possuírem meios de adesão (fímbrias, pili e flagelos), e alguns ainda liberarem toxinas no meio celular do hospedeiro (MADIGAN et al., 2016).

Além das bactérias, outros microrganismos como fungos são alvos de estudos com o intuito de diminuir o uso de drogas antibióticas e antifúngicas demasiadamente, que também tornam-se resistentes quando o tratamento usual é

excedido (VILELA et al., 2012).

Segundo Silva et al. (2014) e Nagata et al. (2012) a TFD propicia a erradicação de bactérias, fungos e protozoários, com uma técnica denominada Inativação Fotodinâmica de Microrganismos.

Os pesquisadores que algum tempo vem trabalhando com a fotoinativação de microrganismos têm apontado que a curcumina tem potencial como antifúngicos na ausência de luz (MARTINS et al., 2009; NEELOFAR et al., 2011).

De acordo com Egusa et al. (2008) a infecção por candidíase oral é mais frequente em pacientes com o sistema imunológico comprometido, a levedura *Candida* tem um crescimento aumentado diante deste fator, já que o sistema imunológico está com os mecanismos de defesa diminuídos.

O tratamento típico com fluconazol, nistatina e anfoteracina B tem seu funcionamento bom até certo período, e a reincidência da contaminação é grande em pacientes que fazem uso destes fármacos, além do fato do uso generalizado e por muito tempo de antifúngicos, propiciam o progresso de espécies resistentes como a *Candida albicans* (VANDEPUTTE et al., 2011).

Pesquisas *in vitro*, utilizando sangue humano infectado com vírus estão sendo empregadas na TFD. Conforme Perussi (2007), o tratamento de papilomavírus humano (HPV) com TFD local ou sistêmica provou ser eficaz, quando tratamentos convencionais não impedem de ter recorrências. O tratamento com TFD contra o HPV é capaz de reduzir as cargas virais em lesões de grau elevado de forma que os efeitos colaterais da técnica são nulos quando comparados a outros métodos (BOCCHI et al., 2021).

O primeiro teste para porfirina e sua eficácia em inativar patógenos humanos, como o vírus da hepatite A no sangue foi realizada por Casteel. O estudo avaliou o efeito de porfirinas no vírus e no sangue com uma solução salina e fosfato, exposto à luz UV em 365 nm, o qual conseguiu quase 100% de inativação, demonstrando assim, que a técnica é uma abordagem promissora e segura para remoção de vírus não envelopados (PERUSSI, 2007; CASTEEL, 2004).

Outras áreas da saúde principalmente, utilizam a terapia fotodinâmica como técnica, por ser tratar de uma maneira útil e não invasiva, tendo resultados melhores que as convencionais, inclui-se dentro delas a, desinfecção sanguínea, periodontia, desinfecção da água e tratamento antimicrobiano dos alimentos (MACHADO, 2000).

A infecção pelo vírus da COVID-19 também está sendo estudado juntamente com a TFD, e os compostos Azul de metileno e Radaclorina demonstraram um bom desempenho frente ao vírus SARS-CoV-2, acusando a inativação do mesmo em suspensões virais com baixas concentrações dos compostos (SVYATCHENKO et al., 2021).

Devido a isso, o presente estudo utilizou a classe de produtos porfirinóides (bacterioclorina), realizando a extração deste composto, seguida de pequenas modificações estruturais a fim de melhorar as características do fotossensibilizador e assim fotoinativar alguns microrganismos, como bactérias e leveduras.

1.8 OBJETIVOS

- Objetivo Geral:

Extrair o composto bacterioclorofila a a partir da bactéria púrpura *Rhodopseudomonas faecalis*, em seguida realizar modificações estruturais a fim de obter a bacterioclorina. Após a obtenção da bacterioclorina desejada, a mesma será utilizada como fotossensibilizador a fim de inativar bactérias Gram-positivas, gram-negativas e levedura, sendo os mesmos agentes patogênicos com potencial de resistência à medicação usual.

Dessa forma, a pesquisa ajudará a desenvolver um meio alternativo de tratamento e menos prejudicial ao metabolismo humano.

- Objetivos Específicos:

Isolar e realizar a modificação química do pigmento bacterioclorofila;

Realizar teste de fotodegradação dos compostos;

Aplicar a bacterioclorina modificada em terapia fotodinâmica, visando a inativação de microrganismos.

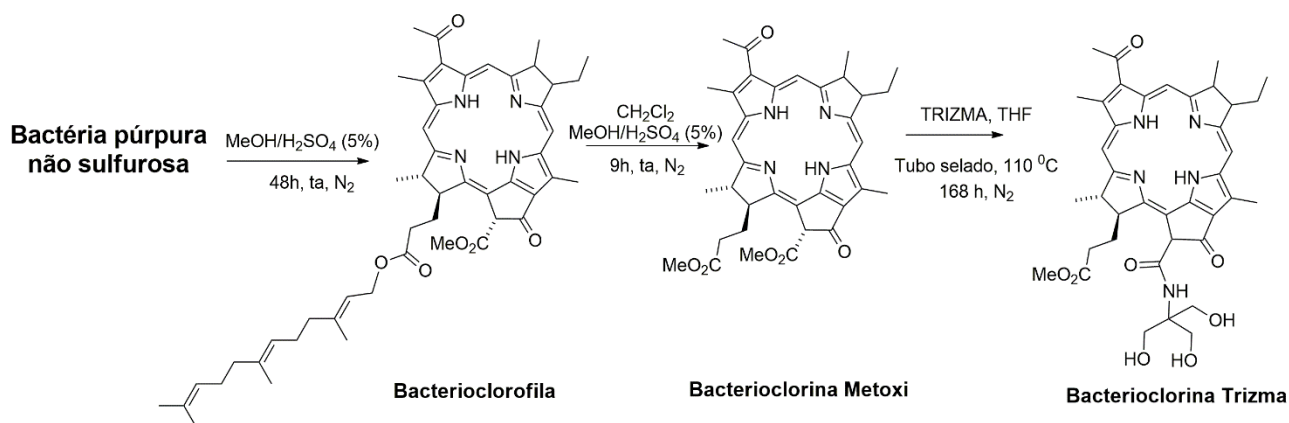
2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.1 SÍNTESE DOS COMPOSTOS E TESTE DE FOTODEGRADAÇÃO

A primeira etapa deste trabalho foi realizar a obtenção de derivados de bacterioclorinas (Esquema 1) conforme literatura (PRATAVIERA et al., 2021). Em seguida, a realização dos testes de avaliação da inativação de microrganismos frente a terapia fotodinâmica. A bacterioclorina foi selecionada por ser um fotossensibilizador promissor, pois além da sua absorção de luz na região desejada (janela terapêutica) é um fotossensibilizador que tem apresentado bons resultados.

A bacterioclorina Trizma, foi testada usando TFD, para a inativação de células tumorais de câncer de mama, pela aluna de mestrado Nahryda Samara dos Santos Lopes – Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (LOPES, 2018; PRATAVIERA et al., 2021).

Esquema 1. Síntese dos FS escolhidos para o estudo.



Fonte: AUTORA, 2020.

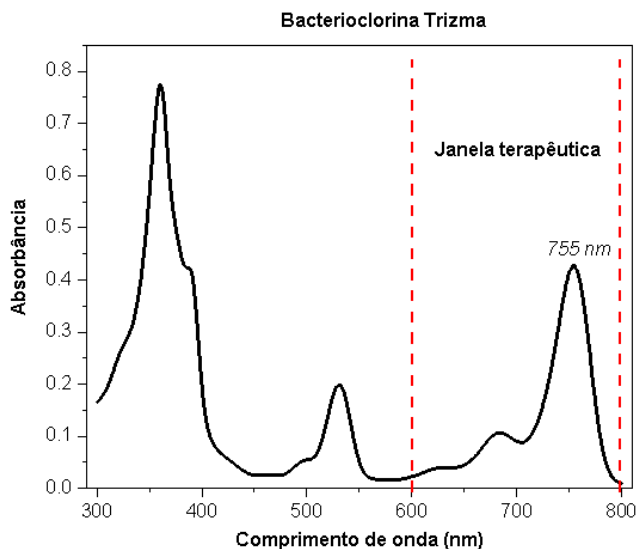
A síntese destes compostos bem como as respectivas purificações foram realizadas na UNILA a fim de obter material suficiente para a realização dos testes da TFD frente aos microrganismos.

A primeira etapa realizada foi a extração do pigmento chamado de bacterioclorofila, a mesma é realizada com metanol e H₂SO₄ (5%) sob atmosfera inerte (nitrogênio ou argônio) para evitar reações paralelas de oxidação. A reação também foi protegida da luz, uma vez que o produto é fotossensível. Após o processo de extração, obtivemos a bacterioclorofila, a qual não é muito indicada para a TFD, uma vez que a

presença do grupo fitil confere a molécula menor polaridade, deixando o fotossensibilizador menos solúvel no meio biológico. Com isso, foi realizada uma reação de transesterificação com metanol e ácido sulfúrico a fim de substituir o grupo fitil pelo grupo metóxi (mais polar), obtendo-se a Bacterioclorina Metóxi (Bac Metóxi). A mesma foi purificada por cristalização utilizando diclorometano e hexano.

Após a obtenção da bacterioclorina Metóxi, foi adicionada na mesma um substituinte chamado Trizma® [Tris(hidroximetil) aminometano], uma amina que contém três hidroxilas na sua estrutura, este substituinte foi selecionado para deixar o composto mais anfifílico, ou seja, mais solúvel em água, a fim de torná-lo mais efetivo no meio biológico (MORITZ et al., 2017). Após a modificação estrutural foi realizada a purificação por coluna cromatográfica, este composto já havia sido caracterizado por espectroscopia de RMN (PRATAVIERA et al., 2021). É possível observar na figura 12, que o espectro de UV-Vis da Bacterioclorina Trizma apresenta um pico em aproximadamente 755 nm o que é desejável para a terapia fotodinâmica, pois se localiza na região da janela terapêutica.

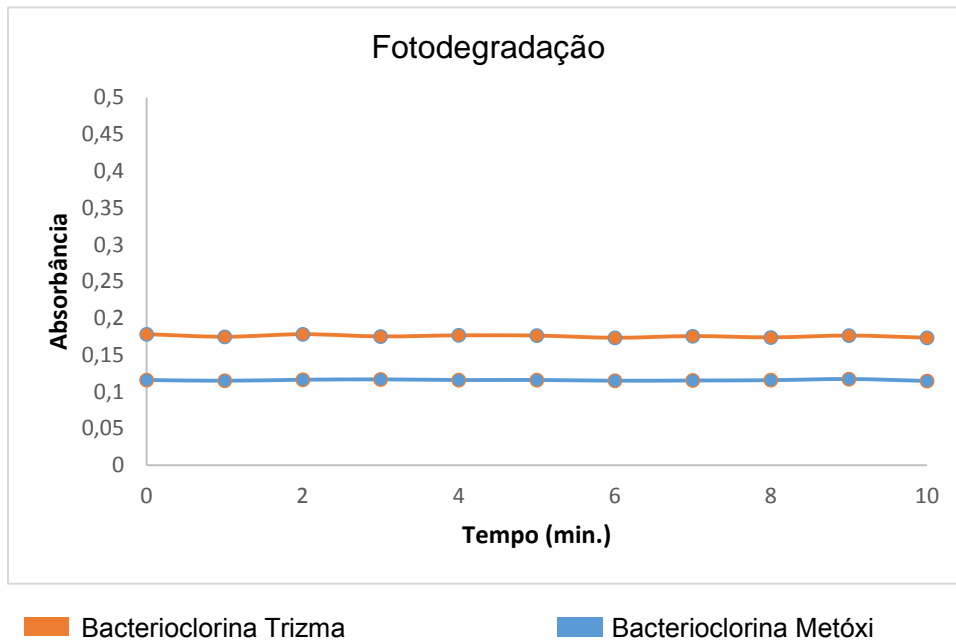
Figura 12. Espectro de UV-Vis da Bacterioclorina Trizma®.



Fonte: PRATAVIERA et al., 2021.

O teste de fotodegradação foi realizado a fim de avaliar se ambas as bacterioclorinas fotodegradavam quando expostas a luz conforme representado na figura 13. Para esse teste as bacterioclorinas foram expostas a luz de um em um minuto, durante dez minutos, e após o espectro de UV-vis verificado no espectrofotômetro em 368 nm (Banda Soret), a dose de luz utilizada foi de 14,28 J/cm² que correspondem a dez minutos de irradiação na *biotable* com iluminação de 780 nm e intensidade 24 mW/cm².

Figura 13. Gráfico de fotodegradação das bacterioclorinas.

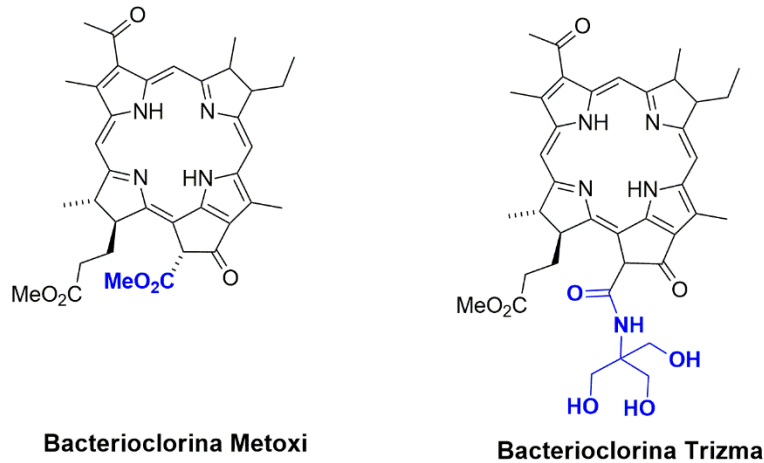


Fonte: AUTORA, 2022.

As bacterioclorinas Métoxi e Trizma avaliadas nestas condições descritas anteriormente, se mostram estáveis durante a fotodegradação, sinal de que ambas são compostos que não se degradam facilmente durante a exposição a luz. Resultado que indica que suas propriedades são adequadas para uso em TFD.

Após a obtenção dos dois fotossensibilizadores (Figura 14), a próxima etapa a ser realizada foi a avaliação fotodinâmica frente a diferentes microrganismos, a fim de avaliar sua eficiência na durante a fotoinativação dos mesmos. Para isso foram selecionados quatro microrganismos *Staphylococcus aureus* CBMAI 485 (bactéria gram-positiva), *Micrococcus luteus* CBMAI (Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria) 825/ DSMZ 20030 (bactéria gram-positiva), *Pseudomonas aeruginosa* CBMAI 489 (bactéria gram-negativa) e *Candida albicans* CBMAI 475 e ATCC 90028 (levedura).

Figura 14. Estruturas dos fotossensibilizadores selecionados para a avaliação em terapia fotodinâmica.



Fonte: AUTORA, 2021.

Para realizar a avaliação fotodinâmica frente aos microrganismos selecionados, é preciso avaliar diferentes doses de luz e diferentes concentrações de fotossensibilizador. A fonte luminosa que foi utilizada, é uma *biotable* (Figura 15) a mesma apresenta LEDs, que correspondem a uma iluminação em 780 nm com intensidade de 24 mW/cm². As culturas dos diferentes microrganismos foram transferidas para uma placa de 24 poços, e incubadas com o fotossensibilizador com diferentes concentrações durante 20 minutos. Após a incubação, as mesmas foram irradiadas na *biotable* com diferentes doses de luz, em seguida diluídas e aplicadas nas placas.

Figura 15. Imagem da *biotable* (fonte de iluminação em 780 nm).



Fonte: LOPES, 2018.

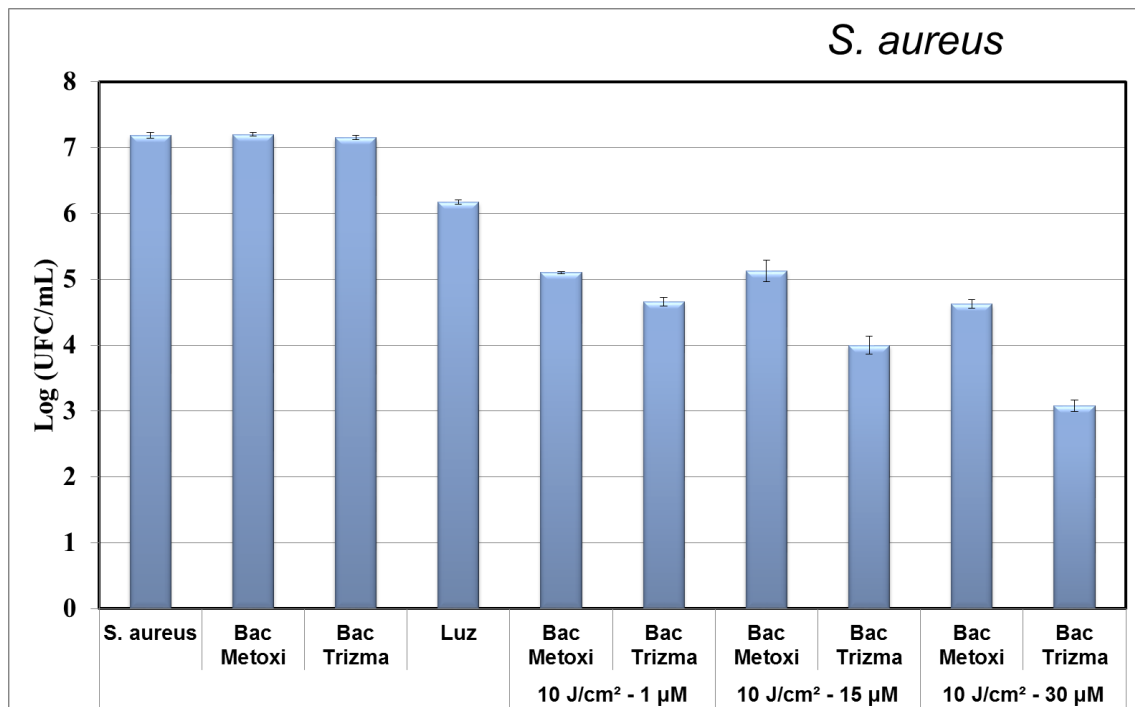
2.2 AVALIAÇÃO FOTODINÂMICA

2.2.1 Fotoinativação do microrganismo *Staphylococcus aureus*

O primeiro microrganismo a ser avaliado frente a inativação fotodinâmica foi o *S. aureus*. Inicialmente foi selecionada a dose de luz de 10 J/cm² (Figura 16) e as concentrações dos FS Bacterioclorina Metóxi e Bacterioclorina Trizma de 1, 15 e 30 µM. Neste estudo foi possível observar que os controles do microrganismo no escuro contendo 30 µM de cada FS não apresentaram toxicidade.

Quando realizado a TFD, foi observado que nessas condições ambos os fotossensibilizadores, tanto a Bacterioclorina Trizma quanto a Bacterioclorina Metóxi conseguiram diminuir as colônias de *S. aureus* com resultados promissores. Na concentração de 30 µM a Bacterioclorina Trizma conseguiu inativar aproximadamente 4 log (10) enquanto a Bacterioclorina Metóxi conseguiu inativar aproximadamente 2,5 log (10) deste microrganismo. Evidenciando que a Bacterioclorina Trizma conseguiu inativar 1,5 log (10) a mais do que a Metóxi.

Figura 16. Gráfico da fotoinativação do *S. aureus* com 10 J/cm².

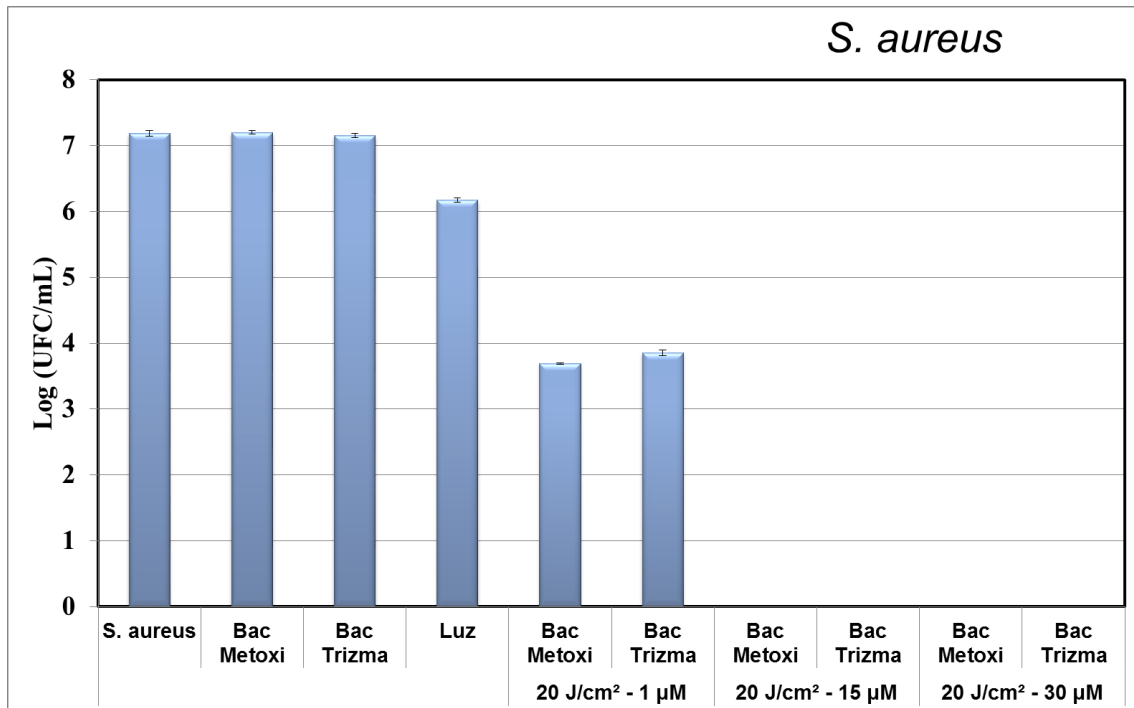


Fonte: AUTORA, 2021.

A intenção desta avaliação é inativar completamente os microrganismos,

sendo assim, aumentamos a dose de luz para 20 J/cm^2 (Figura 17). Nesta avaliação observou-se que na concentração de $1\ \mu\text{M}$ de fotossensibilizador, obteve-se uma redução de aproximadamente 3 log (10) para ambos os fotossensibilizadores. Nas concentrações de 15 e $30\ \mu\text{M}$ ocorreu a inativação dessa bactéria, mostrando resultados promissores para a inativação desse microrganismo com a Bacterioclorina Trizma e Bacterioclorina Metóxi.

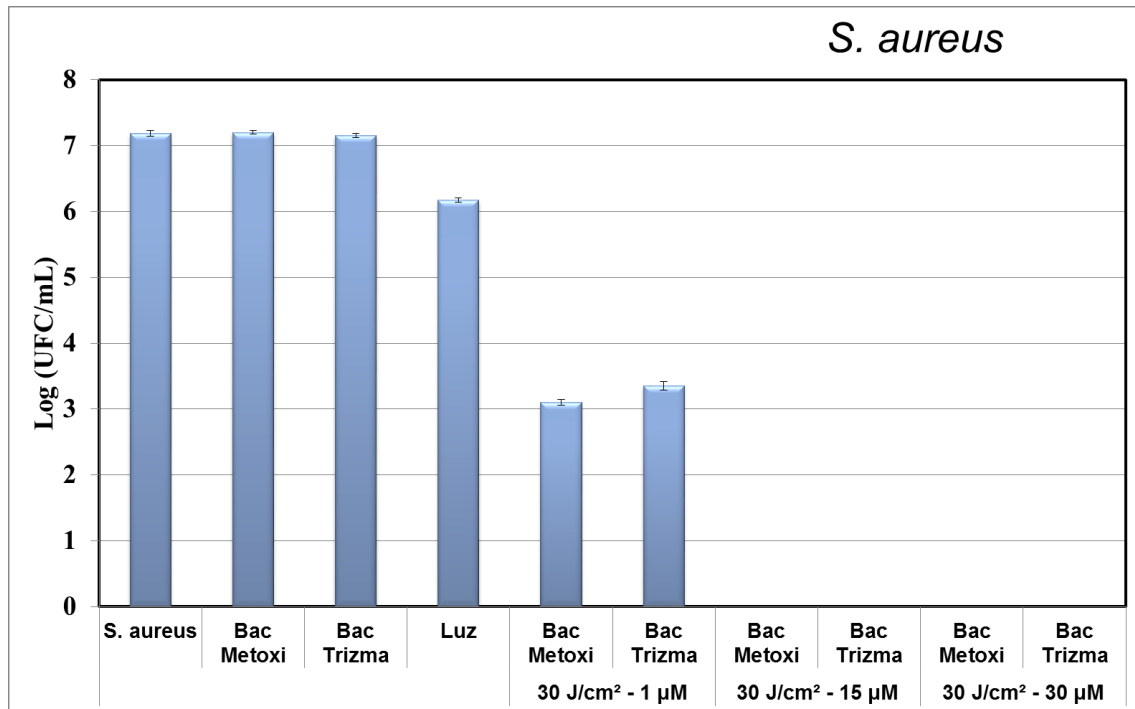
Figura 17. Gráfico da fotoinativação do *S. aureus* com $20\ \text{J/cm}^2$.



Fonte: AUTORA, 2021.

Também avaliamos a dose de luz de $30\ \text{J/cm}^2$ nas mesmas concentrações dos diferentes fotossensibilizadores (Figura 18). Da mesma forma que ocorreu a eliminação com $20\ \text{J/cm}^2$, ocorreu uma excelente inativação do *S. aureus* com $30\ \text{J/cm}^2$ dizimando as colônias dessa bactéria com as bacterioclorinas Trizma e Metóxi, potencializando ainda mais a indicação desses fotossensibilizadores para a Fotoinativação de microrganismos. Além disso, observamos a diferença da inativação com $1\ \mu\text{M}$, onde que, com a dose de luz de $30\ \text{J/cm}^2$, que conseguiu inativar aproximadamente 4 log (10), uma diferença de 1 log (10) a mais do que com a dose de luz de $20\ \text{J/cm}^2$, comprovando que a fotoinativação dos microrganismos, dependente da dose de luz bem como da concentração dos fotossensibilizadores.

Figura 18. Gráfico da fotoinativação do *S. aureus* com 30 J/cm².



Fonte: AUTORA, 2021.

Conforme os dados apresentados pode-se observar que a fotoinativação do microrganismo *S. aureus* foi efetiva nos testes, e os melhores resultados foram nas concentrações 15 e 30 µM usando as doses de luz de 20 e 30 J/cm². Quando comparamos os diferentes fotossensibilizadores testados, foi observado que os dois apresentaram atividades muito similares.

Várias bactérias são essenciais para nossa saúde, nos proporcionando bem-estar, e outras podem ocasionar infecções. A fotoinativação de bactérias patogênicas se faz necessária, sendo que as porfirinas são fotossensibilizadores que demonstram eficiência para uso em TFD, eliminando bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* (AMOS-TAUTUA et al., 2019).

Um estudo relata que fotossensibilizadores do tipo ftalocianina complexados com metais) também se mostra eficiente na fotoinativação dessa bactéria gram-positiva. Utilizando uma concentração de 5×10^{-4} mol, foi possível diminuir entre cinco e seis ordens de unidades formadoras de colônias (UFC) (BEREZIN et al., 2020).

Além das porfirinas, outros fotossensibilizadores como uma bacterioclorina monosubstituída dicatiônica denominada BC37, também foi eficaz para suprimir o *S. aureus* (HUANG et al., 2014). Agentes fotossensibilizadores que também conseguiram reduzir a concentração celular de *S. aureus* foram o Azul de metileno (MB),

Azul de toluidina (TB) e Verde malaquita (MG) em concentrações eficazes de 300 μM de MB, com redução de 1,03 log (10), 150 μM de TB conseguiu reduzir 1,05 log (10) e 3000 μM de MG reduziu 1,63 log (10) a dose de luz utilizada foi de 20 J/cm^2 (VILELA et al., 2012).

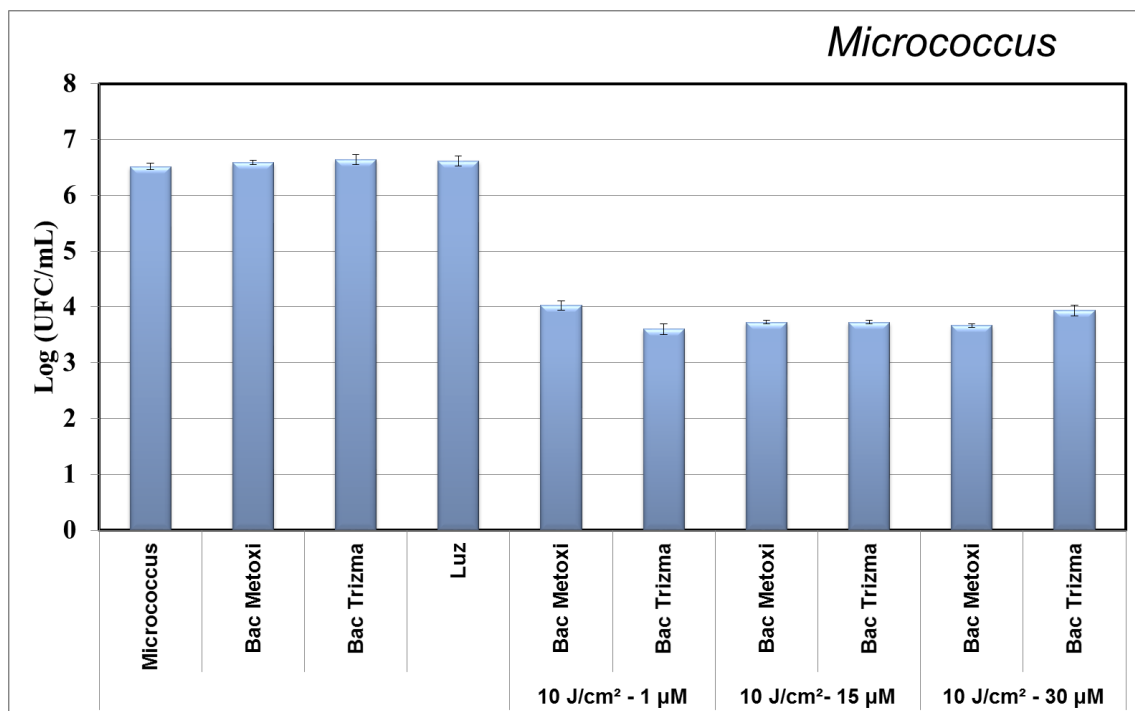
Nas infecções, como há uma pluralidade de microrganismos e um limite de tratamento, a fotoinativação se mostra um método praticável para combater esse problema. As pesquisas apontam que os fotossensibilizadores de segunda geração são mais estruturados e possuem metais na sua composição para ter efeito fotodinâmico e posteriormente serem ativados por luz vermelha (TRIGO-GUTIERREZ, 2018).

2.2.2 Fotoativação do microrganismo *Micrococcus luteus*

Outro microrganismo selecionado foi o *Micrococcus luteus* bactéria gram-positiva para avaliar a inativação fotodinâmica utilizando a bacterioclorina Trizma e Bacterioclorina Metóxi como fotossensibilizador.

O controle do microrganismo cresceu aproximadamente 6,4 log (10), o controle luz teve o crescimento similar ao controle, indicando que a luz não causou crescimento nem inativação do microrganismo. Os fotossensibilizadores na concentração de 30,0 μM foram avaliados no escuro e pode-se observar que não inibiram o crescimento do microrganismo, indicando que estes fotossensibilizadores não são tóxicos no escuro. Quando avaliado a TFD com os diferentes fotossensibilizadores nas concentrações de 1, 15 e 30 μM e com a dosagem de luz de 10 J/cm^2 , observou-se uma redução de 2 log (10) das colônias desse microrganismo em relação ao controle (Figura 19). Também foi possível observar que ambos os fotossensibilizadores apresentaram resultados similares.

Figura 19. Gráfico da fotoativação do *M. luteus* com 10 J/cm^2 .

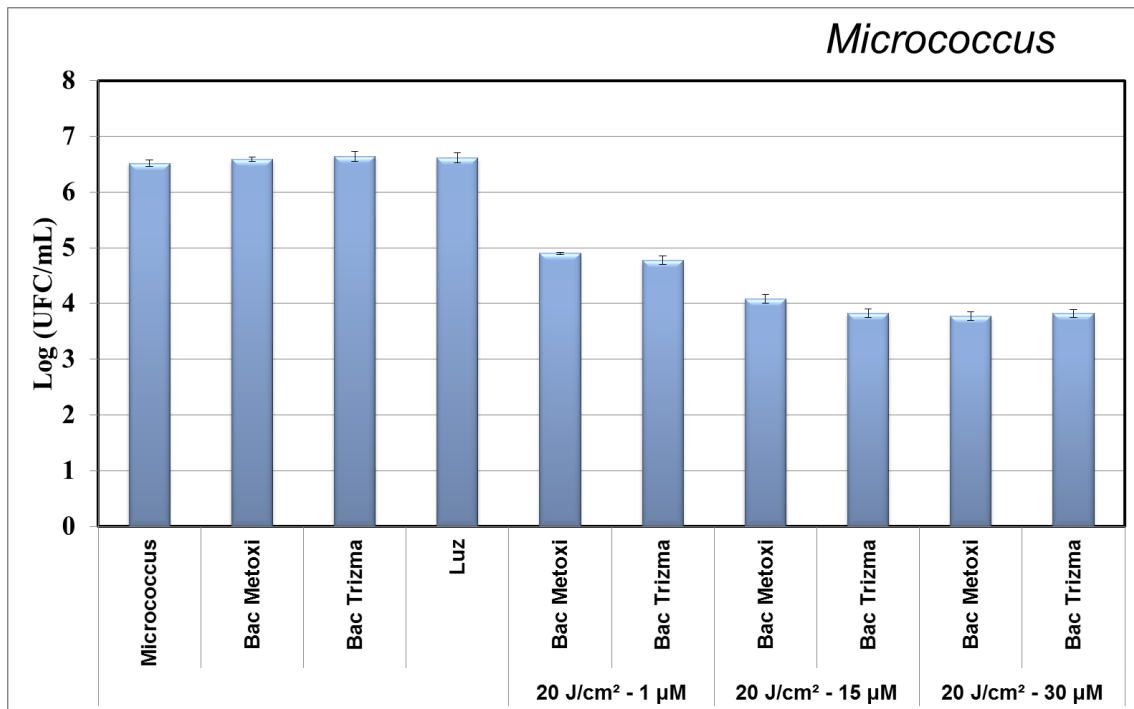


Fonte: AUTORA, 2021.

A fim de avaliar o efeito da dose de luz na inativação do microrganismo, foram avaliados os mesmos fotossensibilizadores nas concentrações de 1, 15 e 30 μM com uma dose de luz de 20 J/cm^2 (Figura 20). Como resultado pode-se observar que os valores de inativação foram aproximados dos resultados de 10 J/cm^2 , sendo observado

uma redução do número de colônias de $\approx 2 \log(10)$.

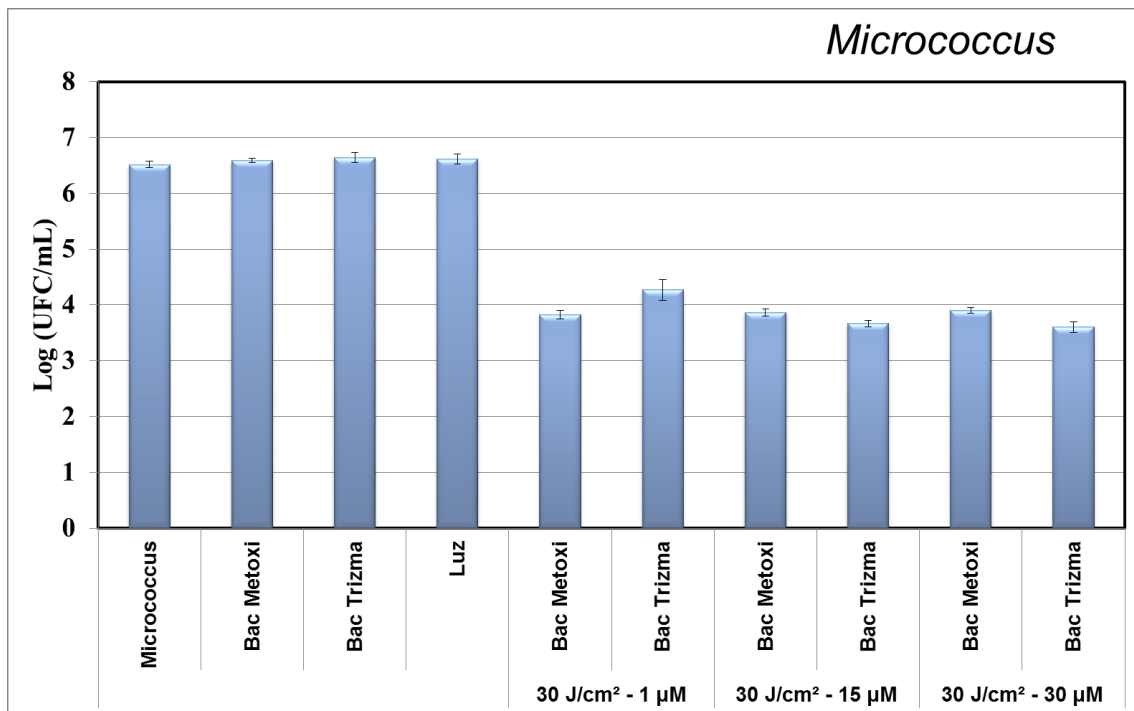
Figura 20. Gráfico da fotoinativação do *M. luteus* com 20 J/cm².



Fonte: AUTORA, 2021.

Como não foi possível obter uma redução significativa de *Micrococcus luteus* com 20 J/cm², aumentamos a dose de luz para 30 J/cm² conforme a figura 21, o qual ainda se mostrou bastante resistente, perceptível quando observamos e comparamos os gráficos anteriores, sendo que, a diminuição de colônias dessa bactéria se mantêm em aproximadamente 2 log (10) nas três dosagens de luz (10, 20 e 30 J/cm²).

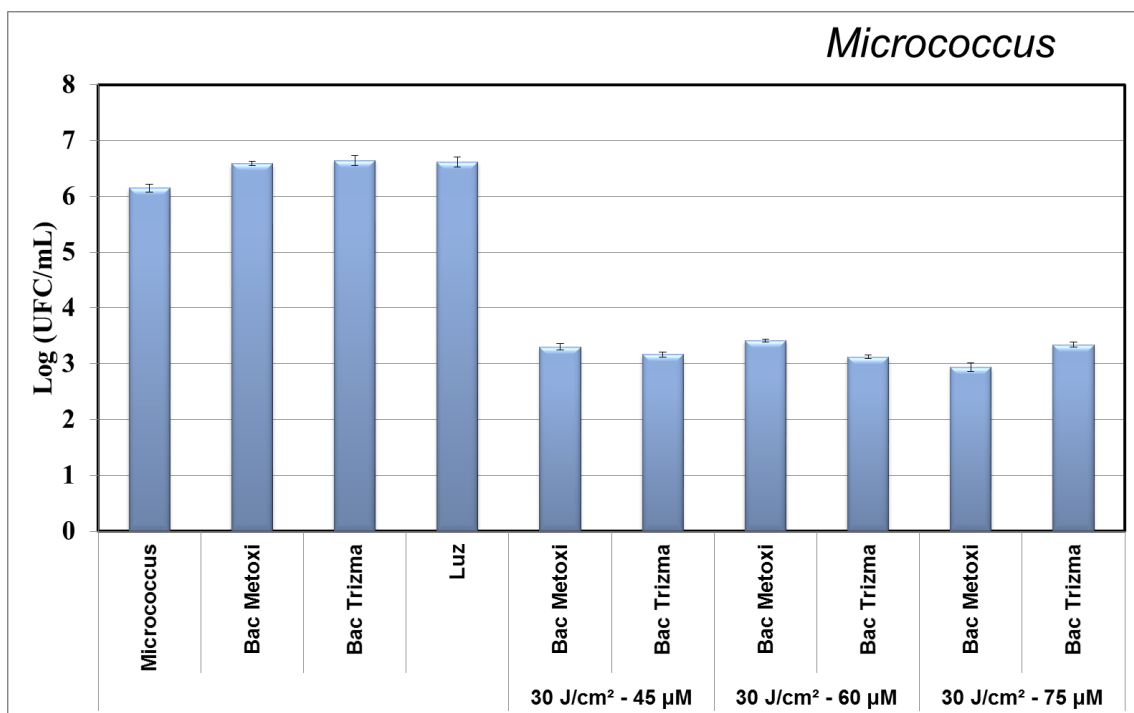
Figura 21. Gráfico da fotoinativação do *M. luteus* com 30 J/cm².



Fonte: AUTORA, 2021.

A fim de obter melhores resultados na fotoinativação de *M. luteus*, foi mantida a dose de luz de 30 J/cm² e foi realizada um aumento na concentração dos fotossensibilizadores que passou de 1 µM, 15 µM e 30 µM para 45 µM, 60 µM e 75 µM (Figura 22).

Figura 22. Gráfico da fotoinativação do *M. luteus* com 30J/cm² e 45, 60 e 75 µM.



Fonte: AUTORA, 2021.

Conforme a figura 22, observamos que, os fotossensibilizadores não se mostraram tóxicos no escuro e que não reduziram completamente a carga celular microbiana da bactéria avaliada. No entanto, observou-se uma diminuição de aproximadamente 3 log (10) do microrganismo e que ambos os fotossensibilizadores apresentaram uma eficiência similar. Embora este microrganismo demonstrou ser resistente aos ensaios, podemos considerar este resultado promissor, o qual dá abertura a realização de novos testes com outras concentrações e doses de luz.

O gênero *Micrococcus* faz parte da família Micrococcaceae pertencente ao filo das actinobactérias que são adaptados a vários habitats, sendo encontrado no solo, plantas, mar, sedimentos aquáticos e esponjas marinhas (ELTAMANY et al., 2014).

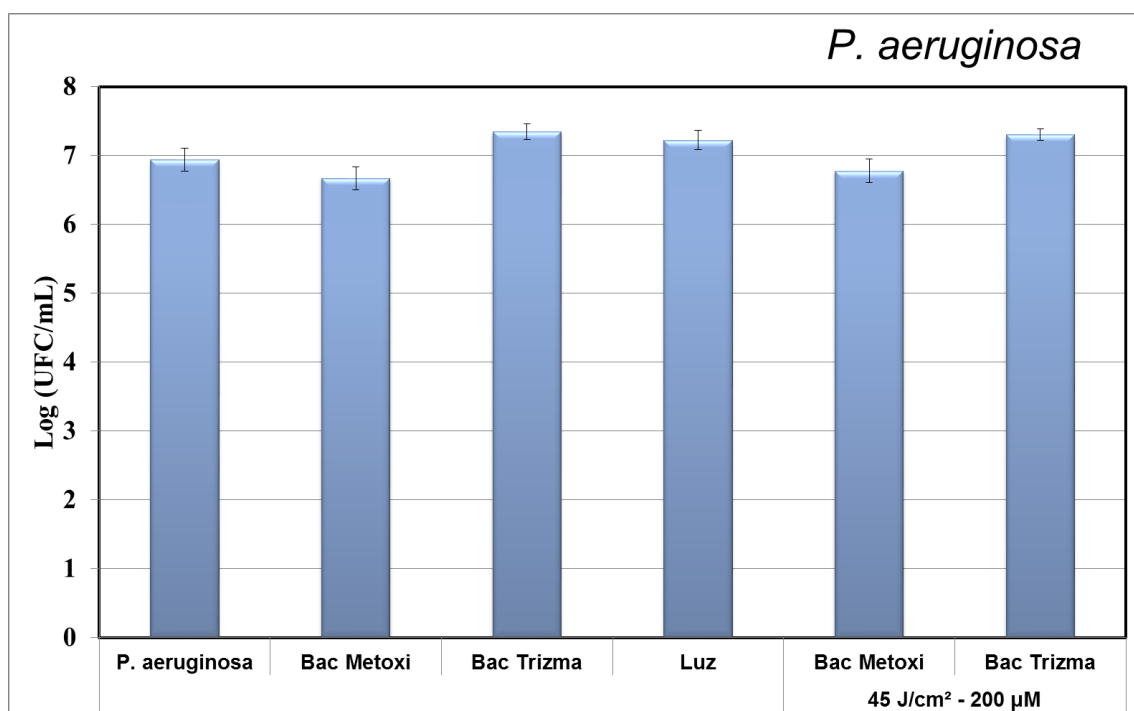
Para a inativação dessa bactéria gram-positiva relatou-se o uso de um ponto quântico de grafeno associado ao azul de metileno (MB-GQD) e o estudo conseguiu bons resultados com redução do número de colônias de *M. Luteus na*, usando dois minutos de irradiação com a intensidade de luz em 660 nm, além disso, o estudo relata a completa inativação do microrganismo com o tempo de 5 minutos (KHOLIKOV et al., 2018).

Estudos com o uso de sorbicilínóides provenientes de *Trichoderma reesei* (fungo filamentosos) como FS na TFD trazem resultados promissores na fotoinativação de bactérias gram-positivas como o *M. Luteus*. Os resultados constam que além de ser um produto pouco utilizado na fotoinativação, se mostrou propício para esse propósito, sendo que a diminuição de colônias foi de 29,5; 80,8; 98; 99,7 e 99,9% respectivamente em concentrações de sorbicilínóides de 50, 100, 200, 250 e 300 µM/mL, utilizando a luz UV para a irradiação durante 30 minutos (YANG et al., 2020).

2.2.3 Fotoinativação do microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*

Essa bactéria foi selecionada por ser Gram-negativa e possuir capacidade de gerar infecções que impactam o sistema imune, e muitas vezes se tornando resistente aos medicamentos, como por exemplo, antibióticos, dessa forma gerando preocupações no sistema de saúde. Com o objetivo de encontrar um bom fotossensibilizador que inative este microrganismo, as bacterioclorinas Trizma e Bacterioclorina Metóxi foram avaliadas perante a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Como já é conhecido, estes microrganismos Gram-negativos são extremamente resistentes, sendo assim, já se iniciou o teste com valores altos da concentração de fotossensibilizador (200 μM) e com uma dose de luz elevada (45 J/cm^2) conforme Figura 23. Neste estudo foi possível observar que o controle bactéria e controle luz cresceram normalmente, ou seja, a luz não inibiu e nem favoreceu o crescimento das mesmas. Os controles somente FS (200 μM) no escuro tiveram crescimento similar ao controle da bactéria, indicando que estes compostos não são tóxicos no escuro. Também podemos observar que quando realizamos TFD, não observamos diminuição no número de colônias quando comparando com o controle, mostrando que estes fotossensibilizadores testados não foram eficazes frente a inativação deste microrganismo.

Figura 23. Gráfico da fotoinativação da *P. aeruginosa*.



Fonte: AUTORA, 2021.

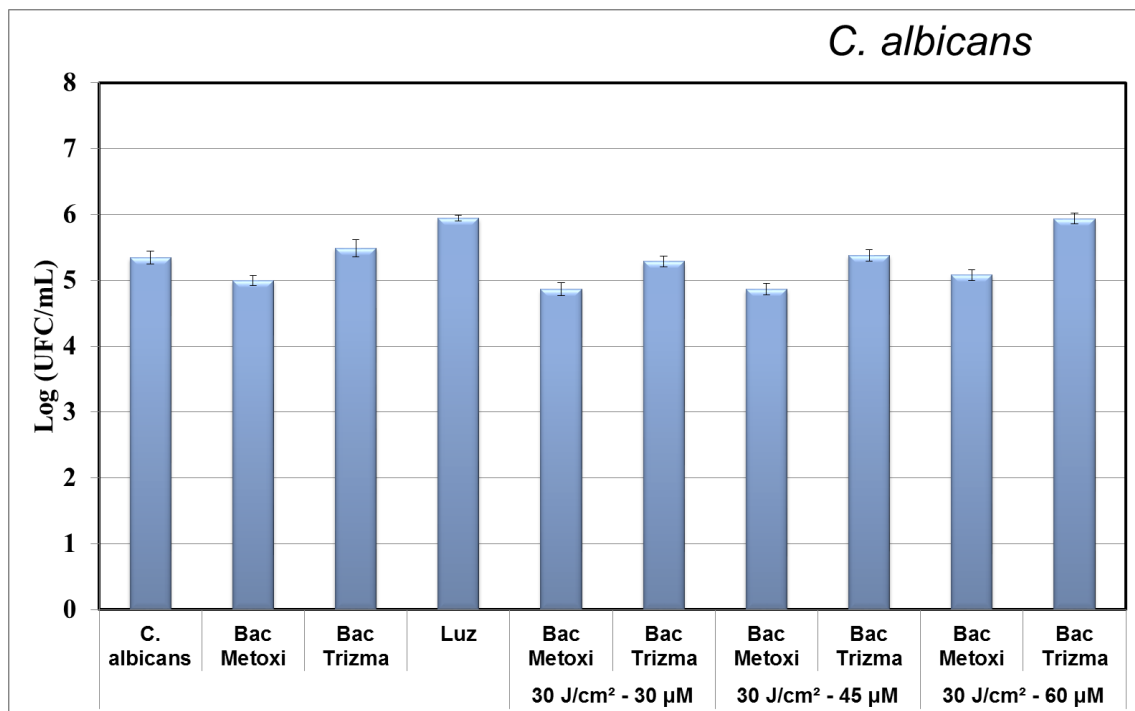
Bactérias Gram-negativas como a *Pseudomonas aeruginosa* possuem uma membrana extracelular que apresenta lipopolissacarídeos que são responsáveis por apresentar toxinas em sua composição celular, deixando-a mais complexa, em relação a bactérias Gram-positivas, devido a essa característica a fotoinativação é mais desafiadora. Com isso, um fotossensibilizador ideal deve conter propriedades hidrofílicas e cargas positivas para agregar na parede celular de bactérias Gram-negativas (MAKOLA et al., 2021). Este resultado obtido já era esperado, uma vez que já é conhecido na literatura que bactérias Gram-negativas são inativadas por FS catiônicos, sendo assim, realizamos apenas um teste com elevada concentração e elevada dose de luz.

Em um estudo, duas bacterioclorinas catiônicas sintéticas foram alvo de análise em teste de fotoinativação de *P. aeruginosa*, sendo elas 5,10,15,20-Tetrakis [1-(4'-bromobutil)-3-piridil] bacterioclorina tetrabrometo [(3-PyBuBr)₄BCBr₄] denominada BCI-4 e 5,10,15,20-Tetraquis [1-(4'-piridiniobutil)-3-piridil] bacterioclorina octabrometo [(3-PyBuPy)₄BCBr₈] BCI-8, no valor de 0,005 mM de fotossensibilizador com dose de luz de 8 J/cm² já se mostraram eficientes contra a bactéria de forma planctônicas (MEEROVICH et al., 2016).

2.2.4 Fotoinativação do microrganismo *Candida albicans*

A levedura *Candida albicans* CBMAI 475, foi testada inicialmente com uma dose de luz correspondente a 30 J/cm^2 e utilizando dois fotossensibilizadores que são Bacterioclorina Trizma e Bacterioclorina Metóxi, nas concentrações de 30, 45 e 60 μM . O controle do microrganismo teve um crescimento de $\sim 5,3 \log(10)$, o controle dos fotossensibilizadores (60 μM) não mostraram ser tóxicos no escuro. Observamos na figura 24, que sob essas condições a fotoinativação da levedura, não tivemos inativação do mesmo, pois não tivemos redução do número de unidades formadoras de colônia.

Figura 24. Gráfico da *C. albicans* CBMAI 475 com 30 J/cm^2 .

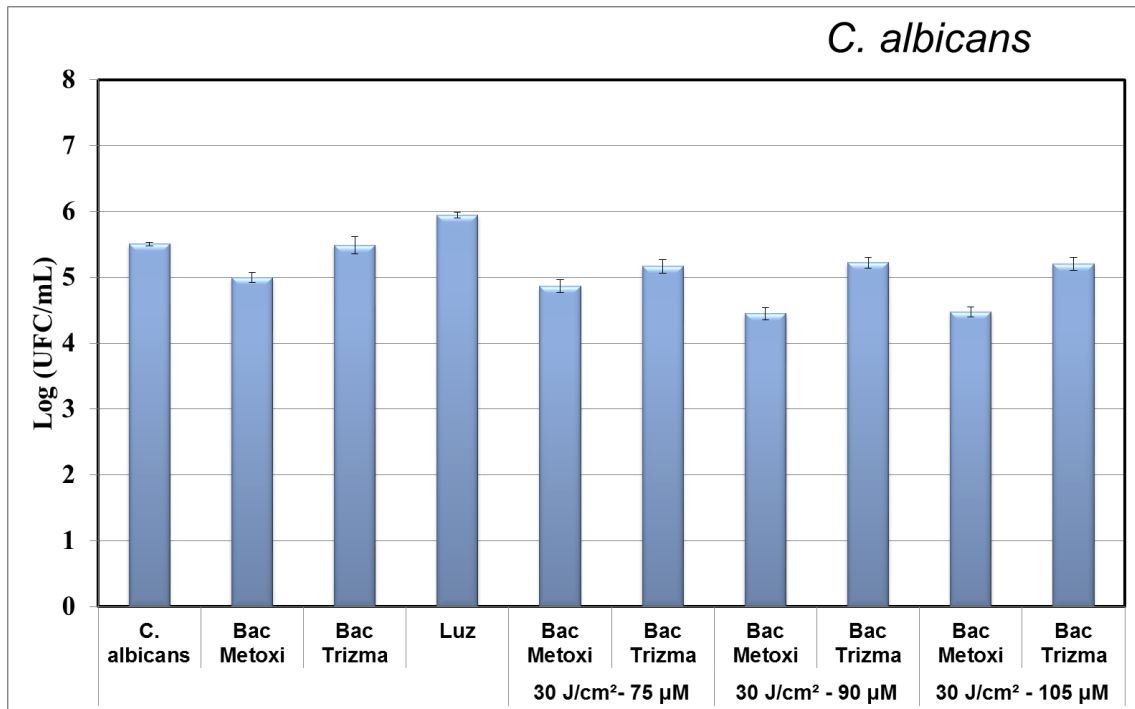


Fonte: AUTORA, 2021.

A fim de obter melhores resultados de inativação do microrganismo *C. albicans*, decidimos aumentar a concentração dos fotossensibilizadores, uma vez que já estamos utilizando uma dose de luz de 30 J/cm^2 que corresponde a 21 minutos de exposição na luz e para uma possível aplicação no âmbito da medicina, como por exemplo, no tratamento de candidose oral, o aumento deste tempo acaba inviabilizando o procedimento. Observamos que na figura 25 a *C. albicans* CBMAI 475 com dose de luz de 30 J/cm^2 e em concentrações mais elevadas de 75 μM , 90 μM e 105 μM , não alcançou um resultado significativo de fotoinativação, se mantendo em menos de 1 log (10) de

eliminação do microrganismo, demonstrando a sua resistência a TFD utilizando as duas bacterioclorinas escolhidas no estudo.

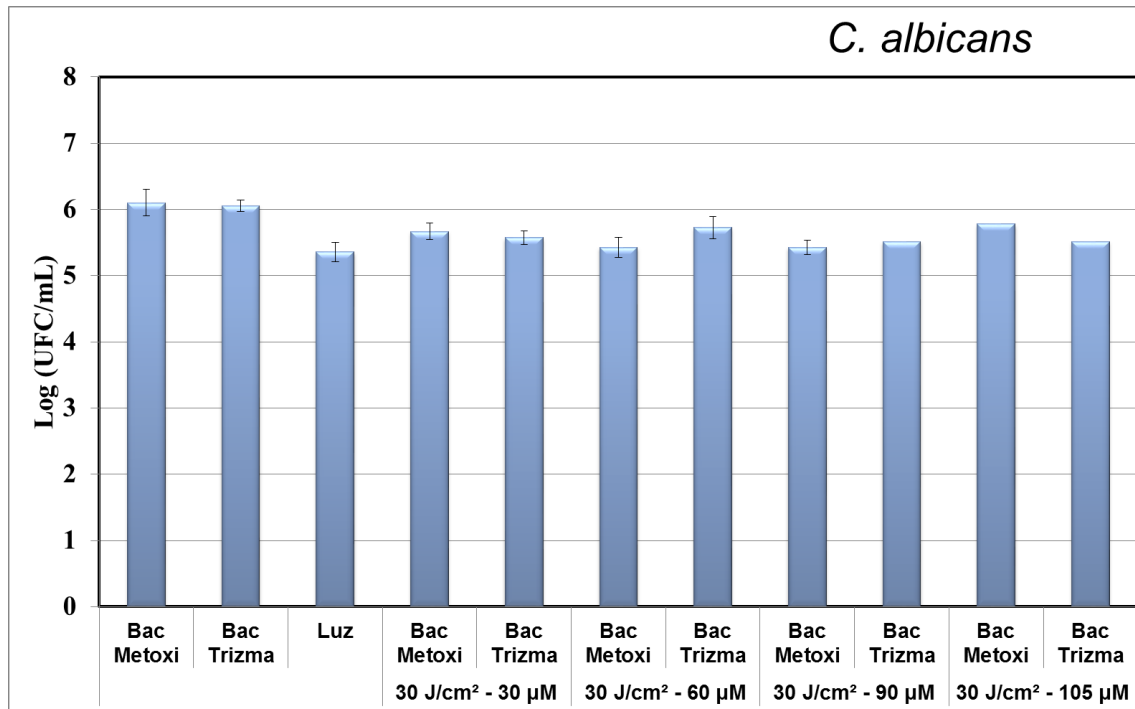
Figura 25. Gráfico da *C. albicans* CBMAI 475 com 30 J/cm².



Fonte: AUTORA, 2021.

Devido à resistência observada nas figuras 24 e 25 de fotoinativação, resolveu-se buscar outra linhagem de levedura para estudar se a amostra anterior estava com um grau de resistência mais elevado ou a levedura possivelmente era resistente a fotoinativação independente de serem linhagens diferentes.

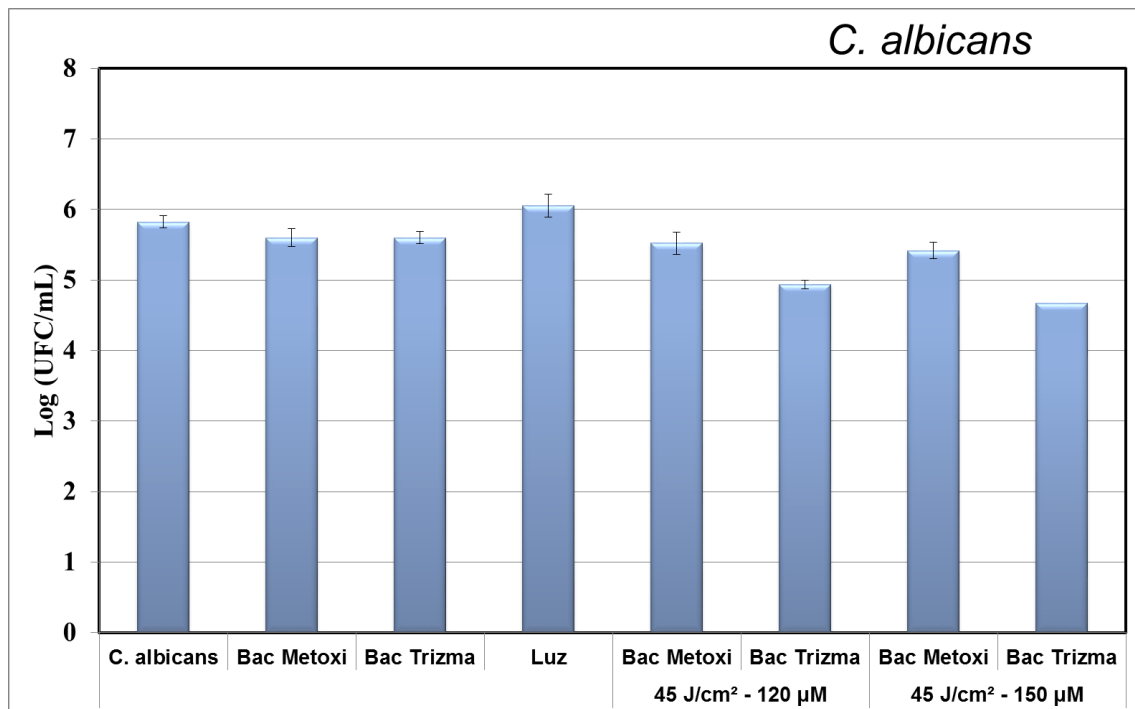
Foi utilizada outra linhagem de *Candida albicans* ATCC 90028, para observar e analisar as diferentes amostras, com isso na figura 26 foi avaliada a nova amostra com 30 J/cm² e nas seguintes concentrações 30 µM, 60 µM, 90 µM e 105 µM.

Figura 26. Gráfico da *C. albicans* ATCC 90028 com 30 J/cm².

Fonte: AUTORA, 2021.

Para melhor avaliar os testes contra esse o fungo *C. albicans* ATCC 90028 as condições do experimento sofreram um aumento para 45 J/cm² de dose de luz e as concentrações para 120 µM e 150 µM (Figura 27), observamos que o controle cresceu cerca de 6 log (10) e os FS não desenvolveram toxicidade no escuro, contudo o resultado obtido ainda foi insatisfatório para fotoinativação desse fungo utilizando bacterioclorinas Trizma e Metóxi sendo um pouco mais de 1 log (10) de redução das colônias.

Figura 27. Gráfico da *C. albicans* ATCC 90028 com 45 J/cm².



Fonte: AUTORA, 2021.

Os testes com o microrganismo *C. albicans*, ambas as amostras CBMAI 475 e ATCC 90028 demonstraram que a espécie o gênero *Candida* foi resistente ao tratamento de fotoinativação com Bacterioclorina Metóxi e Trizma. Dessa forma ressaltando que mais estudos devem ser realizados com outros FS e até mesmo verificar como a levedura se comporta em meio ao FS, e quais são seus mecanismos de defesa, bem como a formulação e síntese de FS que consigam melhor penetração na célula do microrganismo.

Candida albicans é um microrganismo encontrado na microbiota oral dos seres humanos, em situações de baixa imunidade, esse fungo pode se tornar um patógeno oportunista crescendo e se espalhando pela cavidade oral, originando uma candidose oral (DIAS et al., 2020). Ao longo dos anos esse microrganismo vem sendo estudado quanto a sua resistência a medicamentos, e a partir disso pesquisas em TFD investigam a capacidade desse microrganismo ser resistente a esse método terapêutico. Sabe-se que a realização progressiva do tratamento em concentrações baixas pode ocasionar uma população microbiana resistente (DIAS et al., 2020).

A eficácia antimicrobiana da Curcumina como FS contra espécies de *Candida* spp. em investigações *in vitro*, vem conseguindo diminuir e erradicar colônias de *Candida albicans* com 20 µM de curcumina e 5,28 J/cm² de luz na forma planctônica do

fungo (SANTEZI et al., 2018).

Relato de um protocolo utilizando a curcumina como agente fotossensível na inativação de *C. albicans* em modo planctônico e em biofilmes, utilizaram as concentrações de 5, 10, 20, 40 μM com tempo de incubação de 20 minutos e doses de luz de 5,28; 18,0; 25,5 e 37,5 J/cm^2 , conseguiram obter a redução dessa levedura em biofilmes de 85% na concentração de 40 μM e 18 J/cm^2 . O estudo ainda identificou que em concentrações menores é possível inativar o fungo isoladamente de forma eficaz (DOVIGO et al., 2013).

Também há relato de atividade inibitória utilizando o ácido 5-aminolevulínico (ALA), o qual possui potencial como antifúngico. A solução de ALA foi diluída em 15 mM e incubada 5 horas antes da irradiação, foi usada a luz de 300 J/cm^2 por 50 minutos e posteriormente a atividade foi avaliada em nível subcelular, molecular e transcricional. Em nível molecular o ALA resultou em cerca de 19% de apoptose celular, em nível transcricional foi obtido resultados de redução significativos (SHI et al., 2021).

2.3 DADOS ESTATÍSTICOS

Os dados estatísticos foram fornecidos pelo software *Rstudio*, com o teste de variância (ANOVA) onde a significância é de $p < 0,05$ e estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Dados estatísticos ANOVA.

Microrganismo	Dose de Luz	μM	Composto	Valor F	Valor p
<i>S. aureus</i>	10 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Metóxi	161	<2e-16
	10 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Trizma	295,8	<2e-16
	20 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Metóxi	2228	<2e-16
	20 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Trizma	735,1	<2e-16
	30 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Metóxi	937,7	<2e-16
	30 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Trizma	571,9	<2e-16
<i>P.aeruginosa</i>	45 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Metóxi	1,605	0,233
	45 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Trizma	0,877	0,471
<i>M. luteus</i>	10 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Metóxi	328,3	<2e-16
	10 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Trizma	224,5	<2e-16
	20 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Metóxi	214,8	<2e-16
	20 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Trizma	110,2	<2e-16
	30 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Metóxi	268,1	<2e-16
	30 J/cm ²	1, 15 e 30	Bac. Trizma	149,2	<2e-16
	30 J/cm ²	45, 60 e 75	Bac. Metóxi	251,3	<2e-16
	30 J/cm ²	45, 60 e 75	Bac. Trizma	409,2	<2e-16
<i>C. albicans 475</i>	30 J/cm ²	30, 45 e 60	Bac. Metóxi	12,89	1,85e-06
	30 J/cm ²	30, 45 e 60	Bac. Trizma	6,197	0,000466
	30 J/cm ²	75, 90 e 105	Bac. Metóxi	29,2	1,75e-10
	30 J/cm ²	75, 90 e 105	Bac. Trizma	6,317	0,000443
<i>C. albicans 90028</i>	30 J/cm ²	30, 60, 90 e 105	Bac. Metóxi	7,077	0,000132
	30 J/cm ²	30, 60, 90 e 105	Bac. Trizma	6,57	0,000149
	45 J/cm ²	120 e 150	Bac. Metóxi	7,09	0,001
	45 J/cm ²	120 e 150	Bac. Trizma	19,41	3,66e-06

Fonte: AUTORA, 2022.

Os valores de p apresentados na tabela confirmam que os testes realizados tem importância significativa e que a fotoinativação se apresenta como um método capaz de eliminar as UFC dos microrganismos, resultado que permite a aplicação dessa técnica para a esfera da saúde e proporciona a busca de diversos compostos oriundos da natureza que podem vir a ser utilizados na TFD de forma sustentável.

Os dados demonstram que o valor de p se mantém abaixo de 0,05 para os microrganismos *S. aureus*, *M. luteus* e *C. albicans*, exceto dos dados correspondente ao microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, confirmando que a fotoinativação desse microrganismo não foi eficiente para tratar de uma bactéria Gram-negativa.

3 CONCLUSÃO

Neste estudo observamos a capacidade de atividade de bacterioclorinas na inativação de microrganismos potencialmente patogênicos. As bacterioclorinas Bacterioclorina Trizma e Bacterioclorina Metóxi foram eficientes na fotoinativação da bactéria gram-positiva *S. aureus*, e demonstrou resultados promissores na inativação dos microrganismos *C. albicans* e *M. luteus*.

O desenvolvimento e a realização de novas sínteses de FS e modificações químicas podem auxiliar no processo de expansão do estudo em TFD e da fotoinativação, bem como comparar os dados já obtidos e observar como ocorre a penetração do FS na célula microbiana, analisando os mecanismos e características que possuem para que possam diagnosticar novos métodos que permitem vir a ajudar na fotoinativação.

O desenvolvimento do estudo e seus resultados contribuíram para enfatizar o uso de produtos naturais porfirinóides da natureza, bem como sua extração de maneira sustentável pode favorecer técnicas e pesquisas no âmbito científico e auxiliar a difusão desse conhecimento para a sociedade promovendo inúmeros benefícios na área da saúde, bem como, da biotecnologia.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (anexos) foram feitas no espectrofotômetro da Brucker Avance 400 a 400.15 MHz para ^1H e 100.13 MHz para o ^{13}C , utilizando a referência interna tetrametilsilano. As análises de UV-Vis foram feitas no espectrofotômetro LAMBDA 25 (Perkin Elmer), tanto os espectros de RMN quanto UV-Vis foram realizados na Universidade Federal de São Carlos. Os reagentes foram usados como adquiridos, sem purificação prévia.

EXTRAÇÃO DA BACTERIOCLOROFILA DA BACTÉRIA *R. faecalis*

Rhodospseudomonas faecalis (2.5 g) foi tratado com 5% de solução de Metanol/ H_2SO_4 (30 mL) durante 48 h a temperatura ambiente, a reação foi mantida sobre atmosfera de nitrogênio e protegida da luz. A mistura reacional foi lavada com 50 mL de metanol para remover as impurezas e em seguida foi lavada com 100 mL de diclorometano no qual a bacterioclorina é solúvel. Esta fase orgânica foi lavada com água (3 x 50 mL) e secada com sulfato de sódio. Após a evaporação do solvente em rotaevaporador, a bacterioclorofila foi obtida. O produto foi recristalizado com diclorometano/hexano.

^1H - RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 9,00 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,41 (s, 1H); 6,09 (s, 1H); 5,18 (m, 1H) 4,50-4,44 (m, 2H); 4,26-4,29 (m, 2H); 4,04-4,02 (m, 2H); 3,84 (s, 3H); 3,49 (s, 3H); 3,44 (s, 3H); 3,16 (s, 3H); 2,52-2,48 (m, 2H); 2,36-2,32 (m, 2H); 2,28-2,24 (m, 2H); 1,78 (d, $J = 7.4$ Hz, 3H); 1,72 (d, $J = 7.9$ Hz, 3H); 1,10 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H); 1,30-1,01 (m, 26H); 1,85-0,78 (m, 10H) 0,45 (s, 1H, NH); -0,98 (s, 1H, NH).

UV-Vis (diclorometano): λ_{max} (nm): 360, 529, 683, 752.

TRANSESTERIFICAÇÃO DA BACTERIOCLOROFILA

A bacterioclorofila foi tratada novamente com uma solução de 30 mL metanol/ H_2SO_4 5% juntamente 15 mL de diclorometano, permanecendo sob agitação durante 4 horas (sob atmosfera de nitrogênio e protegida da luz). Após a mesma foi neutralizada com bicarbonato de sódio, lavada com água, secada e o solvente evaporado. A bacterioclorina foi purificada por recristalização usando solvente diclorometano/hexano. Obtendo-se a bacterioclorina metóxi (0.020 g, 0.032 mmol, 0.8%) (JOSHI *et al.*, 2011).

¹H- RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8,97 (s, 1H, 5-H); 8,48 (s, 1H, 10-H); 8,41 (s, 1H, 20-H); 6,08 (s, 1H, 13²-H); 4,26-4,29 (m, 2H, 1H for 7-H, 1H for 8-H); 4,04-4,02 (m, 2H, 1H for 17-H, 1H for 18-H); 3,84 (s, 3H, 12-CH₃); 3,59 (s, 3H, 2-CH₃); 3,49 (s, 3H, 13²- COOCH₃); 3,45 (s, 3H, 17-CH₂CH₂ COOCH₃); 3,16 (s, 3H, 3- COCH₃); 2,52-2,48 (m, 2H, 17-CH₂CH₂COOCH₃); 2,36-2,32 (m, 2H, 17-CH₂CH₂COOCH₃); 2,28-2,24 (m, 2H, 8-CH₂CH₃); 1,78 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H, 7- CH₃); 1,72 (d, $J = 7,9$ Hz, 3H, 18- CH₃); 1,11 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, 8- CH₂CH₃); 0,46 (s, 1H, NH); -0,97 (s, 1H, NH). (PRATAVIERA et al., 2021).

UV-Vis (diclorometano): λ max (nm): 362, 389, 530, 683, 754.

OBTENÇÃO DA BACTERIO TRIZMA

Bacterioclorina metoxi (10 mg, 0.016 mmol) e Trizma[®] (Tris(hidroximetil)aminometano) (30 mg, 0.24 mmol) foram dissolvidas em 4 mL of tetrahidrofurano (THF) em um tubo selado (Aldrich[®]) e aquecido a 110 °C durante 7 dias, sob proteção da luz. A fase orgânica foi evaporada e dissolvida em diclorometano, lavada com água e seca com sulfato de sódio. Após a evaporação do solvente sobre pressão reduzida em rotoevaporador a bacterioclorina Trizma foi purificada em coluna cromatográfica usando sílica gel com eluente diclorometano/metanol 9:1. Obtendo-se a bacterioclorina Trizma com 65% de rendimento. (0.7 mg, 0.0098 mmol, 65 %) (PRATAVIERA et al., 2021).

¹H- RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8,93 (s, 1H, 5-H); 8,43 (s, 1H, 10-H); 8,39 (s, 1H, 20-H); 7,79 (s, 1H, NH amida); 6,08 (s, 1H, 13²-H); 4,31-4,18 (m, 4H, 1H for 7-H, 1H for 8-H, 1H for 17-H, 1H for 18-H); 3,90 (s, 6H, -NH(CH₂OH)₃); 3,74 (s, 3H, 17-COOCH₃); 3,47 (s, 3H, 2-CH₃), 3,43 (s, 3H, 12-CH₃), 3,16 (s, 3H, 3-COCH₃), 2,71-2,30 (m, 4H, 17-CH₂CH₂COOCH₃); 2,09-1,92 (m, 2H, 17-CH₂CH₂COOCH₃); 1,78 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H, 7- CH₃); 1,75 (d, $J = 7,9$ Hz, 3H, 18- CH₃); 1,10 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, 8- CH₂CH₃); 0,69 (s, 1H, NH); -0,77 (s, 1H, NH).

UV-Vis (diclorometano): λ max (nm): 360, 531, 685, 755.

CRESCIMENTO DAS CÉLULAS MICROBIANAS

Para a realização deste trabalho, as linhagens microbianas de *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *M. luteus*, foram reativadas de criotubos contendo cerca de 2 mL de glicerol 20%, preservados em criogenia a -80 °C. Os microrganismos estavam preservadas no Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Unila.

Candida albicans ATCC 90028 e *Candida albicans* ATCC 475 cresceram a 27 °C em caldo Sabouraud da marca KASVI na estufa durante 24 horas, após foi centrifugada usando tubos falcon de 15 mL no tempo de 1 minuto a 3000 rpm e temperatura de 21 °C, e ressuspendido em água autoclavada. Em seguida a suspensão foi ajustada com absorvância de 0.3 em 600 nm no espectrofotômetro.

Staphylococcus aureus ATCC 485 cresceu em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) da marca KASVI na estufa a 37 °C durante 24 horas, após centrifugado usando tubos falcon de 15 mL no tempo de 1 minuto a 3000 rpm e temperatura de 21 °C foi ressuspendido em água autoclavada e ajustada na absorvância de 0,1 em 600 nm.

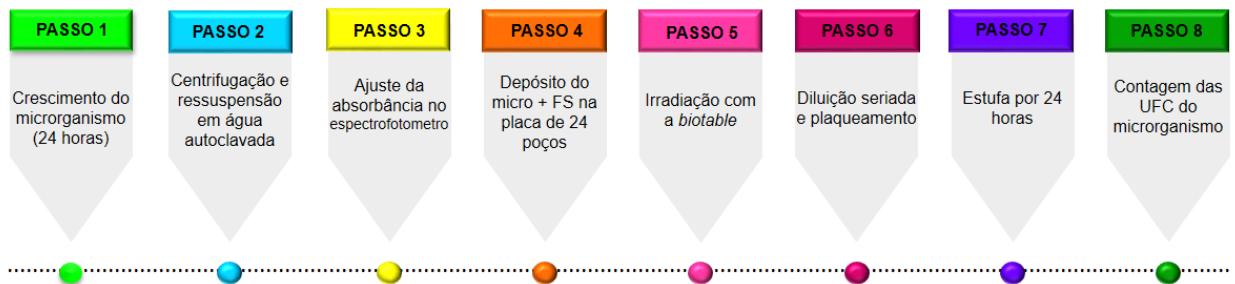
Pseudomonas aeruginosa ATCC 489 cresceu em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) da marca KASVI durante 24 horas, após centrifugado usando tubos falcon de 15 mL no tempo de 1 minuto a 3000 rpm e temperatura de 21 °C, foi ressuspendido em água autoclavada e ajustada na absorvância de 0,1 em 600 nm.

Micrococcus luteus ATCC 825 cresceu em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) da marca KASVI durante 24 horas, após centrifugado usando tubos falcon de 15 mL no tempo de 1 minuto a 3000 rpm e temperatura de 21 °C foi ressuspendido em água autoclavada e ajustada na absorvância de 0.99 em 600 nm.

FOTOINATIVAÇÃO

Os testes de avaliação fotodinâmica foram realizados utilizando dois fotossensibilizadores Bacterioclorina Metóxi e Bacterioclorina Trizma, variando as concentrações e a dosagem de luz, assim analisando a inativação usando a terapia fotodinâmica frente aos microrganismos escolhidos para o estudo. O procedimento experimental ocorreu segundo a figura 28. Todos os materiais utilizados foram esterilizados

Figura 28. Fluxograma do procedimento experimental.



Fonte: AUTOR, 2022.

O microrganismo foi colocado para crescer 24 horas antes do início dos testes (em meio *Sabouraud* para levedura e meio BHI – *Brain Heart Infusion Broth* para bactérias, ambos os meios da marca KASVI), após esse tempo o material foi centrifugado e feito a ressuspensão em água autoclavada; a absorbância é verificada utilizando o equipamento espectrofotômetro em 600 nm (*S. aureus*, *M. luteus*, *P. aeruginosa* foi de aproximadamente 0,1 de absorbância e *C. albicans* foi de 0,3 de absorbância). Após ajustado a absorbância de cada microrganismo é colocado 500 µL deste material contendo o microrganismo nas placas de 24 poços, e adicionado as soluções contendo os fotossensibilizadores até atingir as concentrações de 1 µM, 15 µM, 30 µM, 45 µM, 60 µM, 75 µM, 90 µM, 105 e 200 µM para cada fotossensibilizador.

Após a adição do FS, as placas ficaram protegidas da luz pelo tempo de incubação de 20 minutos, onde ocorre a penetração do FS no interior de cada microrganismo. O controle só microrganismo é mantido no escuro e sem fotossensibilizador durante 20 minutos e depois diluído e plaqueado. O controle luz corresponde ao microrganismo irradiado na respectiva dose de luz e o controle FS escuro o microrganismo é incubado com o FS e permanece no escuro. Para realizar a inativação fotodinâmica, os microrganismos com os respectivos fotossensibilizadores foram expostos a luz após o tempo de incubação com auxílio da *biotable* com iluminação em 780 nm e intensidade de 24 mW/cm². Para avaliar a influência da luz utilizamos diferentes tempos de irradiação proporcionando diferentes doses de luz. Para obter uma dose de luz de 10 J/cm² as amostras foram irradiadas por 7 minutos, para obter uma dose de luz de 20 J/cm² as amostras foram irradiadas durante 14 minutos, para obter 30 J/cm² a amostra foi irradiada durante 21 minutos e para 45 J/cm² foi irradiado por 31 minutos e 30 segundos.

Na sequência é retirada 100 µL do material da placa e dos controles e transferidas para os eppendorfs em triplicata contendo 900 µL de água, protegidos por papel alumínio.

Na sequência estas amostras (em triplicata), foram diluídas em série (100 µL deste material foi diluído em 900 µL de água autoclavada, de um eppendorf para outro até chegar a seis unidades de eppendorf no total para cada triplicata). Em seguida, 25 µL de cada eppendorf foi retirado e depositado em placas de Petri (ágar BHI para as bactérias e ágar *Sabouraud* para a levedura) em duplicata e realizado o procedimento de espalhamento da gota usando um bastão de vidro e dispostas na estufa por 24 horas protegidas da luz (levedura temperatura de 27 °C e para bactérias temperatura de 37 °C). Depois das 24 horas é realizada a contagem das colônias dos microrganismos das placas.

REFERÊNCIAS

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. **American Cancer Society**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

ANDRADE, A. C. F. F. **Avaliação da produção de hidrogênio por bactéria fototrófica púrpura não-sulfurosa em reator em bate**. 2007. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Hidráulica e Saneamento, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-12062007-183953/pt-br.php>. Acesso em: 30 nov. 2020.

AMOS-TAUTUA, B. M.; SONGCA, S. P.; OLUWAFEMI, O. S. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. **Molecules**, 2019.

ANTUNES, L. C. nM. **A microbiota humana**. 2014. Disponível em: <https://cienciahoje.org.br/artigo/a-microbiota-humana/>. Acesso em: 20 nov. 2020.

AQUINO, R. **A importância do desenvolvimento sustentável para o futuro do Brasil**. 2020. Disponível em: <https://www.brasildefato.com.br/2020/08/12/artigo-a-importancia-do-desenvolvimento-sustentavel-para-o-futuro-do-brasil>. Acesso em: 03 dez. 2020.

ASSIS, F. F. **Abordagens sintéticas visando a Preparação de bacterioclorinas de alta Conjugação**. 2016. 297 f. Tese (Doutorado) – Curso de Ciências, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de São Carlos, Ufscar, São Carlos, 2016.

BAGNATO, V. S. et al. **Controle microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. 286 p

BAGNATO, V. S. INTRODUÇÃO. In: BAGNATO, V. S. *et al.* **Controle microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. p. 11-20.

BATTERSBY, A. R. **Nat. Prod. Rep.**, 17, 2000, 507p.

BAYONA, A. M. P.; MROZ, P.; THUNSHELLE, C.; HAMBLIN, M. R. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. **Chemical Biology & Drug Design**, [S.L.], v. 89, n. 2, p. 192-206, fev. 2017.

BEREZIN, D. B. et al. Aggregation of water soluble octaanionic phthalocyanines and their photoinactivation antimicrobial effect *in vitro*. **Mendeleev Commun**, v. 30, p. 621-623, 2020.

BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do brasil do século XXI. **Quim. Nova**, v. 40, n. 6, p.706-710, 2017.

BOCCHI, M. P.; CASTRO, C. A.; INADA, N. M.; SILVA, F. V.; SPERANDIO, G.; TAVARES, G. L.; CORVELLO, N. M.; BAGNATO, V. S.; LOMBARDI, W. Avaliação da redução da carga viral do papilomavírus humano por meio da captura híbrida após terapia fotodinâmica em lesões intraepiteliais cervicais alto grau. **Diagn. Tratamento**, v. 26, 2021.

BRASIL, ONU (Organização das Nações Unidas). **Objetivos de desenvolvimento sustentável no Brasil**: saúde e bem-estar. 2020. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs/3>. Acesso em: 19 nov. 2020.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Advanced organic chemistry, Parte A: Structure and Mechanisms. **Springer**, 2007. 1199 p.

CARVALHO, V. C. M. **Estudos dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais Hep-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer**. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, 2001.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S.S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Rev. Virt. Quim.**, v.9, n. 2, p. 575-595, 2017.

CASTEEL, M. J. et al. Photoinactivation of hepatitis A virus by synthetic porphyrins. **Photochem Photobiol**, [S. l.], v. 80, n. 2, p. 294-300, out. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15362943/>. Acesso em: 21 nov. 2020.

CHEN, Qun et al. Preclinical studies in normal canine prostate of a novel palladium-bacteriopheophorbide (WST09) photosensitizer for photodynamic therapy of prostate cancers. **Photochem Photobiol**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 438-445, out. 2002.

DąBROWSKI, J. M.; PUCELIK, B.; REGIEL-FUTYRAA, A.; BRINDELL, M.; MAZURYK, O.; KYZIOŁ, A.; STOCHEL, G.; MACYK, W.; ARNAUT, L. G. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 325, p. 67-101, 15 out. 2016.

De OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porphirinas, Clorinas e Ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, São Carlos, v. 7, n. 1, p. 310-335, fev. 2015. Disponível em: <http://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/937>. Acesso em: 30 nov. 2020.

DHANESHWAR, S.; PATIL, K.; BULBULE, M.; KINJAWADEKAR, V.; JOSHI, D.; JOSHI, V. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* v. 20, p.125-141, 2014.

DIAS, L. M.; KLEIN, M. I.; JORDÃO, C. C.; CARMELLO, J. C.; BELLINI, A.; PAVARINA, A. C. Successive applications of Antimicrobial Photodynamic Therapy effects the susceptibility of *Candida albicans* grown in medium with or without fluconazole. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, 2020.

DOLPHIN, D. 1993 Syntex Award Lecture Photomedicine and photodynamic therapy. **Canadian Journal Of Chemistry**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 1005-1013, 4 abr. 1994.

EGUSA, H.; SOYSA, N. S.; ELLEPOLA, A. N.; YATANI, H.; SAMARANAYAKE, L. P. Oral candidiasis in HIV-infected patients. *Curr. HIV Research*, v. 6, p.485-499, 2008.

DOVIGO, L.N.; CARMELLO, J.C.; COSTA, C.A.D.; VERGANI, C.E.; BRUNETTI, I.L.; BAGNATO, V.S.; PAVARINA, A.C. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Med. Mycol.** 2013.

ELTAMANY, E. E. et al. New antibacterial xanthone from the marine sponge-derived *Micrococcus* sp. EG45. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 4939-4942, 2014.

FERREIRA, A. R. R. F. S. **Clorinas e bacterioclorinas fundidas com o anel 4,5,6,7-tetra-hidropirazolo (1,5 α) piridina como novos fotossensibilizadores para o tratamento do cancro.** 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Medicinal, Departamento de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2015. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/29019>. Acesso em: 02 abr. 2020.

FUJITA, M. A. **Síntese de porfirinas contendo grupos do tipo uracil fundidos nas posições β -pirrólicas.** 2014. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, Ufscar, São Carlos, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/6606/6474.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 nov. 2019.

GOUTERMAN, M. **The porphyrins.** Eds. DOLPHIN, D. New York, USA: Academic Press, 1978. 654 p.

GUOLIN, L., GRAHAM, A.; CHEN, Y.; DOBHAL, M. P.; MORGAN, J.; ZHENG, G.; KOZYREV, A.; OSEROFF, A.; DOUGHERTY, T. J.; PANDEY, R. K. **J. Med. Chem.** v. 46, 2003.

HAMBLIN, M. R.; JORI, G. Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens Medical and Environmental Applications: light strikes back microorganisms in the new millennium. **Photochemistry And Photobiology**, [s. l], v. 87, p. 1479-1479, 21 nov. 2011.

HELENO, V. C. G. **Estudos de transformações químicas em produtos naturais polifuncionalizados.** 1999. 171 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Departamento de Química, Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 1999. Disponível em: [http://artemis.ffclrp.usp.br/TesesPDF/VladimirCGHeleno\(Mestrado\).pdf](http://artemis.ffclrp.usp.br/TesesPDF/VladimirCGHeleno(Mestrado).pdf). Acesso em: 22 nov. 2020.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochem Photobiol.** v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992.

HUANG, L.; KRAYER, M.; ROUBIL, J. G. S.; HUANG, Y.; HOLTEN, D. LINDSEY, J. S.; HAMBLIN, M. R. Stable synthetic mono-substituted cationic bacteriochlorins mediate selective broad-spectrum photoinactivation of drug-resistant pathogens at nanomolar concentrations. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 141, p. 119-127, 2014.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S.L.], v. 85, n. 4, p. 501-511, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962010000400011>. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v85n4/v85n4a11.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2019.

JOSHI, P.; ETHIRAJAN, M.; GOSWAMI, L. N.; SRIVATSAN, A.; MISSERT, J. R.; PANDEY, R. K. Synthesis, Spectroscopic, and in Vitro Photosensitizing Efficacy of Ketobacteriochlorins Derived from Ring-B and Ring-D Reduced Chlorins via Pinacol–Pinacolone Rearrangement. **The Journal Of Organic Chemistry**, [S.L.], v. 76, n. 21, p. 8629-8640, 4 nov. 2011. American Chemical Society (ACS).

KEMERICH, Pedro Daniel da Cunha *et al.* Indicadores de sustentabilidade ambiental: métodos e aplicações. **Revista Monografias Ambientais - Remoa**, Santa Maria, v. 13, n. 5, p. 3723-3736, 2014.

KHOLIKOV, K. et al. Improved singlet oxygen generation and antimicrobial activity of sulphurdoped graphene quantum dots coupled with methylene blue for photodynamic therapy applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, 2018.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 17-31, 2013.

LOPES, N. S. S. **Avaliação fotodinâmica em células tumorais do câncer de mama e fibroblasto utilizando o fotossensibilizador bacterioclorina-trisma**. 2018. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock** – 14^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAKOLA, L. C.; MGIDLANA, S.; NYOKONG, T. Amphiphilic axially modified cationic indium-porphyrins linked to hydrophilic magnetic nanoparticles for photodynamic antimicrobial chemotherapy against gram-negative strain; *Escherichia coli*. **Dyes and Pigments**, 2021.

MANOEL, C. A.; PAOLILLO, F. R.; DE MENEZES, P. F. C. **Conceitos fundamentais e práticos de fotoestética**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2014.

MARTINS, C. V.; SILVA, D. L.; NERES, A. T.; MAGALHÃES, T. F. WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V. *et al.* Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **J Antimicrob Chemother**. v. 63, p.337-9, 2009.

MENEZES, P. F. C.; PERUSSI, J. R. **Estudos espectroscópicos e citotóxicos do Photogem® fotodegradado e dos fotoprodutos formados pela irradiação a laser**. 2006. 157 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Química Analítica, Universidade

Federal de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, 2006. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-18012007-161315/publico/PriscilaFernandaCamposdeMenezes.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2020.

MEEROVICH, G. A. et al. Photodynamic inactivation of bacteria and biofilms using cationic bacteriochlorins. **J. Phys.: Conf. Ser.** 691, 2016.

MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Research**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 591-600, out. 2003.

MORITZ, M. N.O.; GONÇALVES, J. L. S.; LINARES, I. A. P.; PERUSSI, J. R.; OLIVEIRA, K. T. Semi-synthesis and PDT activities of a new amphiphilic chlorin derivative. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 17, p. 39-47, mar. 2017.

NAGATA, J. Y.; HIOKA, N.; KIMURA, E.; BATISTELA, V. R.; TERADA, R. S. S.; GRACIANO, A. X.; BAESSO, M. L.; HAYACIBARA, M. F.; **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v.122, n.9 2012.

NEELOFAR, K.; SHREAZ, S.; RIMPLE, B.; MURALIDHAR, S.; NIKHAT, M.; KHAN, L. A. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. **Can J. Microbiol.** v. 57, p. 204-210, 2011.

OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. **OPAS BRASIL**, 2017. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812. Acesso em: 02 dez. 2019.

PELLOSI, D. S.; TESSARO, A. L.; MORET, F.; GAIO, E.; REDDI, E.; CAETANO, W.; QUAGLIA, F.; HIOKA, N.; **J. Photochem Photobiol.** v. 314, n.143, 2016.

PEREIRA, G. B. S. **Tetra(tien-2-il)porfirina e seus complexos com metais da primeira-série de transição: síntese, caracterização, investigação da citotoxicidade e interação com DNA.** 2020. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal de São Carlos, Ufscar, São Carlos, 2020.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 988-994, ago. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422007000400039>.

PRATAVIERA, S.; ULIANA, M. P.; LOPES, N. S. S.; DONATONI, M. C.; LINARES, D. R.; ANIBALL, F. F.; DE OLIVEIRA, Kleber T.; KURACHI, C.; SOUZA, C. W. O. Photodynamic therapy with a new bacteriochlorin derivative: Characterization and in vitro studies. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.** v. 34, p. 102252-102260, 2021

RAVEN, P. H. et al. **Biologia Vegetal.** 2001. 728 p.

RODRIGUES, A. R. M. **Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos.** 2018. 49 f.

Dissertação (Mestrado) - Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências da Saúde Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2018.

SANTEZI, C. et al. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral Infections: A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, 2018.

SANTOS, L. S. Estudos sobre síntese de novos fotossensibilizadores a partir de produtos naturais porfirinóide. 2013. 144f. Dissertação (Mestrado) - Química Orgânica, UFSCar, São Carlos, São Paulo, 2013.

SHARMA, S. K. et al. Synthesis and evaluation of cationic bacteriochlorin amphiphiles with effective in vitro photodynamic activity against cancer cells at low nanomolar concentration. **Journal Of Porphyrins And Phthalocyanines**, v. 17, n. 0102, p. 73-85, jan. 2013. World Scientific Pub Co Pte Lt.

SHI, H. et al. The inhibitory activity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy (ALA-PDT) on *Candida albicans* biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, 2021.

SILVA, A. P.; ULIANA, M. P.; GUIMARÃES, F. E. G.; De OLIVEIRA, K. T.; BLANCO, K. C.; BAGNATO, V. S.; INADA, N. M. Investigation on the in vitro anti-Trichophyton activity of photosensitizers. **Photochem Photobiol**, 2022.

SILVA, E. P. O.; MITTMANN, J.; FERREIRA, V. T. P.; CARDOSO, M. A. G.; BELTRAME, M. **Lasers Med. Sci.**v. 347, n. 30, 2014.

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

SOUZA, L. M. et al. Fotoinseticida: cúrcuma e luz no combate de larvas do *Aedes aegypti*. In: BAGNATO, V. S.; INADA, N. M.; BLANCO, K. C. **Controle Microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. p. 123-137.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, [S.L.], v. 54, n. 17, p. 4151-4202, abr. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4020\(98\)00015-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4020(98)00015-5).

STRATEN, D. V. et al. Oncologic Photodynamic Therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Res. Cancers**, v. 9, n. 2, 18 fev. 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5332942/>. Acesso em: 1 dez. 2020.

SVYATCHENKO, V. A. et al. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 *in vitro* using methylene blue and Radachlorin. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 33, 2021.

TAUFEMBACK, W. F. **Produção de eletricidade por consórcio de bactérias púrpura não sulfurosas em célula de combustível microbiana**. Trabalho de Conclusão de Curso - Centro de Ciências, Tecnologias e Saúde, Curso De Graduação em Engenharia De Energia, Universidade Federal De Santa Catarina, Araranguá, 2019.

TRIGO-GUTIERREZ, J. K. et al. Effect of Chloroaluminium phthalocyanine in cationic nanoemulsion on photoinactivation of multispecies biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 212-219, 2018. Disponível em:

ULIANA, Marciana Pierina et al. Fotossensibilizadores. In: BAGNATO, Vanderlei Salvador; INADA, Natalia Mayumi; BLANCO, Kate Cristina. **Controle Microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. p. 45-63.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-26, 2012. Hindawi Limited.

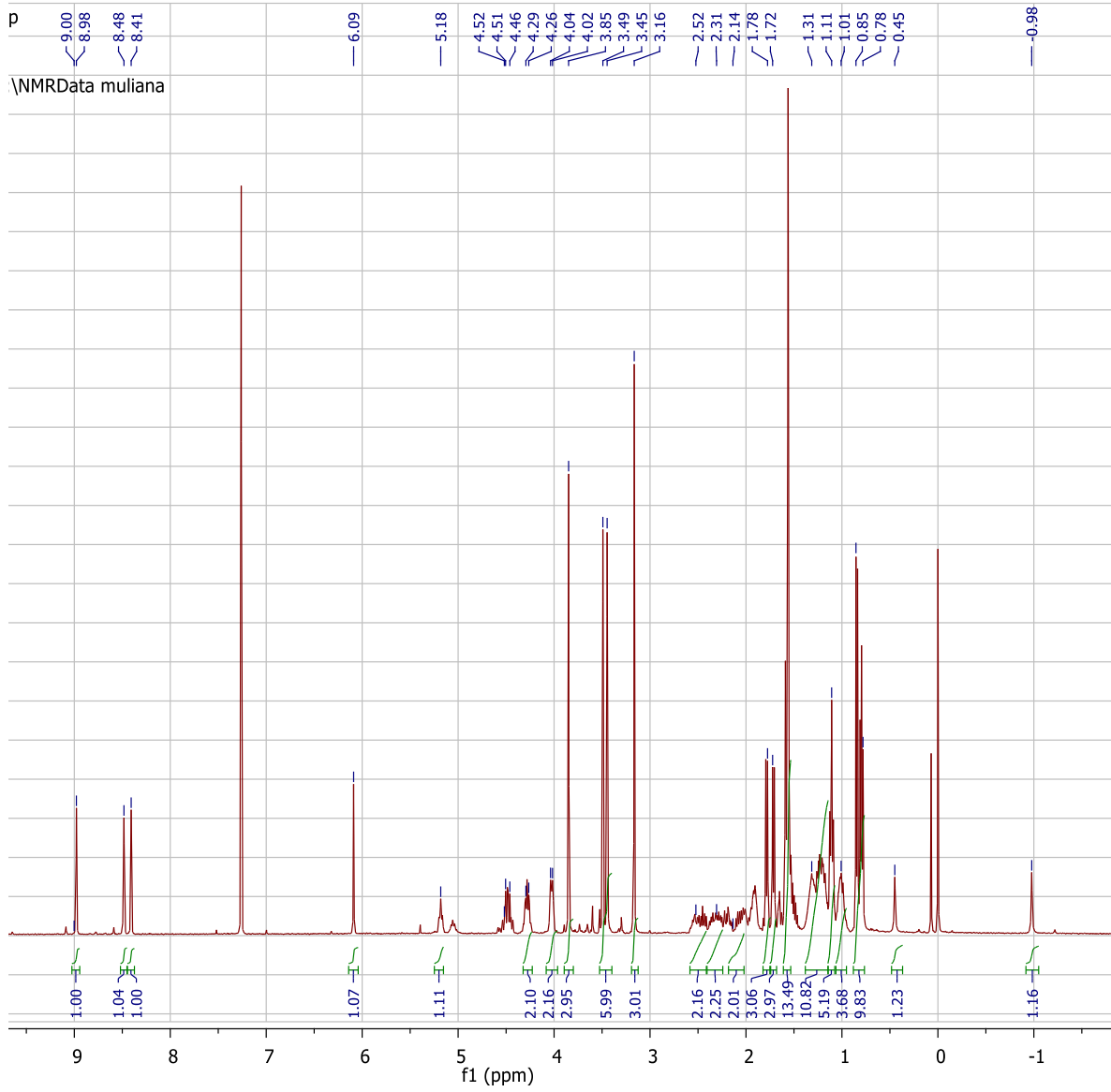
VILELA, S. F. G. et al. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: An in vitro study. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 704-710, 2012.

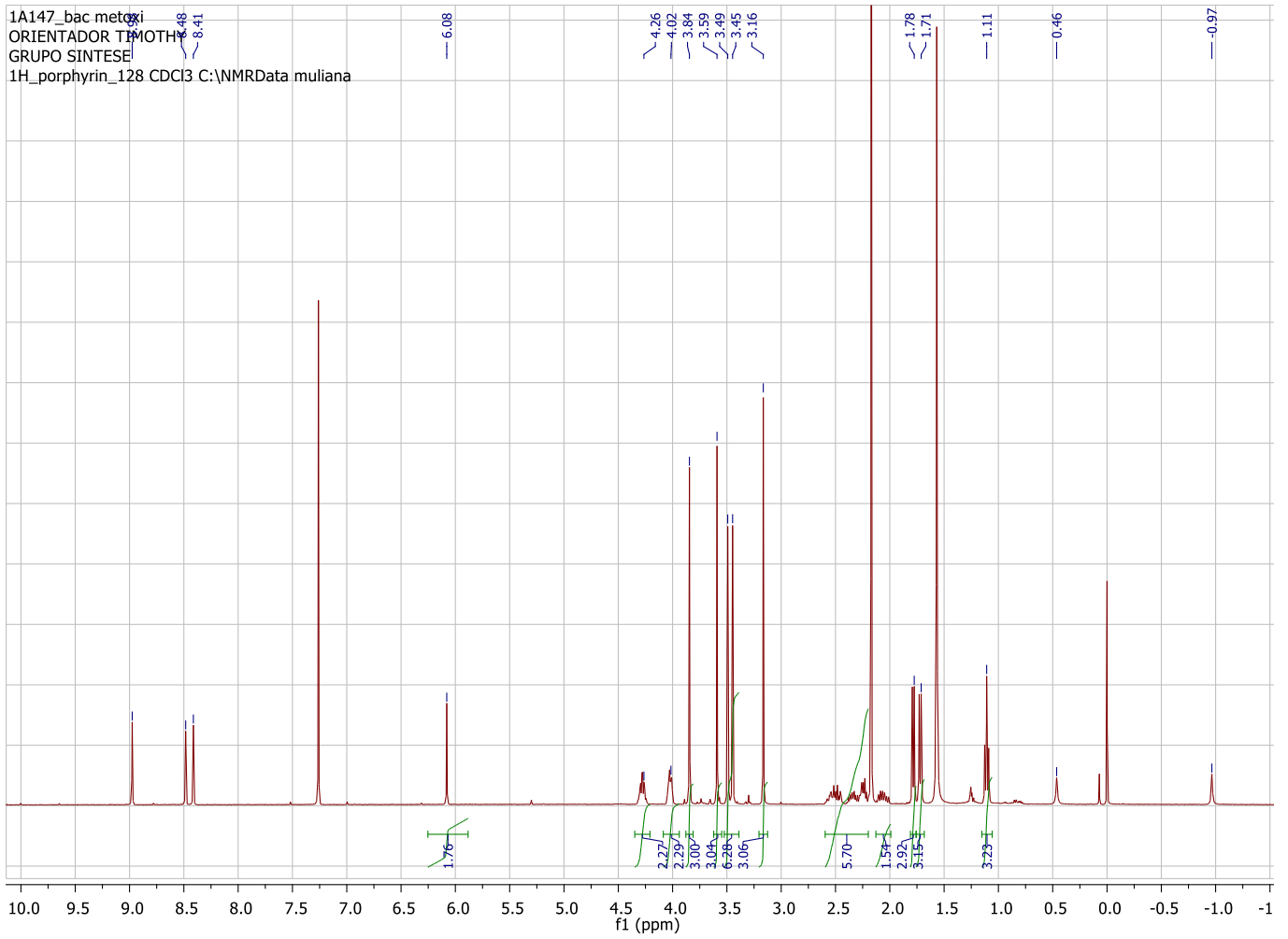
VOLLET-FILHO, J. D. *et al.* Fundamentos da ação fotodinâmica. In: BAGNATO, V. S. et al. **Controle Microbiológico com ação fotodinâmica**. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora, 2017. p. 21-44.

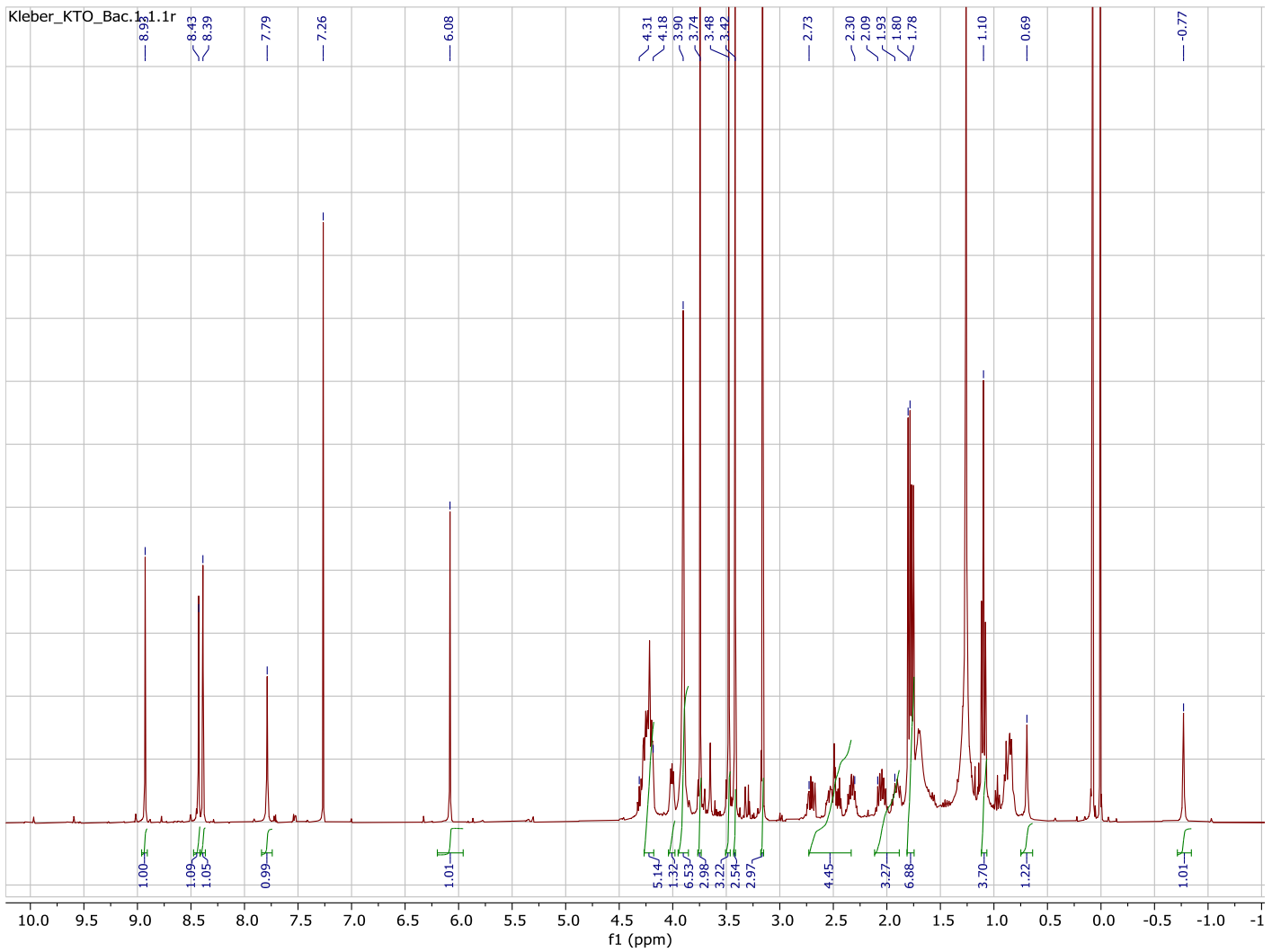
YANG, Z. et al. Novel Type of Water-Soluble Photosensitizer from *Trichoderma reesei* for Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Bacteria. **Langmuir**, v. 36, 2020.

YOON, I.; LI, J. Z.; SHIM, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clin Endosc.**, v. 46, n. 1, p. 7-23, jan. 2013.

ANEXOS

ESPECTRO DE ^1H -RMN DA BACTERIOCLOROFILA

ESPECTRO DE ^1H -RMN DA BACTERIOCLORINA METÓXI

ESPECTRO DE ^1H -RMN DA BACTERIOCLORINA TRIZMA

ESPECTRO DE UV-vis (DICLOROMETANO) DA BACTERIOCLORINA FITIL E
BACTERIOCLORINA METÓXI

