
PORFIRINAS E INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE MICRO-ORGANISMOS: UMA REVISÃO
PORPHYRINS AND PHOTODYNAMIC INACTIVATION OF MICRO-ORGANISMS: A REVIEW

HAMMERSCHMIDT, Iris J.M.S.¹; FLORES, Gabrielli V.²; GONÇALVES, Alan G.³; BARREIRA, Sandra M. W.⁴

¹Farmacêutica. Mestra pelo programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas -UFPR

²Aluna do Curso de Farmácia - UFPR

³Prof. Adjunto de Controle de Qualidade, Curso de Farmácia- UFPR

⁴Prof.^a Associada de Síntese de Fármacos, Curso de Farmácia- UFPR. Email: sandra@ufpr.br

RESUMO:

A resistência microbiana tem sido uma grande preocupação para a saúde pública, com sérias implicações econômicas, sociais e políticas. Devido ao alarmante crescimento da resistência a antibióticos surgiu a necessidade de métodos alternativos de tratamento. Além disso, os métodos de inativação desses patógenos nem sempre são eficientes e ecologicamente inertes. Inúmeros estudos *in vitro* têm mostrado que a inativação fotodinâmica de micro-organismos é bastante eficaz na destruição de vírus, protozoários, assim como bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos. O conceito de inativação fotodinâmica prega que a combinação de uma molécula fotossensível, luz e oxigênio molecular resultam na produção de espécies reativas capazes de reagir com outras moléculas e inativá-las, resultando na destruição seletiva de um alvo biológico. As principais classes de fotossensibilizadores utilizadas até o momento incluem as porfirinas, ftalocianinas e as fenotiazinas. A inativação fotodinâmica tem sido proposta como um método de inativação de micro-organismos patogênicos com bom custo-benefício e ecologicamente correto, pois envolve três elementos não-tóxicos (fotossensibilizador e luz em ambiente oxigenado), induzindo destruição total dos microorganismos, o que constitui uma promissora tecnologia biofotônica. Vários avanços com a inativação fotodinâmica de micro-organismos ocorreram nas últimas décadas. As pesquisas mais recentes mostram que em um futuro bem próximo será possível desinfetar matérias como sangue, produtos derivados de sangue, águas residuais, superfícies. Outros estudos mostram que esta é uma técnica promissora para utilização clínica no tratamento de infecções superficiais causadas por fungos, bactérias e vírus.

Palavras-chave: Inativação fotodinâmica. Fotossensibilizador. Derivados porfirínicos. Micro-organismos.

ABSTRACT:

Microbial resistance has been a major concern for public health, with serious

implications for economy, society and politics. Due to the alarming increase in antibiotic resistance the necessity for alternative methods of treatment has emerged. In addition, methods of inactivation of pathogens are not always effective and environmentally inert. *In vitro* studies have shown that the photodynamic inactivation of micro-organisms is very effective in destroying viruses, protozoa, as well as gram-positive bacteria, gram-negative bacteria and fungi. The concept of photodynamic inactivation shows that the combination of a photosensitive molecule, light and molecular oxygen results in the production of reactive species capable of reacting with other molecules, resulting in the selective destruction of a biological target. The major classes of photosensitizers include porphyrins, phthalocyanines and phenothiazines. Photodynamic inactivation has been proposed as a method of inactivation of pathogenic micro-organisms with cost-effective and environmentally friendly, since it involves three non-toxic elements (photosensitizer, light and molecular oxygen), leading to complete destruction of microorganisms, which is a promising biophotonic technology. Several advances in photodynamic inactivation of micro-organisms occurred in recent decades. Recent studies have shown that in the very near future will be possible to disinfect materials such as blood, blood products, wastewater and surfaces. Studies have also shown that this technique has potential for clinical use in the treatment of superficial infections caused by fungi, bacteria and viruses.

Keywords: Photodynamic inactivation. Photosensitizer. Porphyrin derivatives. Micro-organisms.

1. INTRODUÇÃO

Patógenos microscópicos estão amplamente distribuídos na natureza (no ar, nas casas, em diferentes superfícies, plantas e alimentos) e são inúmeras as fontes de infecções existentes. Os impróprios e prolongados tratamentos com antibióticos têm conduzido a uma maior resistência dos micro-organismos a estas substâncias. Além disso, os métodos de inativação desses patógenos nem sempre são eficientes e ecologicamente inertes. A seleção permanente de novas cepas de bactérias antibiótico-resistentes é, atualmente, um importante problema na medicina humana e veterinária (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004; CALIM; PARASCA, 2009).

Já na metade do século XX, logo após a introdução da penicilina no mercado, os cientistas começaram a notar o aparecimento de uma cepa de *Staphylococcus aureus* penicilina-resistente, uma bactéria comum que participa da flora normal do corpo humano. Cepas resistentes de gonococo, *Shigella flexnery* (uma das principais causas de morte prematura em países em desenvolvimento) e *Salmonella* sp seguiram rapidamente esse caminho. Desde esse primeiro caso de *Staphylococcus* resistente, o problema da resistência microbiana tem sido uma grande preocupação para a saúde

pública, com sérias implicações econômicas, sociais e políticas que afetam nossa espécie em âmbito global, cruzando todos os limites ambientais e étnicos (OMS, 2000).

Em um contexto rentável e de tecnologias ecologicamente corretas, a pesquisa moderna em Microbiologia e domínios afins (Biofísica, Química, Medicina, Física) concentrou-se no desenvolvimento de novos métodos de terapia antimicrobiana, mais eficientes e rápidos, não invasivos e não tóxicos, que não conduzem à resistência microbiana. Um desses métodos é a inativação fotodinâmica de micro-organismos (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004; CALIM; PARASCA, 2009). Esta técnica representa uma ótima alternativa para a destruição de células microbianas, e em vista disso as porfirinas e compostos relacionados se apresentam como fotossensibilizadores com efeitos citotóxicos efetivos contra os micro-organismos em geral (ERGAIEG *et al.*, 2008).

O presente trabalho destina-se a fazer uma revisão bibliográfica dos principais estudos sobre aplicação das porfirinas na inativação fotodinâmica de micro-organismos.

2. ASPECTOS GERAIS

As porfirinas são uma classe de moléculas orgânicas, com estrutura geral de macrociclo tetrapirrólico (formado por quatro anéis pirrólicos), ligados por ligações metínicas (-CH-) (Figura 1). No centro da estrutura há um espaço apropriado para acomodar um íon metálico (MILGRON, 1997).

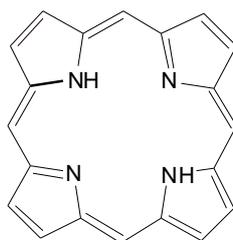


Figura 1- Macrociclo tetrapirrólico comum das porfirinas.

A palavra porfirina é originária da antiga Grécia, onde a palavra *porphura* era usada para designar a cor púrpura. Esta designação faz sentido, uma vez que as porfirinas são pigmentos fortemente corados e que apresentam a cor púrpura. Pequenas modificações no macrociclo tetrapirrólico básico são capazes de originar moléculas com funções bioquímicas diversas, como as clorofilas e hemoglobinas (MILGRON, 1997).

As primeiras porfirinas estudadas foram as de origem natural, que estão envolvidas com reações de metabolismo bioquímico, como na fotossíntese e

respiração celulares. Porfirinas sintéticas são largamente utilizadas, e com o progresso do conhecimento, as várias áreas de aplicações vêm se ampliando e abrindo novas linhas de pesquisas (MILGRON, 1997).

Das vastas áreas onde as porfirinas e seus derivados são aplicados destacam-se: catálise química, catálise enzimática, sensores químicos, cristais líquidos, fungicidas e inseticidas. São também utilizadas como transportadores artificiais de oxigênio, no diagnóstico de neoplasias, na esterilização do sangue. Porém, a sua aplicação mais importante nos dias atuais está na Medicina, na qual já são utilizados, com sucesso, no tratamento de certos tumores por terapia fotodinâmica. Porfirinas estão sendo estudadas para aplicação no tratamento de águas residuais (HAMBLIN *et al.*, 2002), inativação de fungos (CORMICK *et al.*, 2009) e de vírus (ASANAKA *et al.*, 1989; VZOROV *et al.*, 2002; TOMÉ *et al.*, 2005).

Na fotoinativação microbiana a escolha de um bom fotossensibilizador é indispensável para o sucesso da técnica. A molécula escolhida deve ser capaz de absorver a luz visível, excitando-se para o estado tripleto e transferir sua energia para o oxigênio molecular ou outras moléculas. Quando o fotossensibilizador é exposto à luz em presença de oxigênio, a energia da luz é absorvida pelo composto e em seguida repassada para o oxigênio molecular, com a formação do oxigênio singleto e radicais livres, que são substâncias citotóxicas para os micro-organismos (JORI; BROWN, 2004; COSTA *et al.*, 2008). Durante o processo, o agente fotossensibilizador é regenerado de modo que age como um catalisador, formando várias moléculas de oxigênio singleto. Assim, enquanto houver luz e oxigênio molecular, o fotossensibilizador é capaz de catalisar essa reação (JORI; BROWN, 2004). Em resumo, o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica antimicrobiana é o resultado da interação de fótons da luz visível, em apropriado comprimento de onda, com moléculas fotossensíveis em concentrações intramoleculares adequadas. Os efeitos funcionais e bioquímicos causados pelos fotossensibilizadores incluem inativação de enzimas e outras proteínas, peroxidação de lipídeos, levando à lise de membranas celulares, lisossomos e mitocôndrias. As principais classes dessas moléculas utilizadas até o momento incluem as porfirinas, ftalocianinas e as fenotiazinas (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008).

3. FOTOINATIVAÇÃO VIRAL

Porfirinas podem ser aplicadas em situações em que a inativação viral for necessária, como por exemplo, para inativação *in vitro* de vírus não envelopados em componentes sanguíneos e outros meios aquosos. Desinfecção por fotoinativação por porfirinas sintéticas, portanto, pode oferecer uma abordagem eficaz e relativamente segura para remoção de vírus não envelopados de meios aquosos (CASTEEL *et al.*,

2004).

A hematoporfirina (HP) é um pigmento produzido pela degradação natural da hemoglobina e é livre de ferro. Na presença de luz apresenta atividade citotóxica, e *in vitro* verificou-se que ela é capaz de inibir a transcrição reversa de alguns vírus. A inibição ocorre, segundo o autor, devido à interação da molécula de HP com a enzima que catalisa a transcrição, a transcriptase reversa (PERLIN *et al.*, 1987).

Perlin e colaboradores (1987) avaliaram a atividade da HP como inibidor da replicação *in vitro* do vírus *Influenza A* e *Herpes simplex*. Também avaliaram esse efeito em outros vírus, mas obtiveram resultados satisfatórios apenas com os primeiros. O efeito da inibição da replicação viral foi observado quando a HP foi administrada logo após a inoculação do vírus ou da infecção.

Derivados de hematoporfirina (HPD), gerados a partir de uma porfirina fisiológica, foram capazes de inativar vírus envelopados como *Herpes simplex*, HIV, citomegalovírus e vírus da imunodeficiência simia (CASTEEL *et al.*, 2004).

Algumas porfirinas aniônicas demonstraram ser capazes de inibir a replicação de vírus HIV. Essa inativação ocorreu em presença de luz (NEURATH *et al.*, 1992; NEURATH; STRICK; DEBNATH, 1995). Com base nesse resultado, Dairou, Vever e Brault (2004) avaliaram as interações de uma série de porfirinas aniônicas no escuro, assim como na presença de luz. Os resultados obtidos por eles mostram uma efetiva fotoinativação do vírus HIV-1 por essas porfirinas aniônicas. Além disso, as porfirinas e compostos relacionados podem ser excitados pela luz vermelha, uma vantagem para o tratamento de células do sangue, pois preserva as funções das células sanguíneas. Essa classe de fotossensibilizadores é desprovida de qualquer potencial mutagênico (RAPP; KEMENY, 1977). Essas características fazem das porfirinas e compostos relacionados candidatos atraentes para o tratamento fotodinâmico em abordagens profiláticas de infecções virais.

As porfirinas catiônicas da Figura 2 foram utilizadas em estudos preliminares de Izquierdo *et al.* (2007) com o vírus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1). Observou-se que apesar da semelhança estrutural entre os isômeros os compostos gerados a partir do composto 1 foram mais eficazes na fotoinativação do vírus comparando com aqueles gerados a partir do composto 2 nas mesmas condições (IZQUIERDO *et al.*, 2007).

Existem poucos estudos que avaliam a fotoinativação em cepas resistentes de vírus. Os derivados de benzoporfirina foram testados contra cepas de HIV-1 resistentes ao AZT. Os resultados demonstraram que essa cepa pode ser inativada por derivados benzoporfirínicos, assim como as cepas não resistentes ao AZT (NORTH; COOMBS; LEVY, 1994). Estudos de vários pesquisadores avaliaram o desenvolvimento de cepas resistentes após a exposição do vírus à fotoinativação. Até então não se relatou o desenvolvimento de cepas resistentes devido a essa terapia (COSTA *et al.*, 2011).

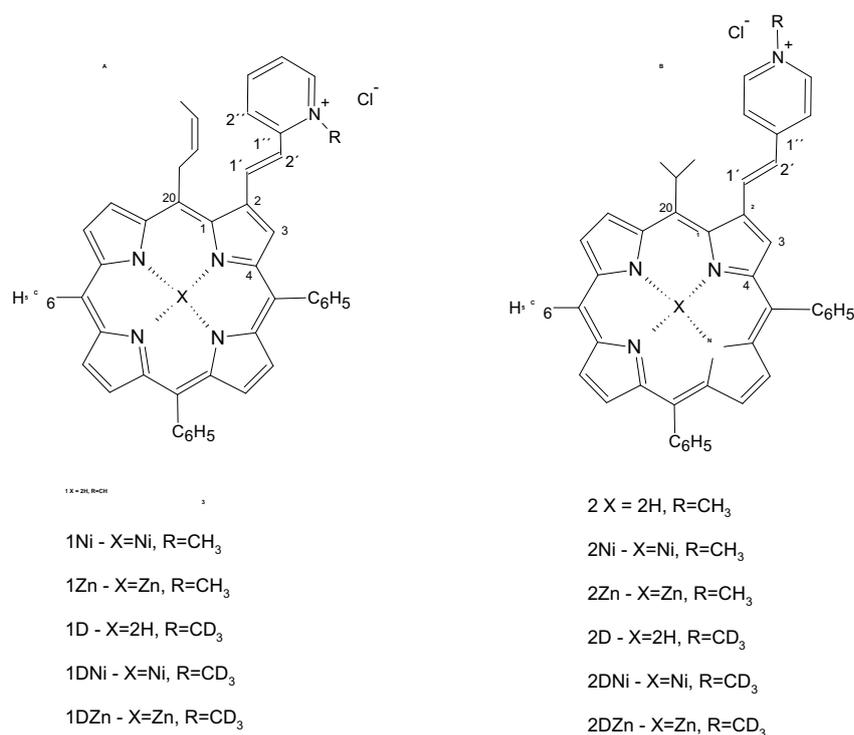


Figura 2- Esquema das β -vinilpiridilporfirinas catiônicas metaladas geradas a partir dos compostos 1 (A) e do composto 2 (B) (adaptado de Izquierdo *et al.*, 2007).

Costa *et al.* (2011) demonstraram que a porfirina tricatiônica Tri⁺Py⁺-Me-PF (Figura 3) apresentou atividade antiviral e foi eficaz na inativação de fagos tipo T4 após irradiação com luz branca. Estes fagos inativados não recuperaram a sua viabilidade após 120 horas de incubação no escuro; também não desenvolveram resistência mesmo após dez ciclos de repetição de fotoinativação (COSTA *et al.*, 2011). Os autores concluíram que a Tri-Py⁺-Me-PF é uma potencial alternativa para substituição dos tratamentos convencionais com antimicrobianos utilizados nas infecções virais (COSTA *et al.*, 2011).

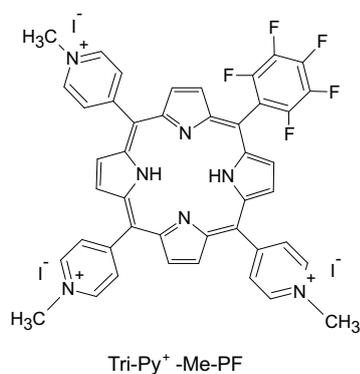


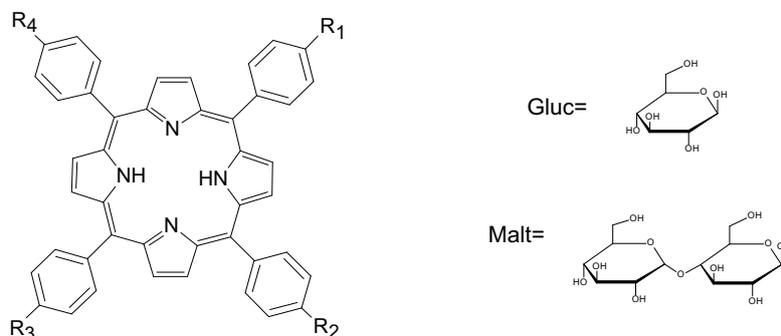
Figura 3- Estrutura da tri-iodeto de 5,10,15- tris (1- metilpiridínio-4il)-20-(pentafluorofenil)porfirina (adaptado de COSTA *et al.*, 2011).

4. FOTOINATIVAÇÃO FÚNGICA

Porfirinas neutras com caráter anfifílico podem ser uma interessante alternativa para a solução de problemas com a permeabilidade e se espera que sejam mais permeáveis, visto que ambos os caracteres hidrofílico e hidrofóbico estão presentes na mesma estrutura, levando a um aumento da especificidade e eficácia do composto (CARRÉ *et al.*, 1999).

Derivados porfirínicos com uma ou duas moléculas de glicose como substituintes possuem um coeficiente de partição maior indicando que o caráter anfifílico apresenta um polo hidrofóbico mais acentuado que o hidrofílico. Sendo assim, essas moléculas se mostraram mais pró-ativas e são mais facilmente internalizadas pelas células. Em contraste, moléculas com quatro glicose/maltose como substituintes (tetraglucoseporfirina e tetramaltoseporfirina) exibem baixo coeficiente de partição, e por isso apresentam fraca atividade antifúngica por não serem facilmente internalizados na célula (CARRÉ *et al.*, 1999).

Os mesmos autores avaliaram a fotoatividade de uma série de porfirinas sintéticas com açúcares ligados aos carbonos *meso* por ligações O-glicosídicas. Foi avaliada a fotoatividade das porfirinas (Figura 4) utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo.



Radicais	Porfirina
$R_1=R_2=R_3=R_4= \text{CH}_3$	tetratoluilporfirina
$R_1= \text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-OGlc}$ $R_2=R_3=R_4= \text{CH}_3$	monoglucosilporfirina
$R_1=R_2= \text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-Oglc}$ $R_3=R_4= \text{CH}_3$	<i>cis</i> -diglucosilporfirina
$R_1=R_3= \text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-OGlc}$ $R_2=R_4= \text{CH}_3$	<i>trans</i> -diglucosilporfirina
$R_1=R_2=R_3= \text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-OGlc}$ $R_4= \text{CH}_3$	triglucosilporfirina
$R_1=R_2=R_3=R_4= \text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-OGlc}$	tetraglucosilporfirina
$R_1=R_2=R_3=R_4= \text{O}-(\text{CH}_2)_3\text{-OMal}$	tetramaltosilporfirina

FIGURA 4- Estruturas das porfirinas (adaptado de CARRÉ *et al.*, 1999).

De acordo com os resultados obtidos, triglucosilporfirina foi a molécula menos pró-ativa desta série, embora a hidrofobicidade seja levemente menor que da tetraglucoseporfirina e tetramaltoseporfirina. Também concluíram que das porfirinas em questão as mais ativas são monoglucosilporfirina e *cis*-diglucosilporfirina; ambas possuem o maior caráter anfífilico, indicando a relação estrutura química da molécula com a permeação celular. A atividade fotobiológica das glicoporfirinas depende da localização do açúcar na molécula.

Ainda segundo CARRÉ *et al.* (1999), a atividade fotodinâmica da hematoporfirina em fungos sugere que a fotoinativação ocorre pela produção de oxigênio singlete extracelular. Segundo esses pesquisadores, o dano produzido na membrana plasmática é o que ocasiona a inativação da célula. Portanto, devido à hematoporfirina não conseguir penetrar na célula, os autores concluíram que não há efetividade na fotoinativação. A hematoporfirina só poderia entrar na célula após a destruição da membrana plasmática, uma vez que ela não é permeável à membrana (CARRÉ *et al.*, 1999).

Em trabalho publicado em 2004, Luksiene, Peciulyte e Lugauskas selecionaram micromicetos de várias cepas que são prejudiciais para a indústria alimentar e também avaliaram a efetividade da hematoporfirina como agente fotossensibilizador. Esses micro-organismos se alimentam de substratos vegetais e grãos de milho, e ao ingerir esses alimentos contaminados induzem doenças no hospedeiro. Neste trabalho foi empregada a hematoporfirina em solução de dimetil éter e posterior irradiação com lâmpada apropriada em tempo determinado. Como resultados, a hematoporfirina foi efetiva e em alguns casos pode inibir a germinação de esporos. Além disso, antifúngicos de ação fotossensibilizadora, com ação comprovada *in vitro* apresentam grande potencial para inibir o desenvolvimento de fungos e podem ser utilizados para esterilizar ou descontaminar várias superfícies com adequado custo-benefício ambiental e humano. É importante notar que derivados de hematoporfirina *per se*, em alguns casos, podem servir também como inibidores de germinação de esporos (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004).

Lambrechts, Aalders e Marle (2005) testaram a efetividade da porfirina catiônica cloreto de 5-fenil-10,15,20-Tris (*N*-metil-4-piridil) porfirina (TriP[4]) contra *C. albicans*. Os resultados demonstraram que essa porfirina pode ser efetiva para a inativação de *C. albicans*, além de morte celular após grande influxo de (TriP[4]) quando associado à iluminação. Na ausência de iluminação foi observado que pouca quantidade de (TriP[4]) penetrou na célula, não sendo suficiente para causar danos e levar à morte celular.

No ano de 2009, Cormick e colaboradores compararam a atividade fotoinativadora de porfirinas catiônicas com aniônicas, levando em consideração parâmetros como concentração da solução, densidade das células/colônias e tempo de

exposição à luz visível. Neste trabalho, as porfirinas em questão foram iodeto de 5-(4-trifluorofenil)-10, 15,20-tris(4-trimetilamôniofenil) porfirina (TFAP³⁺), tosilato de 5,10,15,20-tetra(4-*N,N,N* fenil-trimetilamônio)porfirina (TMAP⁴⁺) e 5,10,15,20-tetra(4-sulfonato-fenil)porfirina (TPPS⁴⁻) (Figura 5). A comparação da ação das porfirinas foi realizada *in vitro* utilizando *Candida albicans*. O micro-organismo foi escolhido devido à crescente resistência contra os tratamentos tradicionais. O estudo tinha como intuito avaliar a efetividade de porfirinas catiônicas, para aumentar o leque de variedade de moléculas fotoinativadoras contra fungos, possibilitando novas alternativas de tratamentos.

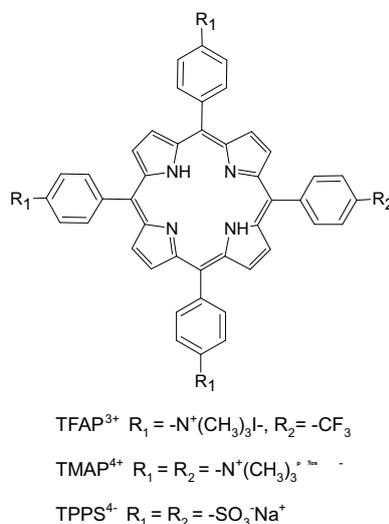


Figura 5- Estrutura das porfirinas TFAP³⁺, TMAP⁴⁺ e TPPS⁴⁻ (adaptado de CORMICK *et al.*, 2009).

O estudo concluiu que as porfirinas catiônicas em questão são eficazes para a inativação de *C. albicans* tanto em suspensão quanto na superfície do ágar. O aumento do dano celular é diretamente proporcional ao aumento da concentração do fotossensibilizante, pois testes mostraram que com o aumento da concentração ocorre um aumento da entrada de moléculas de porfirina nas células fúngicas, causando mais danos. Em contrapartida, com o aumento da densidade das células/colônias ocorre uma diminuição na atividade da porfirina diminuindo o efeito citotóxico. Comparando a velocidade de ação entre as porfirinas catiônicas, foi observado que a porfirina tri-catiônica inativa *C. albicans* em menos tempo do que a porfirina tetra-catiônica. Como conclusão, TFAP³⁺ e a TMAP⁴⁺ são interessantes fotossensibilizadores para o tratamento e controle de *C. albicans* em suspensões de células e infecções localizadas (CORMICK *et al.*, 2009).

O trabalho de Gomes *et al.* (2011) investigou a eficiência de duas famílias de porfirinas catiônicas (Figura 6), com quatro grupos piridínicos com cadeias de

hidrocarbonetos de comprimentos diferentes, na fotoinativação de conídios do fungo filamentoso *Penicillium chrysogenum*. A escolha deste fungo como modelo, segundo os autores, é devido à sua ampla distribuição na natureza e estar associado a um baixo risco de manuseio em laboratório.

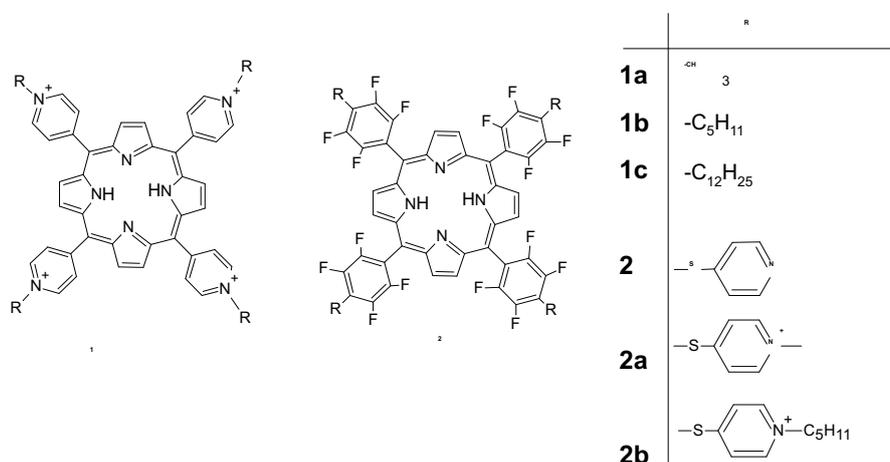


FIGURA 6- Representação da estrutura de duas classes de porfirinas (adaptado de GOMES *et al.*, 2011).

No estudo, os autores utilizaram seis porfirinas, que foram as seguintes: tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis (*N*-metilpiridínio-4-il) porfirina (**1a**); tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(*N*-pentilpiridínio-4-il) porfirina (**1b**); tetrabrometo de 5,10,15,20-tetraquis (*N*-dodecilpiridínioc-4-il) porfirina (**1c**); 5,10,15,20-tetraquis [2,3,5,6-tetrafluor-4-(4-piridilsulfanil)-fenil] porfirina (**2**); tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis [2,3,5,6-tetrafluor 4-(*N*-metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil]porfirina(**2a**); tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis[2,3,5,6-tetrafluor-4-(*N*-pentilpiridínio-4-ilsulfanil)fenil] porfirina (**2b**). Concluíram com o trabalho que as porfirinas tetra-catiônicas podem ser promissoras fotossensibilizadores para inativação de conídios de fungos, embora seu desempenho entre as moléculas seja bastante variável devido às diferentes cadeias de *N*-alquil. O tamanho da cadeia *N*-alquil mostrou ter bastante influência sobre a eficiência da fotoinativação, principalmente por afetar a ligação com a parede celular e influenciar na solubilidade. O composto **1a** se mostrou mais eficiente que **1b**, e a diferença entre eles consiste no tamanho do radical *N*-alquil, sendo que **1a** possui apenas um átomo de carbono, enquanto **1b**, cinco. Os compostos com cadeias ainda mais longas se mostraram ainda menos eficientes provavelmente por uma agregação do fotossensibilizador durante o ensaio. O composto **1a** apresentou um desempenho melhor que os outros, pois produziu mais moléculas de oxigênio singleto, fez uma ligação mais eficiente com o conídio e apresentou baixa agregação do fotossensibilizador que possibilitou uma distribuição mais homogênea das porfirinas

sobre os conídios (GOMES *et al.*, 2011). Os derivados porfirínicos **1c**, **2a** e **2b** não apresentaram resultados significativos.

5. FOTOINATIVAÇÃO BACTERIANA

As infecções bacterianas têm um papel marcante na história da humanidade. Desde tempos remotos, diversos agentes bacterianos têm sido responsáveis por diversas doenças endêmicas ou epidêmicas que tiveram efeitos devastadores sobre a população humana (TRABULSI, 2008).

A inativação de bactérias pode ser feita por vários métodos, ditos convencionais, como os métodos físicos de controle (calor, calor úmido, pasteurização, calor seco, radiações e outros) e métodos químicos que visam a conservação da matéria orgânica por meio de uso de agentes químicos (alcoóis, aldeídos, ácidos e outros). O tratamento convencional de moléstias causadas por bactérias utiliza substâncias químicas, os antibacterianos, para inativá-las ou destruí-las. A ação dos antibacterianos pode levar à inibição do crescimento, à inativação ou à morte do agente infeccioso (TRABULSI, 2008).

Novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas estão sendo desenvolvidas devido ao crescente número de doenças infecciosas e à crescente resistência bacteriana aos antibióticos. Neste sentido, a inativação fotodinâmica representa uma interessante alternativa para a inativação de micro-organismos (CAMINOS; DURANTINI, 2006).

Em geral, bactérias gram-positivas são eficientemente inativadas por porfirinas fotossensibilizantes; no entanto, bactérias gram-negativas são relativamente impermeáveis a porfirinas neutras ou aniônicas, devido à sua superfície com carga negativa. Essa resistência é atribuída à presença de membrana externa altamente organizada, o que dificulta a passagem do fotossensibilizador (CAMINOS; DURANTINI, 2006; ERGAIEG; SEUX, 2009). Porém, tem sido demonstrado que muitos desses fotossensibilizadores são eficazes se co-administrados com um agente catiônico, como o Polymixin®. Este é capaz de romper a parede celular da bactéria o suficiente para que o composto penetre e possa causar danos letais quando exposto à luz (JORI; BROWN, 2004).

Estudos realizados com porfirinas *meso*-substituídas, como a T₄MPyP (Figura 7), comprovaram que porfirinas carregadas positivamente se mostram eficazes tanto para bactérias gram-positivas quanto para gram-negativas (MERCHAT *et al.*, 1996).

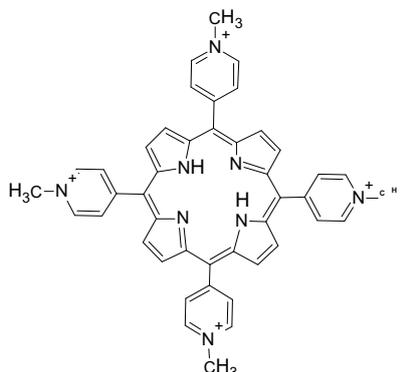


Figura 7- Estrutura da T₄MPyP (fonte: CAIUT; MANGRICH ; NAKAGAKI, 2012).

Para aumentar a efetividade da atividade fotoinativadora de uma porfirina, segundo Merchat *et al.* (1996) a substituição na posição *meso* por si só não é suficiente. A orientação da carga é importante para aumentar a efetividade do fotossensibilizador. No entanto, se a carga do radical substituinte for negativa esta molécula não será efetiva contra bactérias gram-negativas. A atividade fotoinativadora das porfirinas *meso*-substituídas foi avaliada: tetra-iodeto de tetra (4*N*-metilpiridil) porfina (T₄MPyP), tosilato de 5,10,15,20-tetra(4-*N,N,N* fenil-trimetilamônio)porfina (T₄-MAP) e 5,10,15,20-tetra(4-sulfonato-fenil)porfirina (TPPS₄). Os resultados descritos no trabalho mostram que as duas porfirinas catiônicas *meso*-substituídas, T₄MPyP e T₄-MAP, são eficientes fotossensibilizadores para a inativação de bactérias gram-positivas e gram-negativas com irradiação de luz visível (MERCHAT *et al.*, 1996). Já em 1996, Merchat citava que uma alternativa para fotoinativação de bactérias gram-negativas com porfirinas aniônicas seria o encapsulamento da porfirina em lipossomas.

Uma alternativa para a inativação de bactérias gram-negativas é o uso de porfirinas catiônicas, onde não se faz necessário a presença de um agente adicional para permear na célula. A carga positiva da molécula fotossensibilizante aparentemente promove uma interação eletrostática com a carga negativa da superfície da bactéria, aumentando a eficiência do processo de fotoinativação (CAMINOS; DURANTINE, 2006; COSTA, 2008).

O estudo de Costa (2008) relata que geralmente bactérias gram-positivas são eficazmente inativadas por grande variedade de porfirinas, ao passo que bactérias gram-negativas usualmente são mais resistentes à ação de fotossensibilizadores neutros. No mesmo trabalho, Costa estudou o efeito de seis derivados catiônicos de porfirinas em bacteriófagos de *E. coli*. Os resultados demonstraram que com o aumento do número de carga positiva da molécula, a eficiência do processo de fotoinativação também aumenta.

Em um estudo desenvolvido por Caminos e Durantini (2006) foi analisada a ação de porfirinas tricatiônicas para a fotoinativação de cepas de *E. coli*. As porfirinas usadas neste estudo foram: iodeto de 5,10,15-tris[4-(3-*N,N,N*-trimetilamôniopropóxi)-fenil]-20-(4-trifluorometilfenil)porfirina (A_3B^{3+}) e a *p*-tosilato de 5,10,15,20-tetra(4-*N,N,N*-trimetilamôniofenil)porfirina (TTAP $^{4+}$), Figura 8. Eles concluíram que as porfirinas catiônicas A_3B^{3+} e TTAP $^{4+}$ são eficazes na inativação de *E. coli*, apresentando como fator limitante a densidade das colônias, que pode ser contornado aumentando a superfície de contato das colônias a serem inativadas. Neste estudo, os experimentos mostraram que a penetração do agente fotossensibilizador na colônia não é significativa, sendo que apenas as bactérias da superfície são inativadas.

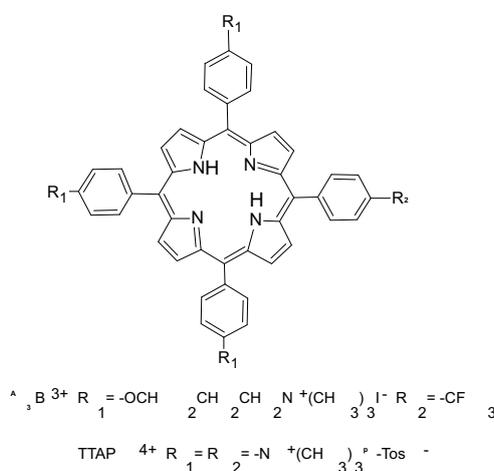


Figura 8- Estrutura das porfirinas (adaptado de CAMINOS; DURANTINI, 2006).

Em estudo para avaliar a efetividade de porfirinas catiônicas contra bactérias gram-negativas, Carvalho *et. al.* (2007) verificaram a eficácia dessas porfirinas para o monitoramento de contaminação por coliformes fecais e outras bactérias em efluentes, onde a maioria das bactérias presentes é do tipo gram-negativa. As porfirinas catiônicas inativaram cerca de 90% das gram-negativas, enquanto as porfirinas neutras não foram eficazes contra essas bactérias. No mesmo estudo foi verificado que porfirinas neutras são eficazes para a fotoinativação de bactérias gram-positivas.

Em contraste com os estudos mais comuns de fotossensibilizadores para a inativação de bactérias, onde geralmente são estudadas as porfirinas catiônicas, Burda *et al.* (2012) identificaram e avaliaram a atividade antimicrobiana de porfirinas neutras *meso*-substituídas e metaloporfirinas contra patógenos gram-positivos e gram-negativos. Com o estudo, concluíram que as substituições nas duas posições *meso* da porfirina com radicais hidroxifenil ou porfirinas com zinco são ativas por dois mecanismos, tanto o sob a luz ou no escuro. A atividade antibacteriana dessas

porfirinas neutras *meso*- substituídas e metaloporfirinas foi avaliada frente a cepas hospitalares de *S. aureus* multi-resistentes (BURDA *et al.*, 2012).

6. UTILIZAÇÃO ATUAL DA FOTOINATIVAÇÃO EM MICRO-ORGANISMOS

A inativação fotodinâmica tem sido proposta como um método de inativação de micro-organismos patogênicos com bom custo-benefício e ecologicamente correto, uma vez que envolve três elementos não-tóxicos (fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular), constituindo uma promissora tecnologia biofotônica (PERUSSI, 2007).

No tratamento de papiloma vírus (HPV), a inativação fotodinâmica tópica ou sistêmica tem se mostrado eficiente, já que terapias convencionais não conseguem prevenir recorrências múltiplas. A técnica utilizando éter de diematoporfirina foi testada em 48 pacientes e apresentou decréscimo significativo na taxa de crescimento do papiloma, a qual se manteve por três anos em acompanhamento (SHIKOWITZ *et al.*, 1998).

De modo similar a muitas células de mamíferos, a maioria das bactérias utiliza o caminho biossintético do grupamento heme para produzir porfirinas a partir do precursor ALA. A acne inflamatória é causada pelo crescimento da *Propionibacterium acnes* nas glândulas sebáceas e essas bactérias acumulam porfirinas que apresentam fluorescência no vermelho; essa propriedade tem sido usada como base para o tratamento fototerápico da acne. A fotoinativação com aplicação tópica de ALA e aplicação de luz vermelha foi testada em 22 pacientes com acne nas costas. Foi observada a eliminação da acne inflamatória que persistiu por pelo menos 20 semanas (HONGCHARU *et al.*, 2000).

O primeiro estudo para examinar a eficácia de porfirinas na fotoinativação de patógenos humanos, tais como o vírus da hepatite A (HAV) no plasma e outros líquidos, foi realizado por Casteel *et al.* (2004). O efeito de porfirinas sintéticas sobre o HAV e o bacteriófago MS2 em plasma humano foi observado: ocorreu 99,9% de inativação em ambos, HAV e MS2, mostrando que o método pode ser uma abordagem efetiva e segura de remoção de vírus não envelopados em meios aquosos (CASTEEL *et al.*, 2004).

Marcantonio, Perussi e Perussi (2011) publicaram um estudo relatando que a inativação fotodinâmica tem mostrado diminuição estatisticamente significativa de bactérias periodontopatogênicas e melhoras nos parâmetros clínicos da inflamação em paciente com periodontite crônica e agressiva (SCHAWARTZ- FILHO *et al.*, 2009). No entanto, no estudo clínico de Theodoro *et al.* (2011), com acompanhamento de seis meses pós aplicação única da técnica, foi possível observar redução de algumas cepas periodontopatogênicas, mas não foram observadas mudanças significativas nos parâmetros clínicos.

7. CONCLUSÃO

Existe uma variedade de aplicações da inativação fotodinâmica de microorganismos, em especial no caso de infecções. Devido ao alarmante crescimento da resistência a antibióticos, a necessidade de métodos alternativos de tratamento torna-se necessária. Pesquisas mostram que esta técnica pode ser promissora para o tratamento de infecções locais, no entanto mais estudos e testes clínicos são requeridos para que se possa adaptar esta técnica na prática médica.

Em vários relatos, os resultados indicam que a inativação fotodinâmica utilizando derivados porfirínicos representa uma alternativa promissora e viável para o tratamento de infecções locais, desinfecção de sangue e outros meios aquosos. Em todas as vastas áreas que se pode aplicar a inativação fotodinâmica de microorganismos é necessário dar continuidade aos estudos a fim de que seus benefícios sejam plenamente usufruídos.

8. REFERÊNCIAS

ASANAKA, M.; KURIMURA, T.; TOYA, H.; OGAKI, J.; KATO, Y. Anti-HIV activity of protoporphyrin. **AIDS**, 3, pp. 403-404, 1989.

BURDA, W. N.; FIELDS, K. B.; GILL, J.B.; BURT, R.; SHEPHERD, M.; ZHANG, P.; SHAW, L. N. Neutral metallated and meso-substituted porphyrins as antimicrobial agents against gram-positive pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**, 31, pp.327-335, 2012.

CAIUT, J. M. A.; MANGRICH, A. S.; NAKAGAKI, S. **Utilização de espectroscopia eletrônica e RPE na tentativa de caracterizar a interação de macrocíclicos com melaninas sintéticas**. Departamento de Química - UFPR, Universidade Federal do Paraná. Disponível em: <http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0810/index.html> Acessado em: 21/abril/2012.

CALIM, M. A.; PARASCA, S.V. Light sources for photodynamic inactivation of bacteria. **Lasers in Medical Science**, 24, pp.453-460, 2009.

CAMINOS, D. A.; DURANTINI, E. N.; Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* immobilized on agar surfaces by a tricationic porphyrin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, pp. 4253-4259, 2006.

CARRÉ, V.; GAUD, O.; SYLVAIN, I.; BOURDON, O.; SPIRO, M.; BLAIS, J.; GRANET,

R.; KRAUSZ, P. GUILLOTON, M. Fungicidal properties of *meso*-arylglycosypporphyrins: influence of sugar substituents on photoinduced damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 48, pp. 57-62, 1999.

CARVALHO, C. M. B.; GOMES, A. T. P. C.; FERNANDES, S. C. D.; PRATA, A. C. B.; ALMEIDA, M. A.; CUNHA, M. A.; TOMÉ, J. P. C.; FAUSTINO, M. A. F., NEVES, M. G. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; LIN, Z.; RAINHO, J. P.; ROCHA, J. Photoinactivation of bacteria β -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 88, pp. 112-118, 2007.

CASTEEL, M. J.; JAYARAJ, K.; GOLD, A.; BALL, L. M.; SOBSEY, M. D. Photoinactivation of hepatitis A Virus by synthetic porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, 80, pp.294-300, 2004.

CORMICK, M. P.; ALVAREZ, M. G.; ROVERA, M.; DURANTINI, E. N. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 44, pp. 1592-1599, 2009.

COSTA, L.; ALVES, E.; CARVALHO, C. M. B.; TOMÉ, J. P. C.; FAUSTINO, M. A. F., NEVES, M. G. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, A.; ALMEIDA, A. Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect. **Journal of Photochemistry and Photobiology Science**, 7, pp. 415-422, 2008.

COSTA, L.; TOMÉ, J. P. C.; NEVES, M. G.P. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; FAUSTINO, M. A. F.; CUNHA, A.; GOMES. N. C. M.; ALMEIDA, A. Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of a PDT. **Antiviral Research**, 91, pp.278-282, 2011.

DAIROU, J.; VEVER-BIZET, C.; BRAULT, D., Interaction of sulfonated anionic porphyrins with HIV glycoprotein gp120: photodamages revealed by inhibition of antibody binding to V3 and C5 domains. **Antiviral Research**, 61, pp.37-47, 2004.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, 163, pp. 1-12, 2008.

ERGAIEG, K.; CHEVANNE, M.; CILLARD, J.; SEUX, R. Involvement of both Type I and Type II mechanisms in gram-positive and gram-negative bacteria photosensitization by

a *meso*-substituted cationic porphyrin. **Solar Energy**, 82, pp. 1107-1117, 2008.

ERGAIEG, K.; SEUX, R. A comparative study of photoinactivation of bacteria by *meso*-substituted cationic porphyrin, rose Bengal and a methylene blue. **Desalination**, 246, pp. 353-362, 2009.

GOMES, M. C.; BARREIRA, S. M. W.; FAUSTINO, M. A. F.; NEVES, M. G. P. M. S.; TOMÉ, A. C.; GOMES, N. C. M.; ALMEIDA, A.; CAVALEIRO, J. A. S.; CUNHA, A.; TOME, J. P. C. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. **Journal of Photochemistry and Photobiology Science**, 10, pp. 1735-1743, 2011.

HAMBLIN, M. R.; O'DONNELL, D. A.; MURTHY, N.; RAJAGOPALAN, K.; MICHAUD, N.; SHERWOOD, M. E.; HASAN, T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 49, pp. 941-951, 2002.

HONGCHARU, W.; TAYLOR, C. R.; CHANG, Y.; AGHASSI, D.; SUTHAMJARIYA, K.; ANDERSON R. R. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, 115, pp.183-192. 2000.

IZQUIERDO, R. A.; BARROS, C. M.; SANTANA, M. M. G.; FERRER, A. J. C.; SILVA, E. M. P.; GIUNTINI, F.; FAUSTINO, M. A. F.; TOME, J. P. C.; TOME, A. C.; SILVA, A. M. S.; NEVES, G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S.; PEIXOTO, A. F.; PEREIRA, M. M.; PAIS, A. A. C. C. Characterization of isomeric cationic porphyrins with β -pyrrolic substituents by electrospray mass spectrometry: the singular behavior of a potential virus photoinactivator. **American Society for Mass Spectrometry**, 18, pp.218-225, 2007.

JORI, G.; BROWN, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Journal of Photochemistry and Photobiology Science**, 3, pp. 403-405, 2004.

LAMBRECHTS, S.A. G.; AALDERS, M. C. G.; MARLE, V. J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by cationic porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49 (5), pp. 2026-2034, 2005.

LUKSIENE, Z.; PECIULYTE, D.; LUGAUSKAS, A. Inactivation of fungi *in vitro* by photosensitization: preliminary results. **Annals Agricultural Environmental Medicine**, 11, pp. 215-220, 2004.

MARCANTONIO, R. A. C.; PERRUSSI, J. R.; PERUSSI, L. R. Terapia fotodinâmica como tratamento auxiliar na periodontite. **Revista Periodontia**, 2011. Disponível em: <http://www.revistasobrape.com.br/arquivos/dez_2011/artigo2.pdf>. Acessado em: 26/abril/2012.

MERCHAT, M.; BERTOLINI, G.; GIACOMINI, P.; VILLANUEVA, A.; JORI, G. Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 32, pp. 153-157, 1996.

MILGROM, L. R. **The colours of life**. Oxford: Oxford University Press, 1997.

NEURATH, A.R.; STRICK, N.; HABERFIEL, P.; JIANG, S. Rapid prescreening for antiviral agents against HIV-1 based on their inhibitory activity in site-directed immunoassays. II. Porphyrins reacting with the V3 loop of gp120. **Antiviral Chemical Chemotherapy**, 3, pp.55-63, 1992.

NEURATH, A.R.; STRICK, N.; DEBNATH, A.K. Structural requirements for and consequences of an antiviral porphyrin binding to the V3 loop of the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein gp120. **Journal Molecular Recognition**, 8, pp. 345-357, 1995.

NORTH, J.; COOMBS, R.; LEVY, J. Photodynamic inactivation of free and cell associated HIV-1 using the PS, benzo porphyrin derivative. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 7, pp. 891-898, 1994.

PERLIN, M.; MAO, J. C. H.; OTIS, E. R.; SHIPKOWITZ, N. L.; DUFF, R. G. Photodynamic inactivation of influenza and herpes viruses by hematoporphyrin. **Antiviral Research**, 7, pp.43-51, 1987.

PERUSSI, J. R. Photodynamic inactivation of microorganisms. **Química Nova**, (30), 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000400039. Acessado em: 18/abril/2012.

RAPP, F.; KEMENY, B.A. Oncogenic potential of herpes simplex virus in mammalian cells following photodynamic inactivation. **Journal Photochemical Photobiology**, 25, pp. 335-337, 1977.

SCHAWARTZ-FILHO, H. O.; OLIVEIRA, R. R.; NOVAES, A. B.; SOUZA, R. F.; TABA,

M.; SCOMBATTI DE SOUZA, S. L.; RIBEIRO, F. J. Antimicrobial photodynamic therapy in the non-surgical treatment of aggressive periodontitis: cytokine profile in gingival crevicular fluid, preliminary results. **Journal of Periodontology**, 80, pp. 98-105, 2009.

SHIKOWITZ, M. J.; ABRAMSON, A. L.; FREEMAN, K.; STEINBERG, B. M.; NOURLI, M.; **Laryngoscope**, 108, pp. 962, 1998.

THEODORO, L. H.; SILVA, S. P.; PIRES, J. R.; SOARES, G. H.; PONTES, A. E.; ZUZA, E. P.; SPOLIDORIO, D. M.; TOLEDO, B. E.; GARCIA, V. G. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. **Lasers in Medical Science**, 2011.

TOMÉ, J. P. C.; NEVES, M. G.P. M. S.; TOMÉ, A. C.; CAVALEIRO, J. A. S.; MENDONÇA, A. F; PEGADO, I. N.; DUARTE, R.; VALDEIRA, M. L. Synthesis of glycoporphyrin derivatives and their antiviral activity against herpes simplex virus types 1 and 2. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 13, pp. 3878-3888, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo, Atheneu, 2008.
OMS, **Vencendo a resistência microbiana World Health Report on Infectious Diseases**, 2000. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/vencendoresistencia.htm> acessado em 02/fev/2012.

VZOROV, A. N.; DIXON, D. W.; TROMMEL, J. S.; MARZILLI, L. G.; COMPANS, R. W. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by porphyrins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46, pp. 3917-3925, 2002.