

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL DO COMPLEXO
 $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})]^{2+}$ ”**

Marco Antonio Tiburcio*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA.

Orientadora: Rose Maria Carlos

*Bolsista CAPES

São Carlos, São Paulo

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Marco Antonio Tiburcio, realizada em 19/02/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Clelia Mara de Paula Marques (UFSCar)

Profa. Dra. Cristina Kurachi (IFSC/USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Dedicatória

Defendam a ciência!

Pras mina, pras mana e pras mona!

Agradecimentos

Agradeço meus pais e avó por me apoiarem incondicionalmente. Vocês são minha força, amo vocês!

Agradeço aos professores que participaram da minha formação, o conhecimento é uma construção coletiva. Obrigado!

Em especial à Professora Dr^a Rose Maria Carlos, pelo acolhimento, por me ensinar tanto e pela confiança, especialmente nessa trajetória final. Aprendi muito com você, obrigado!!

Aos amigos de laboratório, Rafa, Isa, Bia, Lorena, Mari, Marlon e José pelas trocas de conhecimento, pelas discussões científicas e por bons momentos de risada. Sinto saudades do bolo com café!!! Às IC's, Kárita, Maria e Maju, sucesso meninas!!!

Isa, obrigado por ter me guiado pelos caminhos do perileno rs e Rafa, obrigado por sempre ser um ombro amigo.

À Dr^a Hilde Harb Buzzá e as meninas da veterinária Amanda, Carol e Natália pela parceria nos testes de terapia fotodinâmica em fungos. Hilde, obrigado por tantos ensinamentos, discussões e pelos diversos conselhos.

Aos amigos que estiveram e aos que não estiveram comigo nessa jornada. Jacks e Lucas, obrigado manas! Carol, Manaus, obrigado!

Ao Professor Dr. Benedito dos Santos de Lima Neto por ter cedido espaço no seu laboratório e ao Carlão pelos auxílios com as sínteses.

Ao Professor Dr. Otaciro Rangel pelos experimentos de EPR.

À Dr^a Angélica Ellen Graminha pelos experimentos em células humanas.

Aos funcionários do DQ e todos que indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse concretizado.

À mim.

E à CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento – 001.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

S_0 - Estado Fundamental

S_1 - Estado Excitado Singleto

T_1 - Estado Excitado Tripleto

$h\nu$ - fóton

CIS - Cruzamento Intersistemas

Δ - Calor

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

3O_2 - Oxigênio Tripleto

1O_2 - Oxigênio Singleto

FS - Fotossensibilizador

3FS - Estado Excitado Tripleto do Fotossensibilizador

TFD - Terapia Fotodinâmica

PDI - Inativação Fotodinâmica (do inglês, Photodynamic Inactivation)

aPDT - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês, antimicrobial Photodynamic Therapy)

5-ALA - Ácido 5-aminolevulínico

ϕ_{Δ} - Rendimento Quântico

MLCT - Transição de carga do metal para o ligante (do inglês, metal-ligand charge transfer)

ILCT - Transições de carga internas do ligantes (do inglês, intra-ligand charge transfer)

phen - Fenantrolina

pPDIp - Ligante perileno modificado com duas fenantrolinas

3pPDIp - Estado excitado Tripleto do ligante pPDIp

RupPDIp - Complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pPDIp)](PF₆)₂

λ_{EX} - Comprimento de onda de excitação

ϵ - Absortividade molar

PBS - tampão fosfato (do inglês, phosphate buffer solution)

DO - Densidade óptica

UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônias por mL

RPM - Rotações por minuto

DMSO - dimetilsulfóxido

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo

k_{obs} - Constante de velocidade observada

BA - Álcool benzílico (do inglês benzyl alcohol)

A375 - Células de melanoma humano

NGM - Células de melanócito humano

IC₅₀ - Concentração inibitória máxima

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama do tipo Jablonski descrevendo os processos de desativação radiativos e não radiativos que podem ocorrer após a absorção de luz por uma molécula.	2
Figura 2. Diagrama de absorção da luz por biomoléculas ilustrando a janela fototerapêutica.	5
Figura 3. Figura ilustrativa descrevendo o processo de absorção e penetração da luz no tecido biológico.....	6
Figura 4. Estrutura química ilustrativa para o complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂	8
Figura 5. Dispositivo de iluminação com 24 LEDs emitindo em 450 nm e irradiância de 40 mW/cm ²	19
Figura 6. Dispositivo de iluminação com 24 LEDs emitindo em 525 nm e irradiância de 7 mW/cm ²	19
Figura 7. Dispositivo de iluminação de LEDs com comprimento de onda em 415 nm.....	21
Figura 8. Reação de redução metabólica do sal MTT para formação de formazan.....	22
Figura 9. Espectro de absorção eletrônica do complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂ em DMSO sob atmosfera inerte (N ₂) e concentração de 20 μM.....	23
Figura 10. Espectros de absorção eletrônica do complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂ em DMSO (preto), Acetonitrila (vermelho) e PBS (azul) sob atmosfera inerte (N ₂).	24
Figura 11. Espectros de emissão do complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂ em DMSO (preto) sob atmosfera inerte (N ₂). λ _{EX} : 400 nm (preto) e λ _{EX} : 500 nm (vermelho).....	25
Figura 12. Espectros de emissão do complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂ em DMSO (preto) e PBS (azul) sob atmosfera inerte (N ₂). λ _{EX} : 500 nm.....	25
Figura 13. Soluções em atmosfera inerte (N ₂) do complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂ em DMSO antes da fotólise (laranja) e após a fotólise (verde).....	26
Figura 14. Fotólise exaustiva do complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂ em DMSO acompanhada por UV-vis com irradiação em (A) 420 nm e (B) 518 nm sob atmosfera inerte.	27
Figura 15. Fotólise exaustiva do complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂ em DMSO acompanhada por emissão com irradiação em 518 nm.	27
Figura 16. Fotólise exaustiva do complexo cis-[Ru(phen) ₂ (pPDIp)](PF ₆) ₂ em (A) Acetonitrila e (B) PBS acompanhada por UV-vis com irradiação em 518 nm.	28

- Figura 17. Fotólise exaustiva do complexo cis-[Ru(phen)₂(pPDlp)](PF₆)₂ em DMSO com variação na fração de Acetonitrila acompanhada por UV-vis e irradiação em 518 nm. 29
- Figura 18. (A) Espectro de emissão do complexo cis-[Ru(phen)₂(pPDlp)](PF₆)₂ em DMSO variando a fração de Acetonitrila. (B) Gráfico de Stern-Volmer para supressão de fluorescência..... 31
- Figura 19. Soluções em atmosfera inerte (N₂) do complexo cis-[Ru(phen)₂(pPDlp)](PF₆)₂ em DMSO antes da fotólise (laranja), após a primeira redução (verde) e após segunda redução (violeta)..... 32
- Figura 20. Espectro de absorção do complexo cis-[Ru(phen)₂(pPDlp)](PF₆)₂ na presença de álcool benzílico (BA) sob irradiação em 450 nm..... 33
- Figura 21. Voltametria cíclica do complexo cis-[Ru(phen)₂(pPDlp)](PF₆)₂ em DMSO..... 34
- Figura 22. Curva de crescimento da forma micelial (pH 4,5 à 25° C) do fungo *Sporothrix brasiliensis*. 36
- Figura 23. Curva de crescimento da forma leveduriforme (pH 7,8 à 37° C) do fungo *Sporothrix brasiliensis*. 36
- Figura 24. Imagens de microscopia confocal do fungo *Sporothrix brasiliensis* na sua forma micelial na presença de RupPDlp com tempos de incubação de (A) 0 minutos, (B) 10 minutos, (C) 20 minutos e (D) 60 minutos. 37
- Figura 25. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em *Sporothrix brasiliensis*, na forma micelial (vermelho) e leveduriforme (azul) com dose de 36 J/cm² em 450 nm. *Reduções significativas no crescimento (valor-p < 0.05)..... 40
- Figura 26. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em *Sporothrix brasiliensis*, na forma micelial (azul) e leveduriforme (roxo) com dose de 25.2 J/cm² em 525 nm. *Reduções significativas no crescimento (valor-p < 0.05)..... 41
- Figura 27. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em *Candida albicans*, com irradiação em 450 nm (azul) e dose de 36 J/cm² e irradiação em 525 nm (verde) e dose de 25.2 J/cm². *Reduções significativas no crescimento (valor-p < 0.05)..... 42
- Figura 28. Citotoxicidade do complexo em células de melanoma (A375) e melanócito (NGM) humanos, na ausência de irradiação..... 44
- Figura 29. Fotocitotoxicidade do complexo em células de melanoma (A375) e melanócito (NGM) humanos, com dose de 2.12 J/cm² em 415 nm. 45
- Figura 30. Fotocitotoxicidade do complexo em células de melanoma (A375) e melanócito (NGM) humanos, com dose de 1.76 J/cm² em 415 nm 45

Lista de Esquemas

Esquema 1. Ilustração dos processo de transferência de elétrons fotoinduzido do tipo I.	3
Esquema 2. Ilustração de um processo de transferência de energia fotoinduzido do tipo II.	4
Esquema 3. Valores de potencial para o complexo em DMSO.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores da constante de velocidade observada (k_{obs}) para a reação de fotólise do complexo variando a fração de DMSO. 30

Tabela 2. Potenciais de redução para as componentes do complexo em DMSO... 34

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Processos Fotoquímicos e Fotofísicos	1
1.1.2. Formação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	3
1.2. Terapia Fotodinâmica (TFD)	4
1.2.1. Fotossensibilizadores	5
1.2.2. Complexos de Ru(II)	7
1.2.3. Complexo Ru(II)-perileno – RupPDIp	8
1.3. Aplicações da Terapia Fotodinâmica	9
1.3.1. Esporotricose e Candidoses	9
1.3.2. Câncer melanoma	11
2. Objetivos	12
2.1. Geral:	12
2.2. Objetivos Específicos:	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Reagentes	13
3.2. Sínteses	13
3.3. Equipamentos e Metodologias	14
3.3.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis	14
3.3.2. Espectroscopia de fluorescência no estado estacionário	14
3.3.3. Ensaio Biológico - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	15
3.3.3.1. Meio de Cultura e Microrganismos	15
3.3.3.2. Suspensão dos Microrganismos	15
3.3.3.3. Crescimento <i>Sporothrix brasiliensis</i>	16
3.3.3.4. Determinação do Intervalo Droga-Luz (Tempo de Incubação)	17
3.3.3.5. Testes de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	17
3.3.4. Ensaios de Terapia Fotodinâmica em células de melanoma e melanócito humano	20
3.3.4.1 Cultivo das células	20
3.3.4.2. Ensaios de terapia fotodinâmica	21
4. Resultados e Discussão	23
4.1. Absorção eletrônica no UV-Vis e Emissão no Estado Estacionário	23
4.1.1 Fotólise do complexo acompanhado por UV-vis e Emissão no Estado Estacionário	26

4.1.2. Gradiente de Solvente.....	28
4.1.3 - Supressão bimolecular de Stern-Volmer.....	30
4.1.4. Aplicação em catálise fotoredox.....	32
4.1.5. Voltametria Cíclica em DMSO.....	33
4.1.6. Potencial do Estado Excitado.....	34
4.2. Testes de Inativação Fotodinâmica em Fungos.....	35
4.2.1 Curva de Crescimento - <i>Sporothrix brasiliensis</i>	35
4.2.2. Determinação do intervalo Droga-Luz.....	36
4.2.3. Inativação Fotodinâmica <i>in vitro</i> - <i>Sporothrix brasiliensis</i>	38
4.2.4. Inativação Fotodinâmica <i>in vitro</i> - <i>Candida albicans</i>	42
4.3. Avaliação da citotoxicidade e fotocitotoxicidade em células de melanoma e melanócito humano.....	44
5. Considerações Finais.....	46
6. Referências.....	47

RESUMO

**“AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA E ANTITUMORAL DO COMPLEXO *cis*-
[Ru(phen)₂(pPDIp)]²⁺”**

A terapia fotodinâmica (TFD) ativa um fotossensibilizador por luz visível ou infravermelho para gerar espécies de oxigênio citotóxicas que levam à morte celular. A TFD é geralmente usada em aplicações em lesões superficiais e pode ser usada tanto no tratamento de câncer de pele quanto em infecções causadas por microrganismos. O câncer de pele pode ser distinguido em melanoma e não-melanoma, ambos acometem diversas camadas da derme, sendo câncer melanoma mais agressivo pois pode sofrer metástase e acometer outros órgãos. Das infecções causadas por fungos a esporotricose e as candidoses são consideradas problema de saúde pública no Brasil. A esporotricose é causada por fungos do clado patogênico *Sporothrix* e é caracterizada pela formação de feridas na pele, que também é uma característica das infecções causadas por espécies de *Candida*. Este estudo investiga a eficiência fotossensibilizante do complexo Ru(phen)₂(pPDIp)(PF₆)₂, RupPDIp, contra *Sporothrix brasiliensis* e *Candida albicans*. E também contra células de melanoma (A375) e melanócitos (NGM) humanos. Para avaliar a ação fotodinâmica antimicrobiana, o complexo RupPDIp foi testado com irradiação em 450 nm (luz azul - 36 J/cm²) e 525 nm (luz verde - 25,2 J/cm²) na faixa de concentração de 0,05-20 µM. Grupos de controle foram realizados na ausência/presença de RupPDIp e irradiação e comparados por contagem de células. Para os testes em células de melanócito e melanoma humanos foi utilizado uma fonte de luz em 415 nm (luz azul), entregando doses de 1.76 J/cm² e 2.12 J/cm². A viabilidade das células após a TFD foi revelada pelo método de MTT e comparada com grupos de controle contendo o fotossensibilizador na ausência de irradiação. Sob luz azul (450 nm) o complexo conseguiu inibir totalmente o crescimento da *S. brasiliensis* com concentrações <5.0 µM. Quando irradiado na luz verde (525 nm) mostrou melhores resultados, inibindo

completamente o crescimento da *S. brasiliensis* com concentrações $<0.5 \mu\text{M}$. Para *C. albicans* a concentração necessária para inibição total do fungo foi de $0.5 \mu\text{M}$ em 450 nm e $0.05 \mu\text{M}$ em 525 nm. Mostrou também ser um bom fotossensibilizador frente à células de melanoma, apresentando $\text{IC}_{50} = 1.3 \mu\text{M}$ e para células de melanócitos apresenta $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$ quando entregue uma dose de 2.12 J/cm^2 . O complexo RupPDIp possui boa ação fotodinâmica à células de melanoma, sem mostrar danos excessivos à células de melanócitos saudáveis. Também é um fotossensibilizador promissor frente à microrganismos, eliminando completamente colônias de *S. brasiliensis* e *C. albicans* em diferentes comprimentos de onda.

ABSTRACT

“IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL AND ANTITUMORAL PHOTODYNAMIC ACTION OF THE cis-[Ru(phen)₂(pPDIp)]²⁺”

Photodynamic therapy (PDT) activates a photosensitizer by visible or infrared light to generate cytotoxic oxygen species that lead to cell death. PDT is generally used in applications in superficial lesions and can be used both in the treatment of skin cancer and in infections caused by microorganisms. Skin cancer can be distinguished into melanoma and non-melanoma, both of which affect several layers of the dermis, and melanoma cancer is more aggressive because it can metastasize and affect other organs. From infections caused by fungi, sporotrichosis and candidosis are considered a public health problem in Brazil. Sporotrichosis is caused by fungi of the pathogenic *Sporothrix* clade and is characterized by the formation of wounds on the skin, which is also a characteristic of infections caused by *Candida* species. This study investigates the photosensitizing efficiency of the Ru(phen)₂(pPDIp)(PF₆)₂ complex, RupPDIp, against *Sporothrix brasiliensis* and *Candida albicans*. And also, against human melanoma cells (A375) and melanocytes (NGM). To assess the antimicrobial photodynamic action, the RupPDIp complex was tested with irradiation at 450 nm (blue light - 36 J/cm²) and 525 nm (green light - 25.2 J/cm²) in the concentration range of 0.05-20 μM. Control groups were performed in the absence/presence of RupPDIp and irradiation and compared by cell count. For tests on human melanocyte and melanoma cells, a light source at 415 nm (blue light) was used, delivering doses of 1.76 J/cm² and 2.12 J/cm². The viability of cells after PDT was revealed by the MTT method and compared with control groups containing the photosensitizer in the absence of irradiation. Under blue light irradiation (450 nm), the complex was able to completely inhibit the growth of *S. brasiliensis* with concentrations <5.0 μM. When irradiated in green light (525 nm) showed better results, completely inhibiting the growth of *S. brasiliensis* with concentrations <0.5 μM. For *C. albicans*, the concentration required for total fungal inhibition was 0.5 μM at 450 nm and 0.05 μM at 525 nm. It also proved to be a good photosensitizer against melanoma cells,

presenting $IC_{50} = 1.3 \mu\text{M}$ and for melanocyte cells it presents $IC_{50} = 10 \mu\text{M}$ when a dose of 2.12 J/cm^2 was delivered. The RupPDIp complex has a good photodynamic action on melanoma cells, without showing excessive damage to healthy melanocyte cells. It is also a promising photosensitizer against microorganisms, completely eliminating colonies of *S. brasiliensis* and *C. albicans* at different wavelengths.

1. Introdução

1.1. Processos Fotoquímicos e Fotofísicos

A absorção de luz por uma molécula no seu estado fundamental (S_0) promove o movimento de um elétron do estado S_0 para um nível de maior energia (estado excitado, S_1).^{1,2}, equação 1.



A absorção de luz é um processo que ocorre em 10^{-15} s, intervalo de tempo menor que o tempo necessário para o movimento do núcleo ($\sim 10^{-12}$ s). Por isso, em geral a absorção da luz é um processo vertical, sem mudança no spin do elétron promovido e por isso o estado excitado é um isômero no estado fundamental no momento da absorção da luz.²

O retorno do elétron do estado excitado para o estado fundamental pode ocorrer por processo radiativo ou não-radiativo.²

A desativação radiativa consiste na liberação da energia absorvida por um processo de emissão de um fóton ($h\nu'$), tal processo é conhecido como fluorescência quando a multiplicidade de spin singleto é mantida tanto no estado fundamental como no estado excitado e este processo ocorre na faixa de 10^{-6} - 10^{-9} s.², equação 2.^{1,2}



A forma não-radiativa pode ocorrer de duas formas: a molécula perde energia por processos vibracionais, conhecidos como conversão interna (CI), decaindo do estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 ,^{1,2} equação 3.^{1,2}



Outro processo que pode ocorrer no estado excitado singleto (S_1) é conversão do spin singleto para tripleto por um decaimento não radiativo que ocorre por um processo de interconversão entre sistemas (CIS). Neste processo a mudança no momento angular de spin, dá origem a um estado de menor energia e de multiplicidade tripleto (T_1).^{1,2}, equação 4.^{1,2}



A inversão do spin é um processo relativamente lento e por isso o estado excitado tripleto tem tempo de vida maior quando comparado ao estado excitado singleto (S_1) e ocorre na faixa de 10^{-4} - 10^1 s. O estado excitado T_1 tem energia menor do que seu correspondente singleto devido à perdas energéticas do sistema. Dessa forma, no processo radiativo de fosforescência o fóton emitido ($h\nu''$) é menos energético que o fóton absorvido ($h\nu$) e por isso ocorre em maiores comprimentos de onda (menos energéticos).^{1,2}, equação 5.^{1,2}



O estado excitado tripleto também pode ser desativado de forma não-radiativa dissipando o excesso de energia e retornando ao estado fundamental S_0 .^{1,2}, equação 6.^{1,2}



Os processos acima descritos podem ser ilustrados de maneira qualitativa em um diagrama de Jablonski (Fig. 1)

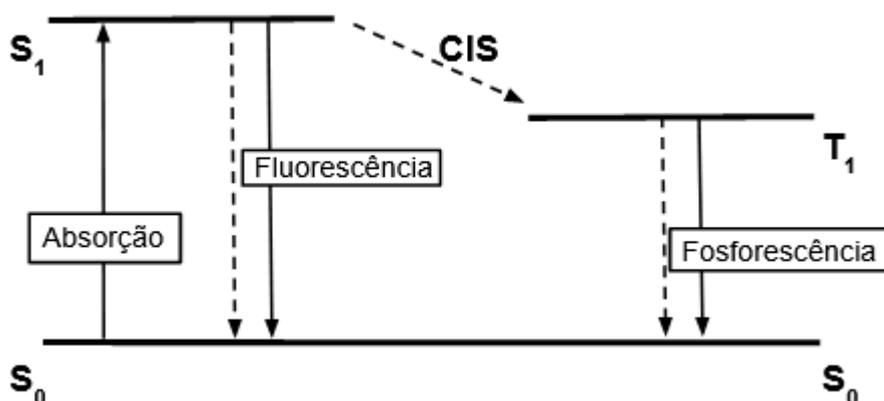


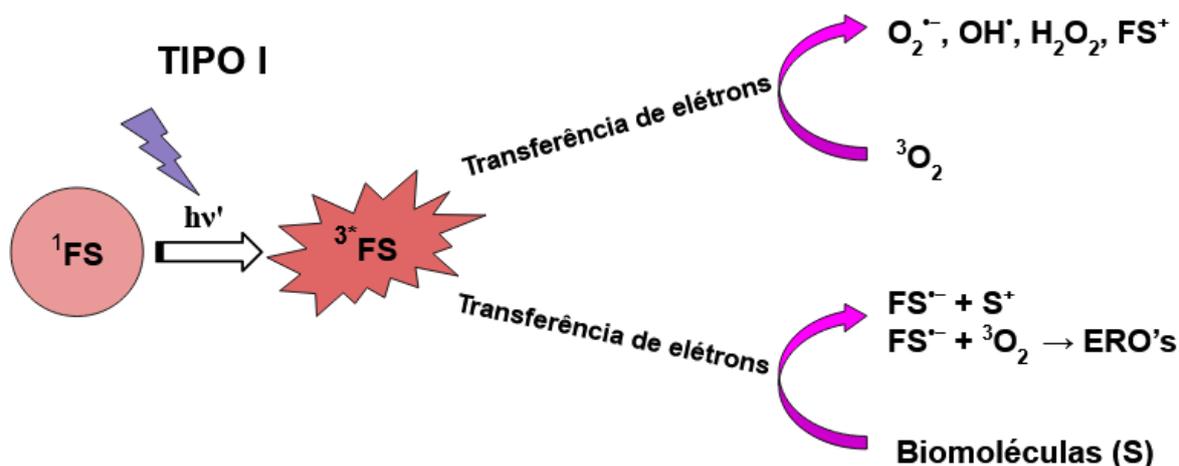
Figura 1. Diagrama do tipo Jablonski descrevendo os processos de desativação radiativos e não radiativos que podem ocorrer após a absorção de luz por uma molécula.

Os processos fotofísicos desencadeados pela absorção de um fóton podem ser úteis em diversas áreas de aplicação, afinal utiliza uma fonte de energia luminosa para promover reações que antes não aconteceriam.³ Por exemplo, o oxigênio

molecular ($^3\text{O}_2$) tem multiplicidade tripleto, possibilitando uma interação com o estado tripleto da molécula excitada e a consequente formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).⁴

1.1.2. Formação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As EROs são espécies citotóxicas formadas à partir de interações do estado excitado e que podem causar a oxidação dos tecidos, resultando na morte celular.⁵ Os processos do Tipo I, ilustrado no Esquema I, envolvem transferência de elétrons e podem ocorrer de duas formas: uma oxidação direta do fotossensibilizador (FS) pelo oxigênio molecular gerando radicais livres ou podem ocorrer pela transferência de elétrons em duas etapas, primeiro o fotossensibilizador oxida um substrato que contém oxigênio (S). Na segunda etapa o fotossensibilizador transfere o elétron adquirido para o oxigênio molecular formando radicais livres e derivados.^{4,6}



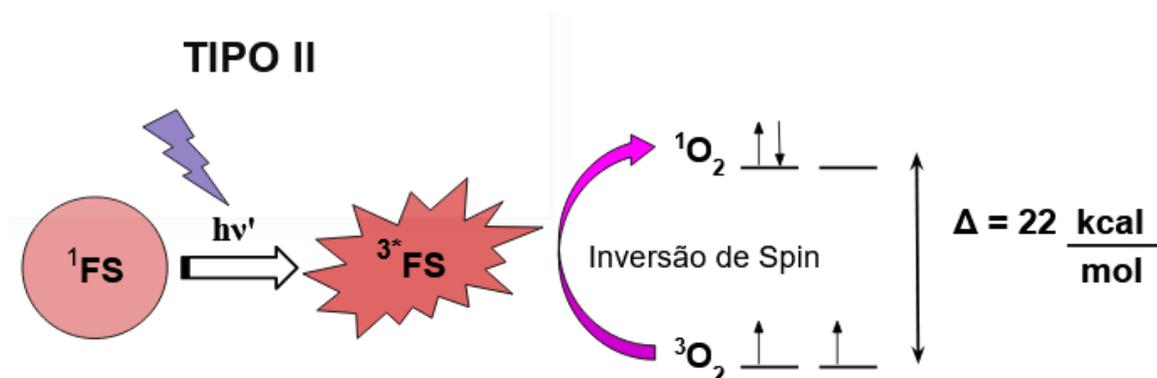
Esquema 1. Ilustração dos processo de transferência de elétrons fotoinduzido do tipo I.

No estado fundamental o oxigênio molecular existe com dois elétrons desemparelhados e de mesma multiplicidade de spin, caracterizando um estado tripleto ($^3\text{O}_2$). De acordo com a regra de conservação de spin a redução direta dessa espécie é proibida por spin.⁷

O processo do Tipo II, ilustrado no Esquema II, fornece um acréscimo de energia capaz de gerar uma espécie muito mais oxidante de oxigênio e remover a restrição da conservação de spin. Afinal, a transferência de energia promove a

inversão no momento de spin do elétron do oxigênio molecular, gerando agora um estado eletrônico com dois elétrons de spins opostos, e, portanto, de multiplicidade singlete ($^1\text{O}_2$) como representado no Esquema II.^{4,6,7}

A formação de $^1\text{O}_2$ será favorecida em relação aos processos do Tipo I se a energia do ^3FS for suficiente para promover essa inversão de spin e isso vai depender da natureza do fotossensibilizador.^{6,7}



Esquema 2. Ilustração de um processo de transferência de energia fotoinduzido do tipo II.

A formação dessas espécies *in situ* pode ser concentrada em tecidos afetados promovendo estresse oxidativo na membrana e/ou nos componentes celulares. O dano causado por essas espécies citotóxicas leva à morte celular, seja de forma programada ou não. A técnica conhecida como terapia fotodinâmica vem sendo muito estudada e tem se mostrado promissora no tratamento de diversas enfermidades.⁸

1.2. Terapia Fotodinâmica (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica médica não-invasiva relativamente nova, que ganhou destaque quando começou a ser estudada com afinco em 1960.^{9,10} Essa técnica consiste na combinação de três componentes: uma molécula fotossensibilizadora, uma fonte de luz com comprimento de onda específico e oxigênio molecular. Em resumo, a absorção de um fóton desencadeia transições eletrônicas que levam à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como já dito anteriormente, por processos de transferência de elétrons ou transferência de energia.^{9,10}

Quando aplicada no combate à microrganismos é descrita como Inativação Fotodinâmica (PDI - do inglês, Photodynamic Inactivation) ou Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT, do inglês antimicrobial Photodynamic Therapy).¹¹

1.2.1. Fotossensibilizadores

Moléculas fotossensibilizadoras devem possuir propriedades fotoquímicas e fotofísicas específicas para atuação em terapia fotodinâmica. Devem possuir alta absorção na região do espectro visível e se possível em comprimentos de onda menos energéticos.¹²

Em geral fotossensibilizadores que absorvem luz na região do infravermelho são os mais pesquisados por minimizarem efeitos deletérios causados pela absorção de luz pelas biomoléculas em regiões abaixo de 400 nm, principalmente onde ocorre absorção da luz pelo DNA (Figura 2).^{12,13} Dessa forma, é definida a janela terapêutica, uma faixa no espectro visível e infravermelho, que compreende comprimentos de onda maiores e menos energéticos, que evitam a absorção da luz de diversas biomoléculas, evitando esses efeitos indesejados.¹⁴

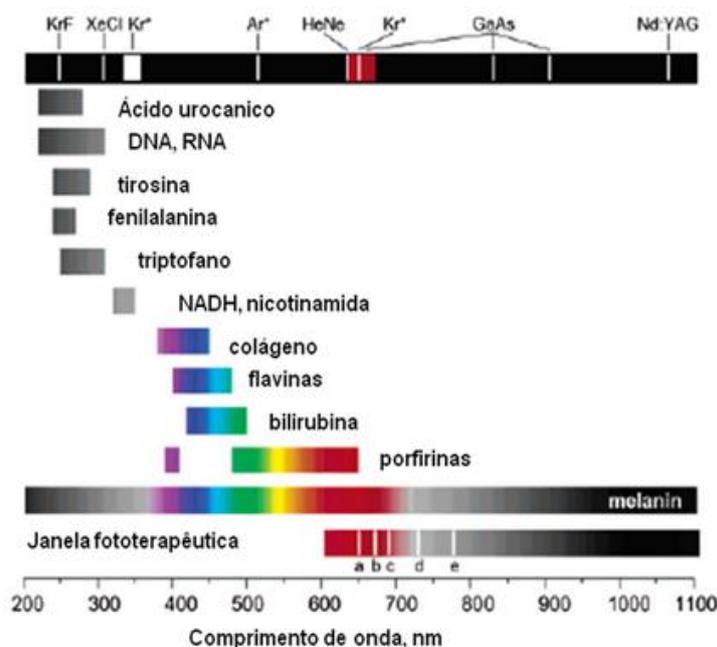


Figura 2. Diagrama de absorção da luz por biomoléculas ilustrando a janela fototerapêutica.¹⁴

Uma consequência do uso de luzes menos energéticas é que a absorção fora da região das biomoléculas aumenta a penetração da luz nos tecidos, permitindo o tratamento de lesões mais profundas e internas, bem como no caso de tumores sólidos e volumosos, como ilustrado na Figura 3.^{12,13}

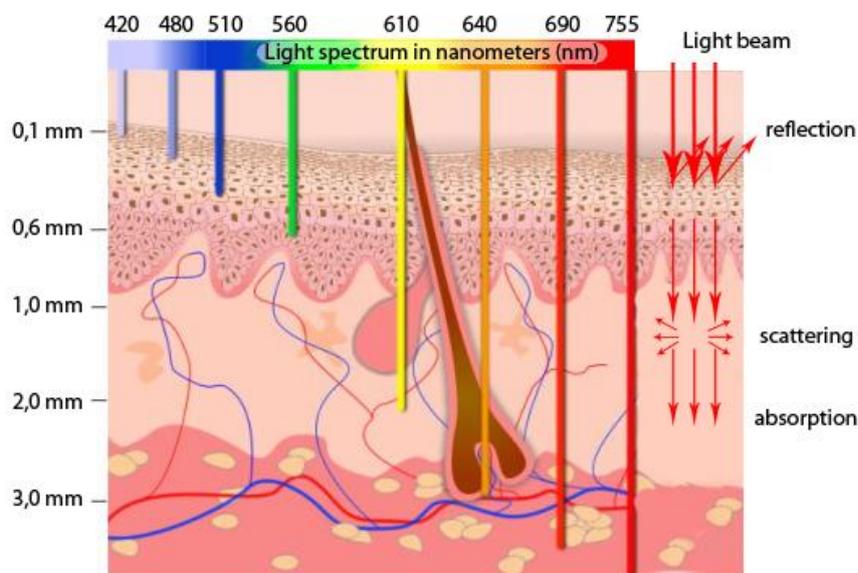


Figura 3. Figura ilustrativa descrevendo o processo de absorção e penetração da luz no tecido biológico.¹⁵

A terapia fotodinâmica usa principalmente as espécies reativas de oxigênio para causar morte celular, por isso, fotossensibilizadores precisam de um bom rendimento quântico de formação de EROs. Além da afinidade que deve existir entre o fotossensibilizador e o oxigênio molecular, o tempo de vida do estado tripleto dessas espécies deve ser longo o suficiente para que se estabeleça as interações no estado excitado.^{12,13}

Além das propriedades fotoquímicas e fotofísicas, essas moléculas precisam de propriedades específicas para atuar como fármaco, por exemplo, não pode apresentar toxicidade para o paciente, devendo apresentar boa estabilidade química, gerando a menor quantidade de subprodutos possível.^{12,13}

Os fotossensibilizadores também precisam ser solúveis em condições biológicas e apresentar especificidade pelo tecido alvo, de modo a limitar a aplicação e evitar efeitos deletérios à tecidos adjacentes.

Diversas moléculas orgânicas estão descritas na literatura como fotossensibilizadores, como por exemplo, a curcumina e o azul de metileno que

apresentam excelentes resultados *in vitro*, *in vivo* bem como em resultados clínicos.^{16,17}

Além disso, outras drogas fotossensibilizadoras já possuem aprovação para uso clínico no tratamento de câncer, mundialmente como é o caso do Photofrin®, o 5-ALA (Levulan®) e as protoporfirinas como o Foscan® nos EUA, o Laserphyrin® no Japão e o Photogem®, aprovado na Rússia.¹⁸

1.2.2. Complexos de Ru(II)

O estudo sobre a aplicação de complexos de Ru(II) em terapia fotodinâmica é recente e quando falamos sobre fotossensibilizadores, podemos fazer um levantamento das propriedades onde os complexos de Ru(II) se destacam.

São compostos que possuem grande absorção na região do visível, com altos valores de extinção molar. Possuem intensa emissão na região do infravermelho próximo, que permite facilmente o mapeamento dessas espécies em meio biológico.^{19,20}

A escolha do centro metálico de Ru(II) para o desenvolvimento de fotossensibilizadores ocorre pelas características deste metal. É um metal do segundo período dos metais de transição, denso e pesado, onde o movimento angular dos spins dos elétrons (M_s), junto ao movimento angular orbital (M_L), levam à uma interação (acoplamento) entre os campos magnéticos gerados conhecida como acoplamento spin-órbita ($J = \sum L, S$), permitindo a conversão entre estados excitados que apresentam diferentes multiplicidades de spin. Essas espécies possuem 100% de eficiência no processo de decaimento não-radiativo de Cruzamento Intersistema, ou seja, a conversão total do estado excitado singleto.²¹

A natureza da transição eletrônica nos complexos polipiridínicos de Ru(II) são geralmente de transferência de carga entre o metal e o ligante (MLCT, do inglês metal ligand charge transfer) e por isso, os processos de desativação do estado excitado tripleto são mais lentos, já que envolvem um processo de inversão de spin. Um tempo de vida longo nos estados excitados possibilitam a difusão no meio e permitem uma maior interação entre a molécula no estado excitado e o oxigênio molecular o que

pode levar a um aumento significativo do rendimento de formação de espécies reativas de oxigênio.^{20,21}

Além de serem estáveis fotoquimicamente, os complexos polipiridínicos de Ru(II) podem ter suas propriedades alteradas pela modificação dos ligantes polipiridínicos,²¹ por exemplo, a junção do ligante polipiridínico 1,10-fenantrolina com uma molécula de perileno diimida e coordenação ao centro metálico de Ru(II) apresenta propriedades espectroscópicas mais interessantes que o complexo sem a derivatização.^{23,24}

1.2.3. Complexo Ru(II)-perileno – RupPDlp

A coordenação de compostos orgânicos aromáticos em complexos de Ru(II) pode melhorar significativamente as propriedades fotoquímicas e fotofísicas dessas espécies. Nesse sentido, preparamos um cromóforo que consiste na combinação entre uma unidade $[Ru(\text{phen})_2]^{2+}$ (phen = 1,10-fenantrolina) e uma unidade composta por uma fenantrolina ligada à um anel perileno (pPDlp), resultando na estrutura ilustrada na Figura 4.

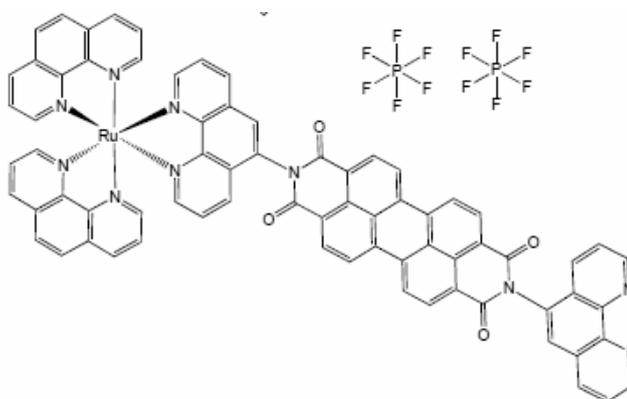


Figura 4. Estrutura química ilustrativa para o complexo $cis-[Ru(\text{phen})_2(\text{pPDlp})](\text{PF}_6)_2$.

O anel perilendiimida é um corante orgânico praticamente insolúvel que possui alta absorção e fluorescência no visível. A coordenação do ligante pPDlp ao centro metálico de Ru(II) melhora significativamente sua solubilidade em água e

solventes orgânicos. Além disso, a díade proposta apresenta propriedades fotoquímicas e fotofísicas desejáveis para aplicação em terapia fotodinâmica, como absorção intensa no visível, com altos valores de absorvidade molar, intensa emissão na região do infravermelho próximo e tempo de vida de emissão longo proveniente do estado tripleto do ligante ($^3\text{pPDIp}$), na ordem de $1.8 \mu\text{s}$.^{23,24}

Sob irradiação são desencadeados processos fotofísicos que decaem para o $^3\text{pPDIp}$, este por sua vez interage com oxigênio molecular ativando oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) com rendimento quântico $\phi_{\Delta}=0,57$ e contra células de melanoma murino apresenta $\text{IC}_{50} = 0.5 \mu\text{molL}^{-1}$ quando irradiado em 420 nm (0.58 J/cm^2) e $\text{IC}_{50} = 1.2 \mu\text{molL}^{-1}$ se irradiado em 518 nm (0.42 J/cm^2).²³

Levando em conta esses resultados, o complexo RupPDIp pode ser um bom candidato a fotossensibilizador em terapia fotodinâmica, nos motivando a investigar sua citotoxicidade e fotocitotoxicidade em testes *in vitro*.

1.3. Aplicações da Terapia Fotodinâmica

A escolha do fotossensibilizador e fonte de luz, que produzam uma quantidade razoável de espécies citotóxicas possibilitam a aplicação prática em várias áreas da ciência. Por exemplo, a terapia fotodinâmica já possui resultados promissores e seguros para tratamento de câncer de pele e o uso para doenças não neoplásicas também vem ganhando destaque, por exemplo no tratamento de infecções por fungos.^{25,26}

1.3.1. Esporotricose e Candidoses

Esporotricose é uma micose cutânea e subcutânea conhecida há mais de 120 anos com relatos em diversos lugares do mundo, principalmente no Brasil, onde os diagnósticos da doença ultrapassam 5000 casos.²⁷

Primeiramente conhecida como “doença do jardineiro” tinha como principal vetor o contato com matéria orgânica e/ou utensílios de jardinagem contaminados, porém, o contato de animais com essas fontes de microrganismos abriu uma nova linha de contaminação e os casos de transmissão zoonótica (animal-humano) tem se

tornado alarmantes. O comportamento desses animais, principalmente de gatos, facilita o avanço dessa doença, pois além da transmissão zoonótica por arranhaduras ou mordidas, existe a transmissão horizontal, onde animais infectam outros animais através de brigas, espalhando a doença por diversos lugares.^{27,28,29}

Assim como diversos fungos, o clado patogênico *Sporothrix* é termodimórfico e sofre alterações na sua morfologia com mudanças na temperatura.³⁰ Considerado um dos principais fatores de virulência dessas espécies, possibilita a infecção pelo contato com matéria orgânica contaminada, pois à temperatura ambiente (25° C) existe na sua forma micelial, ou filamentosa. A forma micelial “se alimenta” de matéria orgânica e quando inoculada nos hospedeiros à 37° C passa para a sua forma parasítica, ou leveduriforme, onde irá se apropriar do metabolismo celular do indivíduo.³⁰

Essa característica é fundamental para disseminação do fungo, principalmente em países tropicais como é o caso da Brasil, líder de casos de esporotricose. No país a doença atinge 26 dos 27 estados e os casos diagnosticados apresentam todas as linhagens patogênicas do complexo *Sporothrix*: *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. iuriei*, que apresentam casos ao redor do mundo. Os diagnósticos também reportam uma linhagem praticamente exclusiva do país, a *S. brasiliensis*, encontrada na Argentina e no Brasil, neste último é apontada como 100% de chance de se tornar um problema de saúde pública.^{27,31}

Outro tipo de infecção fúngica considerada um problema de saúde pública são as candidoses, doenças causadas por espécies de *Candida*. No Brasil, as espécies de *Candida* são as principais responsáveis pelos casos de infecção hospitalar. Em especial a *Candida albicans*, linhagem identificada em praticamente metade dos casos incidentes.^{32,33} Essas espécies também são fungos termodimórficos, a diferença é que elas existem naturalmente na microbiota das mucosas humanas e portanto na forma leveduriforme. Acometendo principalmente pessoas imunocomprometidas essas infecções podem causar doenças mucocutâneas, candidíases no trato urinário, na mucosa vaginal, no sistema gastrointestinal e respiratório, além de onicomicose (infecção de unha).^{32,34}

A esporotricose e as candidoses são doenças causadas pela infecção por fungos patogênicos que levam a doenças mucocutâneas, cutâneas ou linfocutâneas (como é o caso da esporotricose) e o tratamento para esses casos envolve a administração de antifúngicos por via oral, os principais fármacos prescritos são o

itraconazol, o fluconazol, o cetoconazol, amphotericin B e o caspofungin em casos mais severos. O tempo de administração dessas drogas é longo e leva à desistência e abandono do tratamento. A desvantagem é que já são reportadas linhagens de ambos os fungos que desenvolveram resistência aos fármacos comerciais.^{35,36,37} Uma consequência desse fato é a necessidade de maiores doses do antifúngico ou até mesmo fármacos mais potentes e que podem apresentar diversos efeitos colaterais, por exemplo o itraconazol, que é contra-indicado para pessoas com doenças no fígado, pois pode provocar hepatite medicamentosa.³⁸

Por isso, a terapia fotodinâmica surge como uma terapia alternativa e até associativa para esses casos. A administração local, rápida, segura e eficaz de um fotossensibilizador e uma fonte de irradiação destrói tecidos infectados com grande eficácia, diminuindo o tempo de tratamento, aumentando o bem-estar do cliente e por ser uma técnica não seletiva, não é encontrado relatos de linhagens resistentes à terapia fotodinâmica.

1.3.2. Câncer melanoma

Hoje em dia o câncer é quarta doença que mais mata precocemente antes dos 70 anos, por isso, é considerado um problema de saúde pública no mundo todo, principalmente o câncer de pele não-melanoma e melanoma.³⁹

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) em 2018 foram registrados 1 milhão de novos casos de câncer de pele não-melanoma e 200 mil novos casos de câncer melanoma no mundo todo.

Ainda são estimados para o triênio 2020-2022 que a cada ano no Brasil sejam diagnosticados 177 mil novos casos de câncer não-melanoma e aproximadamente 10.000 casos de câncer melanoma.³⁹

O carcinoma basocelular e espinocelular são dois tipos de câncer de pele não-melanoma, o primeiro acomete a última camada da epiderme, enquanto o segundo pode atingir qualquer camada. São menos agressivos, pois não saem da pele e possuem desenvolvimento lento, o que permite o diagnóstico precoce e o tratamento adequado, seja por cirurgia, criocirurgia ou quimioterapia.^{40,41}

Já o câncer de pele melanoma é extremamente agressivo e pode acometer diversas partes do corpo, quando em estágio avançado sofre metástase (deslocamento por via linfática e sanguínea) e acaba se instalando em outros órgãos, gerando complicações ainda maiores. O tratamento para esses casos vai depender do estágio da doença, por exemplo, se diagnosticado rapidamente pode ser removido cirurgicamente, porém se sofrer metástase e acometer outros órgãos os tratamentos envolvem cirurgia invasiva, quimioterapia e radioterapia.^{40,41}

Os tratamentos atuais causam diversos efeitos colaterais indesejados para o paciente e os tratamentos são longos e apresentam resistência. Pensando nesses problemas, é necessário o estudo de novas técnicas terapêuticas para o tratamento dessas neoplasias e mais uma vez a terapia fotodinâmica se mostra promissora para aplicação nesses casos.

2. Objetivos

2.1. Geral:

Avaliar *in vitro* ação fotodinâmica antimicrobiana e antitumoral do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pPDIp)](PF₆)₂ como fotossensibilizador.

2.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar por técnicas espectroscópicas o complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pPDIp)](PF₆)₂ onde phen= 1,10-fenantrolina, pPDIp= grupo perilenodiimida funcionalizado com um dos ligantes fenantrolina coordenado ao metal.
- Avaliar por microscopia confocal a aderência do fotossensibilizador proposto em células de fungos.
- Avaliar a atividade antimicrobiana do complexo frente à *Sporothrix brasiliensis* e *Candida albicans* na ausência e na presença de luz.
- Investigar *in vitro* a citotoxicidade no escuro e a fotocitotoxicidade do complexo proposto em células de melanoma e melanócito humano;

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

São de procedência Sigma-Aldrich todos os reagentes utilizados durante as sínteses e os sais envolvidos na preparação da solução tampão, (Ácido fosfórico (H_3PO_4), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) e fosfato de potássio tribásico (K_3PO_4). Os solventes orgânicos com grau de pureza HPLC e soluções aquosas feitas com água destilada.

Para os testes antimicrobianos os fungos foram crescidos em Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi) e meio YPD (Kasvi) com pH ajustado utilizando HCl (pH 4.5) e NaOH (pH 7.8).

Para os ensaios com células de melanoma e melanócitos as linhagens foram crescidas em meio RPMI-1640 (Gibco® com 25,0 mM de HEPES, L-glutamina e sem bicarbonato de sódio) e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco.) e foram reveladas utilizando 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Molecular probes, Thermo Fisher Scientific).

3.2. Sínteses

O complexo precursor $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ foi sintetizado em 15 mL DMF previamente destilado reagindo $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (200 mg) com 1,10-fenantrolina em excesso (289,5 mg), utilizando LiCl (230 mg) como fonte de íons Cl^- . A reação foi mantida sob refluxo por 8 horas à 150 °C e atmosfera de N_2 . A reação foi filtrada à quente e lavada com acetona para retirar o excesso de fenantrolina livre e lavada com água destilada gelada para retirar produtos secundários ($[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{+2}$ e LiCl).

O ligante pPDlp (fenantrolina-perileno-fenantrolina) foi sintetizado em 25 mL quinolina bi-destilada reagindo o anidrido de 3,4,9,10-perilenodiimida (66,7 mg) com 1,10-fenantrolina-5-amino (111 mg) e Acetato de Zinco (17 mg) como catalisador, a reação foi realizada à 230 °C num banho de areia e mantida sob refluxo durante 24 horas em atmosfera de N_2 . O ligante foi precipitado utilizando

150 mL de metanol gelado, posteriormente filtrado e lavado com uma solução 5% de NaHCO_3 à quente para retirar o precursor que não reagiu e por fim, lavado com metanol.

O complexo final, $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$, foi sintetizado combinando o complexo precursor $\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Cl}_2$ com o ligante pPDlp em 15 mL de DMF destilado e reagido sob refluxo durante 24 horas à 150 °C e atmosfera de N_2 . A mistura final foi filtrada em um funil com algodão. Ao filtrado adicionou-se NH_4PF_6 (21,8 mg) como contra-íon e éter para precipitar o complexo. A solução foi filtrada e o sólido obtido foi solubilizado em acetona e levado à uma centrífuga à 3000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e evaporado. Por fim, o sólido obtido foi lavado com água gelada e seco.²⁴

3.3. Equipamentos e Metodologias

3.3.1. Espectroscopia de absorção eletrônica na região do UV-vis

Os experimentos de absorção eletrônica na região do UV-Vis foram feitos utilizando um espectrofotômetro Agilent 8453A. Com cubetas de quartzo de caminho óptico de 1 cm e 3,5 mL de capacidade.

3.3.2. Espectroscopia de fluorescência no estado estacionário

Os experimentos de emissão foram realizados utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301 PC (lâmpada de alta pressão de xenônio de 150W e uma fotomultiplicadora do tipo R928).

3.3.3. Ensaio Biológico - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Os testes de terapia fotodinâmica antimicrobiana foram realizados junto ao Centro de Pesquisas em Óptica e Fotônica (CePOF) no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP), com supervisão da Dr^a Hilde Harb Buzzá.

3.3.3.1. Meio de Cultura e Microrganismos

A eficiência do complexo RupPDIp em terapia fotodinâmica antimicrobiana foi testada contra dois fungos patogênicos: *Sporothrix brasiliensis* (ATCC MYA4823 - fornecida pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP) e *Candida albicans* (ATCC 90028). *Sporothrix* é um fungo termodimórfico, que existe na forma micelial (ou filamentosa) à 25° C em ambientes ricos em matéria orgânica e quando incubado em hospedeiros mamíferos à 37 °C passa para a forma leveduriforme (ou parasítica). Por isso, o crescimento de ambas as formas foi acompanhado por 14 dias em meio líquido YPD (Yeast-Peptose-Dextrose) e meio Ágar . O fungo *Candida albicans* é um fungo também termodimórfico, mas existe naturalmente na microbiota de mucosas humanas, por isso, a forma leveduriforme foi escolhida para este experimento, esse fungo tem seu crescimento bem estabelecido no grupo de óptica e conhecido na literatura, portanto bastou cultivá-lo em meio sólido Ágar Sabouraud Dextrose com pH neutro por 24 horas em estufa à 37° C.

3.3.3.2. Suspensão dos Microrganismos

A suspensão dos fungos utilizadas foram padronizadas utilizando um espectrofotômetro Varian Cary[®] 50 UV-Vis Spectrophotometer-Agilent, Santa Clara, California, USA, onde a Densidade Óptica (DO) da suspensão foi aferida em 580 nm. Uma luz incidente sobre uma suspensão microbiana será desviada pelas células, a porcentagem de luz transmitida, ou desviada, é aferida com um

espectrofotômetro. A taxa de luz transmitida é afetada pela concentração das células, pelo tamanho delas, pelo comprimento de onda e a intensidade (I_0) da luz incidente, além do caminho óptico onde está sendo feita a leitura.⁴²

Podemos então concluir que a DO da suspensão celular corresponde à Absorbância, determinada pela seguinte expressão, equação 7,

$$DO = \log (I_0/I) \quad (7)$$

onde I_0 é a intensidade da luz incidente e I é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células.⁴²

Para a medida da DO as colônias eram coletadas com uma alça de *Drigalski* e suspendidas em 10 mL de água destilada recém esterelizada, homogeneizadas em um vórtex e levadas à centrifugação durante 10 min com 4000 RPM, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de células formado foi suspenso novamente em 10 mL de água destilada, esse procedimento foi realizado 3 vezes de modo a retirar qualquer impureza proveniente do meio de cultura e que possa atrapalhar a padronização das suspensões. Com os fungos finalmente lavados e suspensos em 10 mL de água destilada, 1 mL da suspensão foi transferida para uma cubeta plástica e adicionou-se 1 mL de formaldeído 4% para inativar o fungo e garantir as questões de biossegurança do laboratório, por fim a cubeta foi levada ao espectrofotômetro para medida de DO.

3.3.3.3. Crescimento *Sporothrix brasiliensis*

Primeiramente, todos os materiais a serem utilizados nos experimentos de TFD passaram por esterilização em autoclave à 121° C de modo a evitar possíveis contaminações. Então o crescimento de ambas as formas do fungo *Sporothrix brasiliensis* foram analisados durante 14 dias. Para a forma micelial, 50 µL de uma solução pré-inóculo foram incubadas em 15 tubos falcon, contendo 10 mL de meio líquido YPD com pH 4.5 e armazenadas à temperatura ambiente (25° C). O crescimento da forma leveduriforme foi analisado utilizando 50 µL da mesma solução pré-inóculo em 15 tubos falcon contendo meio YPD com pH 7.8 e armazenados em estufa à 37° C. O perfil do crescimento foi acompanhado através das medidas diárias de Densidade Óptica (DO) da suspensão. Assim que foi

finalizado o inóculo fez-se a primeira medida da DO, no tubo correspondente ao dia 0, no dia seguinte mediu-se a DO do tubo correspondente ao dia 1 e no seguinte mediu-se a DO do tubo 2, assim sucessivamente até o 14^o tubo correspondente ao 14^o dia.

Para além da densidade óptica, 20 µL de cada tubo foram espalhados sobre uma placa de Petri contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose (pH 4.5 e 7.8) com diluições entre 10⁻² a 10⁻⁴. Dessa forma, podemos relacionar a DO com a quantidade de microrganismos viáveis ao crescimento e determinar o melhor dia de cultivo e coleta das colônias, determinado quando a cultura atinge uma faixa de 10⁶ - 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL).

A DO para *Sporothrix brasiliensis* foi determinada pelo experimento e a DO de 0.38 para *Candida albicans* foi utilizada a partir de trabalhos estabelecidos na literatura.⁴³

3.3.3.4. Determinação do Intervalo Droga-Luz (Tempo de Incubação)

Para a determinação do melhor tempo de incubação, foi usada uma suspensão padronizada de *Sporothrix brasiliensis* (10⁶ células) na sua forma micelial (pH 4.5), para isso 500 µL da suspensão foi transferida para uma placa com 24 poços e incubada com 10 µM do complexo RupPDIp com volume final de 1 mL. Os tempos de incubação testados foram de 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos.

Após cada tempo de incubação, uma gota de cada poço foi colocada entre um conjunto de lâminas e levado ao microscópio de fluorescência confocal (Zeiss, Germany) e as imagens foram realizadas com excitação em 450 nm e leitura com filtro de luz de 500-700 nm.

3.3.3.5. Testes de Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Para avaliar a ação fotodinâmica antimicrobiana, foram preparadas suspensões de *Sporothrix brasiliensis* em ambas as formas e de *Candida albicans*

na sua forma leveduriforme com concentração final de 10^6 células/mL.

Os grupos analisados foram separados da seguinte forma:

- Controle: Apenas o microrganismo;
- Controle Irradiado: Microrganismo + Luz (Para descartar efeito térmico ou de fotoinativação);
- Controle Fotossensibilizador (FS): Microrganismo + FS na ausência de irradiação (Para descartar efeito fungicida ou fungistático do fotossensibilizador);
- Grupo TFD: Microrganismo + FS + Luz (Para avaliar os efeitos fotodinâmicos do complexo).

Para cada grupo estudado, 500 μ L da suspensão padronizada do microrganismo foram transferidos para uma placa com 24 poços onde adicionou-se o fotossensibilizador (FS) RupPDlp (nos grupos necessários) em diferentes concentrações, variando entre 0.05; 0.5; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 10.0 e 20.0 μ M, o volume dos poços foi completado de modo a atingir 1 mL e colocados no escuro para incubação. Após 20 minutos de incubação as placas contendo os grupos com iluminação foram levadas à um dispositivo customizado, que conta com 24 LEDs conectados em série desenvolvido pelo Laboratório de Apoio Tecnológico do IFSC - São Carlos (LAT - IFSC/São Carlos).

A eficiência do complexo em TFD foi avaliada utilizando irradiação em dois comprimentos de onda e a dose utilizada para cada um deles foi calculada utilizando a equação 8,

$$\text{Dose (J/cm}^2\text{)} = \text{Irradiância (mW/cm}^2\text{)} \times \text{Tempo (s)} \quad (8)$$

O dispositivo mostrado na Figura 5 possui irradiância de 40 mW/cm² em 450 nm (luz azul) e durante 15 minutos entregou-se uma dose de 36 J/cm².

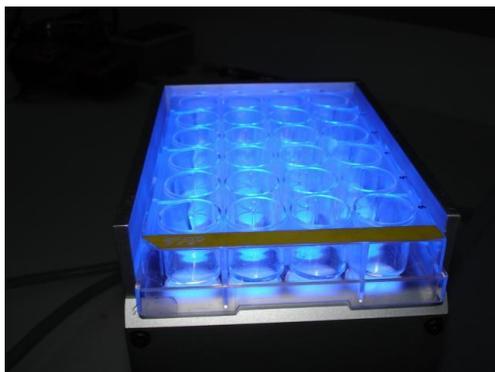


Figura 5. Dispositivo de iluminação com 24 LEDs emitindo em 450 nm e irradiância de 40 mW/cm².

Já a fonte de irradiação em 525 nm (luz verde), Figura 6, possui irradiância de 7 mW/cm² e durante 60 minutos, entregou-se uma dose de 25.2 J/cm².



Figura 6. Dispositivo de iluminação com 24 LEDs emitindo em 525 nm e irradiância de 7 mW/cm².

Após incubação (para os grupos na ausência de irradiação) e irradiação (para os grupos na presença de luz) 100 μ L de cada grupo estudado foi transferido para um eppendorf contendo 900 μ L de água destilada, depois de homogeneizada a solução, 100 μ L do primeiro eppendorf foram transferidos para um segundo eppendorf contendo 900 μ L de água destilada, e assim sucessivamente até obter uma diluição em série (10^{-2} a 10^{-4}). A diluição impede que o crescimento excessivo das colônias atrapalhe a contagem das células, dessa forma, 20 μ L de cada eppendorf contendo as soluções mais diluídas (10^{-2} ; 10^{-3} e 10^{-4}) foram plaqueados em meio sólido Ágar Sabouraud Dextrose com pH correspondente ao

microrganismo utilizado. Todos os testes foram realizados em triplicata e após três dias as colônias foram contadas e sistematizadas de acordo com a equação 9,

$$\text{Log (UFC/mL)} = \text{média das colônias} \times \text{diluição}^{-1} \times \text{alíquota}^{-1} \quad (9)$$

A eficiência do complexo como fotossensibilizador foi avaliada comparando, em escala logarítmica, os grupos de TFD com os grupos de controle e para isso os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA (variável única).

3.3.4. Ensaios de Terapia Fotodinâmica em células de melanoma e melanócito humano

Os testes em células de melanoma e melanócito humanos foram realizados pela pós-doutoranda Angélica Ellen Graminha no Laboratório de Química Analítica e Bioinorgânica do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP/USP.

3.3.4.1 Cultivo das células

A linhagem tumoral de melanoma humano A375 (cedida pelo Laboratório de Química Analítica e Bioinorgânica do pesquisador prof. Dr. Roberto Santana da Silva) e a linhagem não tumoral de melanócito humano NGM (adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ) foram cultivadas em garrafas de cultivo (75 cm³) com meio RPMI-1640 (Gibco® com 25,0 mM de HEPES, L-glutamina e sem bicarbonato de sódio) e DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco.), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. As garrafas foram mantidas em estufa à 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem 80% de confluência das células, ou seja, até ocuparem praticamente todo o espaço disponível e regularem seu metabolismo para um crescimento ordenado e conjunto.

Após esse período as células foram desprendidas da superfície utilizando tripsina como protease (quebra ligações covalentes entre o meio e as células) +

EDTA, num processo conhecido como tripsinização e contadas em uma câmara de Neubauer.

3.3.4.2. Ensaio de terapia fotodinâmica

As células foram crescidas seguindo o procedimento descrito e a suspensão resultante foi semeada com 10^4 células/poço em uma placa de 96 poços. Para avaliação da eficiência do complexo RupPDIp em terapia fotodinâmica analisou-se a citotoxicidade do fotossensibilizador na ausência de luz e a fotocitotoxicidade do fotossensibilizador na presença de luz. As células foram tratadas e incubadas durante 8 horas com o fotossensibilizador utilizando concentrações que foram de 0,10 μM até 100 μM e porcentagem máxima de DMSO por poço de 1% (proveniente da solução estoque do complexo).

Após a incubação, o meio de cultura foi removido de ambas as placas (ausência e presença de luz) para evitar interferências, as mesmas foram lavadas com tampão fosfato e um novo meio de cultura foi adicionado, sem vermelho de fenol. Em seguida, as placas irradiadas receberam doses de 1,76 ou 2,12 J/cm^2 com iluminação em 415 nm (Fig. 7) e foram mantidas em estufa junto às placas não irradiadas durante 24 horas.

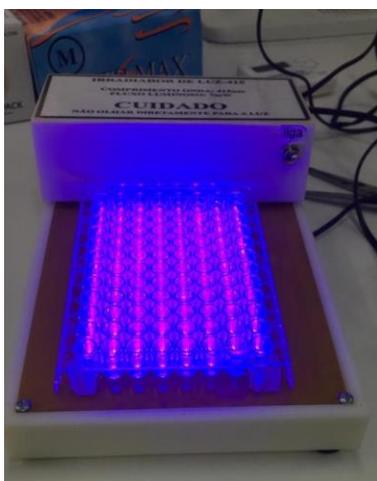


Figura 7. Dispositivo de iluminação de LEDs com comprimento de onda em 415 nm.

Por fim, foi adicionado aos poços uma solução de MTT (0,5 mg/mL) e deixado reagir durante durante 3 horas. Esta técnica colorimétrica utiliza o metabolismo de células saudáveis para avaliar a viabilidade celular, ou seja, o quanto de células vivas restaram em cada poço ao final do experimento. Para isso, utiliza-se um sal que tem coloração amarela conhecido como MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)), que ao entrar em contato com a enzima redutimétrica NADH produzida por células saudáveis, é reduzido metabolicamente para formar um segundo sal (Fig. 8), de coloração violeta ($\lambda_{\text{máx}} = 490 \text{ nm}$), conhecido como formazan {E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan}.⁴⁴

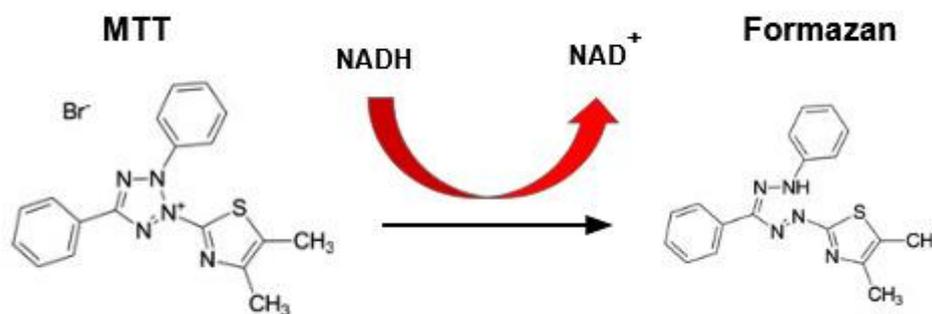


Figura 8. Reação de redução metabólica do sal MTT para formação de formazan.

Este sal violeta é insolúvel em soluções aquosas, mas pode ser facilmente solubilizado em solventes orgânicos resultando em uma solução cuja absorbância é proporcional ao número de células viáveis.⁴⁴ Portanto, após o período de incubação a solução de MTT foi retirada, os cristais formados foram solubilizados em 100 μL de DMSO e as placas foram levados a um leitor de Elisa (Thermo Plate TP-READER) ou leitor de microplacas para medida da absorbância em 470 nm. A viabilidade celular em porcentagem foi calculada de acordo com a equação 10,

$$\% \text{ células viáveis} = (\text{DO experimento}/\text{DO controle}) \times 100\% \quad (10)$$

lembrando que DO, como já esclarecido, é a medida de transmitância da luz em suspensões biológicas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Absorção eletrônica no UV-Vis e Emissão no Estado Estacionário

A espectroscopia do complexo RupPDlp foi acompanhada por emissão e absorção em três solventes diferentes com concentrações de 20 μM e soluções em atmosfera inerte (N_2).

O espectro de absorção do complexo em DMSO (Fig. 9) é caracterizado pela somatória dos espectros do ligantes pPDlp e da componente $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. É possível observar uma banda larga com máximo em 440 nm ($\epsilon = 30.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) referente à transição de transferência de carga do metal para o ligante (MLCT) de natureza $d\pi, \text{Ru}(\text{II}) \rightarrow \pi^*, \text{pPDlp}$ e três ombros referentes às transições de transferência de carga interna, $\pi \rightarrow \pi^*$, do ligante pPDlp (ILCT). A banda 0-2 em 465 nm ($\epsilon: 38.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$), a banda 0-1 com máximo em 495 nm ($\epsilon: 45.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) e a banda 0-0 em 535 nm ($\epsilon: 55.000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$).

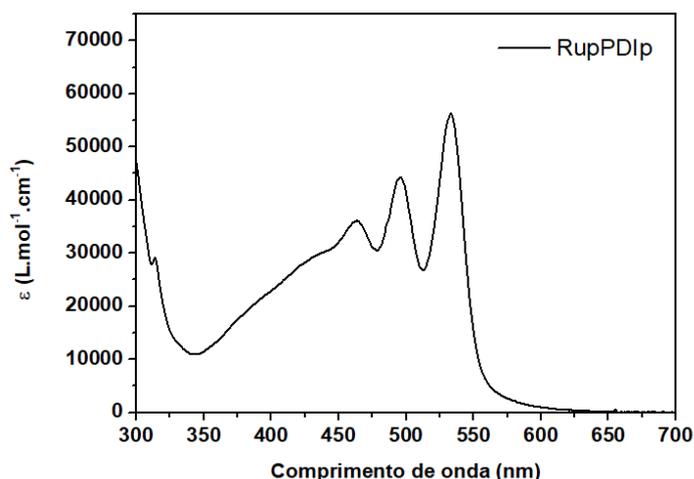


Figura 9. Espectro de absorção eletrônica do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDlp})](\text{PF}_6)_2$ em DMSO sob atmosfera inerte (N_2) e concentração de 20 μM

A Figura 10 mostra o espectro de absorção do complexo em Acetonitrila e tampão fosfato comparado ao espectro em DMSO. Em Acetonitrila é possível observar que o perfil das transições não sofre alteração, porém há um deslocamento do máximo de absorção em direção à menores comprimentos de onda. A banda 0-0

que em DMSO ficava em 535 nm agora possui um máximo em 525 nm (ϵ : 40.000 mol⁻¹.L.cm⁻¹).

Já em tampão fosfato o espectro de absorção sobre uma queda brusca nos valores de absorvidade molar quando comparado aos outros solventes orgânicos e fica evidenciado uma inversão nas bandas de absorção do complexo, a supressão da banda 0-0 (ϵ : 11.000 mol⁻¹.L.cm⁻¹) em relação a banda 0-1 (ϵ : 17.000 mol⁻¹.L.cm⁻¹) indica mudança nas transições eletrônicas do ligante pPDIp, uma vez que a banda de MLCT foi preservada. Este comportamento pode ser explicado pela tendência de compostos aromáticos formarem agregados π - π solução.

Além disso também é possível notar um leve deslocamento em direção a comprimentos de onda maiores, a banda 0-0 que antes tinha máximo de absorção em 535 nm em DMSO, apresenta máximo em 545 nm quando em tampão fosfato.

O deslocamento para o vermelho com o aumento na polaridade do solvente indica uma estabilização, e conseqüentemente diminuição na energia das transições eletrônicas do complexo.⁴⁵

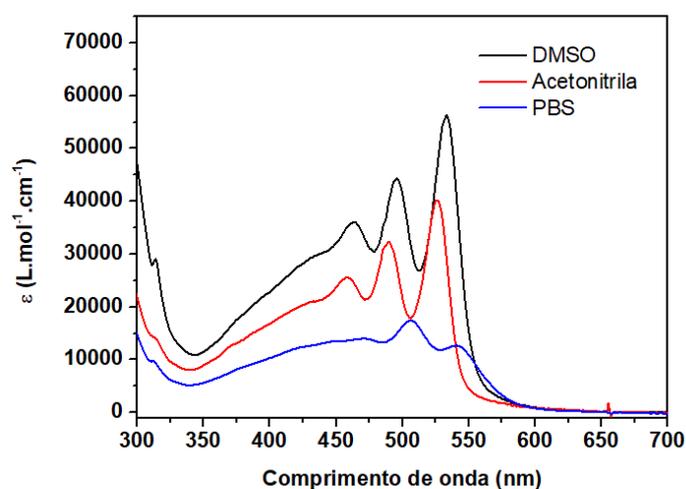


Figura 10. Espectros de absorção eletrônica do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pPDIp)](PF₆)₂ em DMSO (preto), Acetonitrila (vermelho) e PBS (azul) sob atmosfera inerte (N₂).

Em DMSO e Acetonitrila quando excitado em 450 nm, região de absorção da MCLT, o complexo exibe como resposta uma larga banda de emissão com máximo em 600 nm característica de uma desativação proveniente do ³*MLCT. Já quando excitado em 500 nm, região de absorção do ligante pPDIp, o complexo apresenta uma emissão com três ombros e máximos em 545 nm, 575 nm e 625 nm. O espectro

de emissão nessa região é a imagem especular da absorção do ligante pPDIp e por isso podemos concluir que são desativações do tipo 3pPDIp , conforme mostrado na Figura 11.

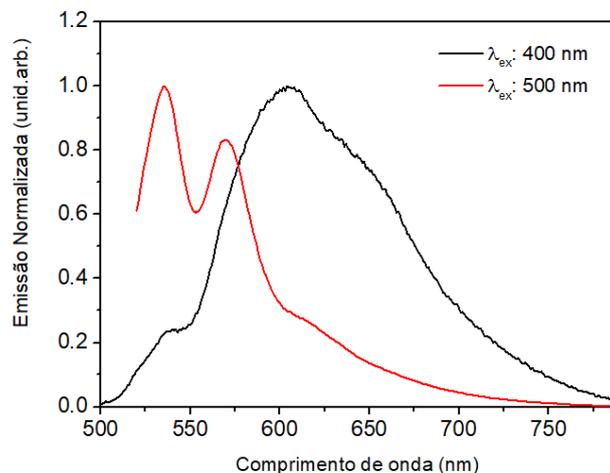


Figura 11. Espectros de emissão do complexo $cis-[Ru(phen)_2(pPDIp)](PF_6)_2$ em DMSO (preto) sob atmosfera inerte (N_2). λ_{EX} : 400 nm (preto) e λ_{EX} : 500 nm (vermelho)

O fato de existirem agregados do tipo $\pi-\pi$ é corroborado no espectro de emissão em tampão fosfato (Figura 12). Quando excitado, independente do comprimento de onda, o complexo apresenta uma emissão 3MLCT com máximo em 600 nm. A supressão na emissão do ligante perileno é outro indício dessas espécies em solução, que como já observado em outros derivados de perileno alteram as propriedades espectroscópicas da molécula.⁴⁶

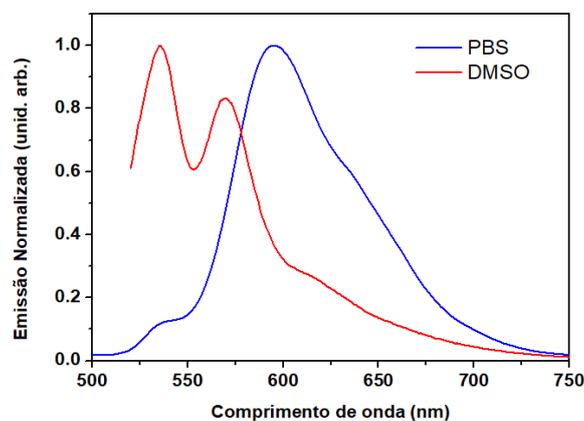


Figura 12. Espectros de emissão do complexo $cis-[Ru(phen)_2(pPDIp)](PF_6)_2$ em DMSO (preto) e PBS (azul) sob atmosfera inerte (N_2). λ_{EX} : 500 nm.

4.1.1 Fotólise do complexo acompanhado por UV-vis e Emissão no Estado Estacionário

A estabilidade fotoquímica do complexo foi acompanhada por UV-vis e fluorescência no estado estacionário. Em DMSO com irradiação contínua em 420 nm ou em 518 nm, a solução passa de uma coloração laranja para verde (Figura 13).

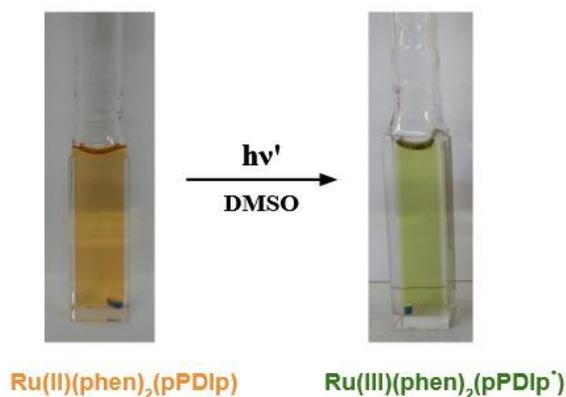


Figura 13. Soluções em atmosfera inerte (N_2) do complexo *cis*- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDip})](\text{PF}_6)_2$ em DMSO antes da fotólise (laranja) e após a fotólise (verde).

Nos espectros de absorção da Figura 14, o complexo apresentou comportamentos similares, é notável o consumo das bandas de transição interna do perileno em 465 nm, 495 nm e 535 nm e o aparecimento de três novas bandas de absorção, com máximos em 710, 800 e 950 nm. Tais bandas estão relacionadas à formação do ânion radicalar do perileno ($\text{pPDip}^{\bullet-}$).^{23,24}

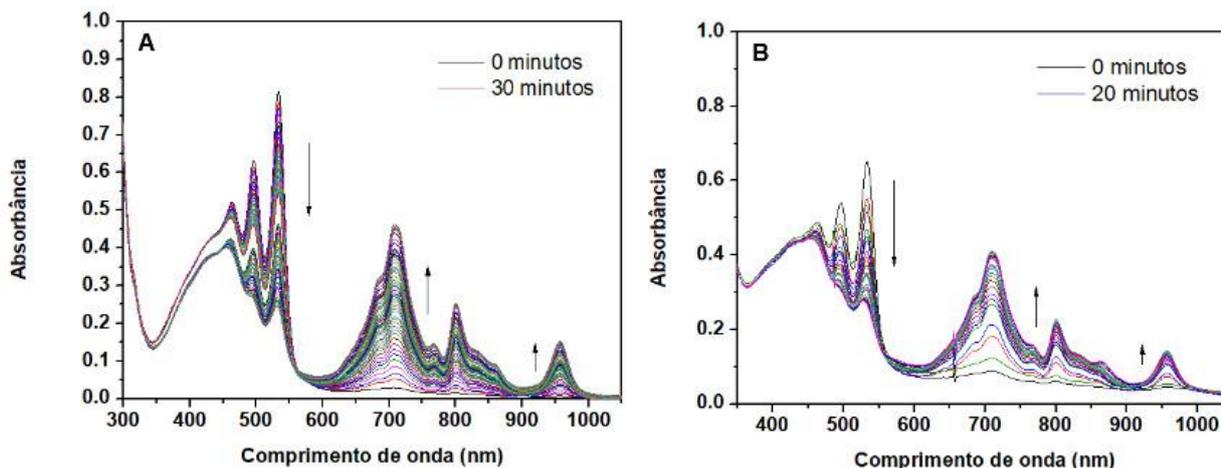


Figura 14. Fotólise exaustiva do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})](\text{PF}_6)_2$ em DMSO acompanhada por UV-vis com irradiação em (A) 420 nm e (B) 518 nm sob atmosfera inerte.

A fotólise do complexo em DMSO também foi acompanhada por emissão, e independente da região de irradiação, apresenta um aumento na emissão do ligante pPDIp e não apresenta mudanças significativas na intensidade de emissão da banda de $^3\text{MLCT}$. Ainda é possível observar que a banda 0-0 com máximo em 545 nm tem um crescimento considerável se comparada a banda 0-1 (Figura 15). Como já estudado pelo nosso grupo esse comportamento se deve ao decaimento por via transferência de carga, onde uma molécula excitada interage com uma molécula no estado fundamental ($^*\text{pPDIp-pPDIp}$), dando origem à uma interação conhecida como excímero dinâmico.^{23,24}

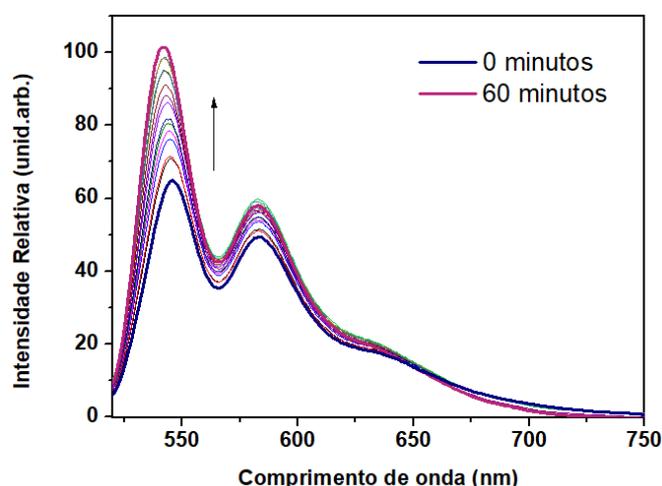


Figura 15. Fotólise exaustiva do complexo $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{pPDIp})](\text{PF}_6)_2$ em DMSO acompanhada por emissão com irradiação em 518 nm.

Em contraponto, em acetonitrila e tampão fosfato o complexo não exibe alterações de coloração na solução, nem mudanças no espectro de absorção (Figura 16). A formação da espécie ânion radicalar não é favorecida nestes solventes e por isso os espectros de emissão não apresentam alterações durante fotólise contínua.

Em tampão fosfato a ausência dessa espécie após irradiação se deve ao fato de existirem agregados em solução, dificultando a formação do estado de transferência de carga. E nos mostra que o solvente DMSO é fundamental na estabilidade dessas espécies.

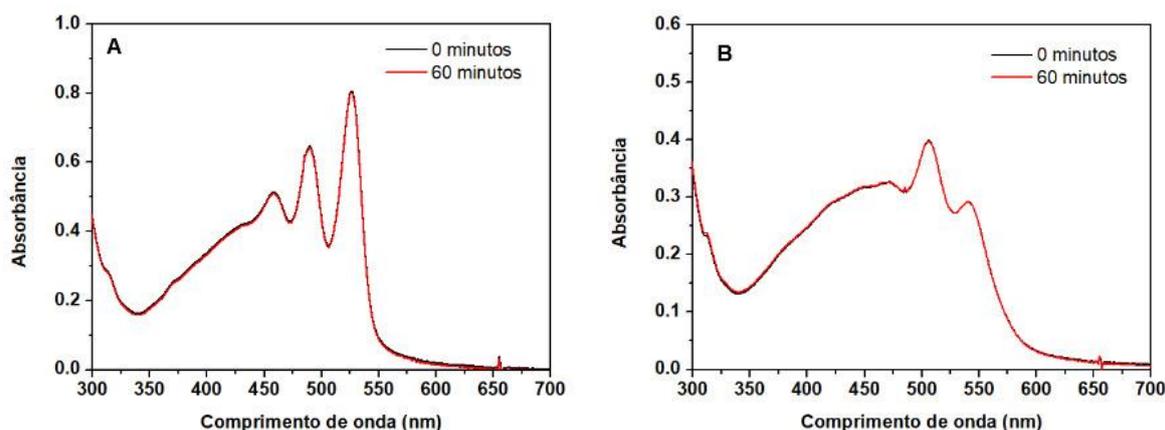


Figura 16. Fotólise exaustiva do complexo $cis-[Ru(phen)_2(pPDIp)](PF_6)_2$ em (A) Acetonitrila e (B) PBS acompanhada por UV-vis com irradiação em 518 nm.

4.1.2. Gradiente de Solvente

Uma vez que o solvente desempenha papel fundamental na formação do ânion radicalar do perileno, analisamos a eficiência desse processo alterando a fração de DMSO e Acetonitrila em solução. Dessa forma estabeleceu-se um gradiente de solvente variando entre 100% e 0% de Acetonitrila em relação à DMSO.

De acordo com a Figura 17, a fotólise acompanhada até exaustão mostrou uma deficiência no processo de formação do pPDIp⁻ conforme o aumento da fração de acetonitrila em solução.

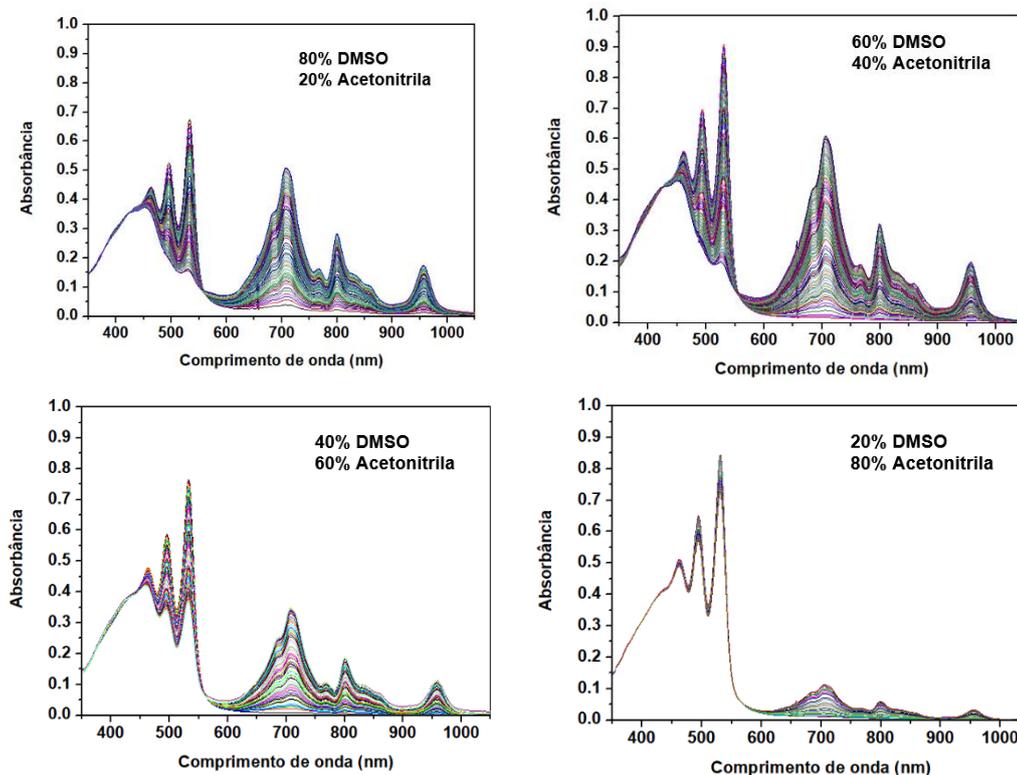


Figura 17. Fotólise exaustiva do complexo $cis\text{-}[Ru(phen)_2(pPDIp)](PF_6)_2$ em DMSO com variação na fração de Acetonitrila acompanhada por UV-vis e irradiação em 518 nm.

Após um tempo contínuo de irradiação a reação de formação do ânion satura e para, porém com o aumento de acetonitrila o tempo até esse esgotamento aumentou. Isso porque durante a formação do estado de separação de cargas é necessário que haja um rearranjo do solvente de modo a estabilizar os dipolos formados. Com a diminuição na fração de DMSO (solvente que estabiliza o estado de separação de cargas formado) o tempo para esse rearranjo aumenta.

A constante de velocidade observada (k_{obs}) para essas reações foi calculada pela reta da equação 11,

$$\ln (Abs_t - Abs_i) / (Abs_f - Abs_i) \quad (11)$$

Os resultados estão sumarizados na Tabela 1. A reação envolve um processo direto de consumo na absorção do complexo para formação do ânion radicalar, mas como dito acima, acetonitrila é um solvente que não estabiliza o estado de separação de cargas, dessa forma devemos levar em conta os processos de desativação para o $p\text{PDip}^{\cdot-}$ e a constante de velocidade sofre queda conforme a fração de acetonitrila aumenta. Concluindo mais uma vez o papel do DMSO na formação dessa espécie.

Tabela 1. Valores da constante de velocidade observada (k_{obs}) para a reação de fotólise do complexo variando a fração de DMSO.

%DMSO	100%	80%	60%	40%	20%
k_{obs} (10^{-8})	3400	2500	14	1,5	-

4.1.3 - Supressão bimolecular de Stern-Volmer

Durante o gradiente de solvente foi possível observar uma deficiência no na formação do ânion radicalar do perileno, resultado de processos do estado excitado. Estes podem decair por mecanismos intermoleculares de supressão. Processos estáticos estão relacionados com a formação de um complexo do estado excitado que não emite e processos dinâmicos ocorrem através de colisões com outras moléculas.⁴⁶ A equação 12, de Stern-Volmer, diz que a queda na intensidade de emissão (I) comparada à emissão na ausência do supressor (I_0) é provocada por colisões dinâmicas entre o supressor (Q) e a molécula no estado excitado com constante de supressão bimolecular k_q e pode ser visualizada abaixo,

$$(I_0/I) = 1 + K_{sv}[Q] \quad (12)$$

K_{sv} : constante de Stern-Volmer definida pelo produto da constante de supressão bimolecular (k_q) e o tempo de vida de emissão da molécula na ausência do supressor (τ_0).⁴⁷

O complexo RupPDlp foi testado em DMSO utilizando Acetonitrila como supressor de fluorescência e é possível notar uma queda na emissão referente à desativação 3MLCT conforme o aumento na fração do supressor (Figura 18).

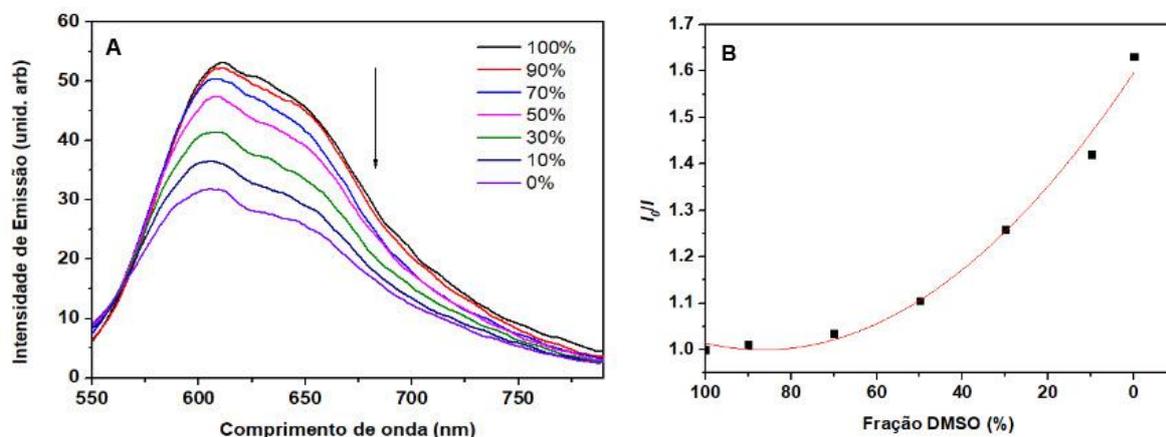


Figura 18. (A) Espectro de emissão do complexo $cis-[Ru(phen)_2(pPDlp)](PF_6)_2$ em DMSO variando a fração de Acetonitrila. (B) Gráfico de Stern-Volmer para supressão de fluorescência.

Mecanismos de supressão estáticos formam complexos que não são luminescentes no estado excitado e por isso o aumento na concentração desse supressor gera uma queda linear na emissão. Fato não observado para o complexo RupPDlp utilizando acetonitrila como supressor, portanto descartado os processos estáticos.⁴⁸

O perfil não linear apresentado no gráfico sugere desativações por colisões dinâmicas, entendível se pensarmos na natureza dos solventes utilizados. O DMSO é um solvente viscoso enquanto acetonitrila é um solvente fluido, isso facilita a difusão da espécie supressora em direção à molécula excitada. Fato que justifica a má estabilização da espécie pPDlp no gradiente de solvente, uma vez que o solvente acetonitrila compete em espaço com o DMSO, impedindo a estabilização do excímero dinâmico $\{^*pPDlp-pPDlp\}$.

4.1.4. Aplicação em catálise fotoredox

A formação do pPDIp faz parte de um processo do estado excitado e pensando nas propriedades dos complexos de Ru(II) em participar de reações fotoredox, analisamos a presença do complexo RupPDIp como agente oxidante. Frente a álcool benzílico (BA, do inglês benzyl alcohol) numa proporção 200:1 de RupPDIp e com irradiação contínua a solução antes de coloração laranja, atinge uma coloração verde relacionada ao pPDIp[•] e por fim adquire coloração violeta (Figura 19).

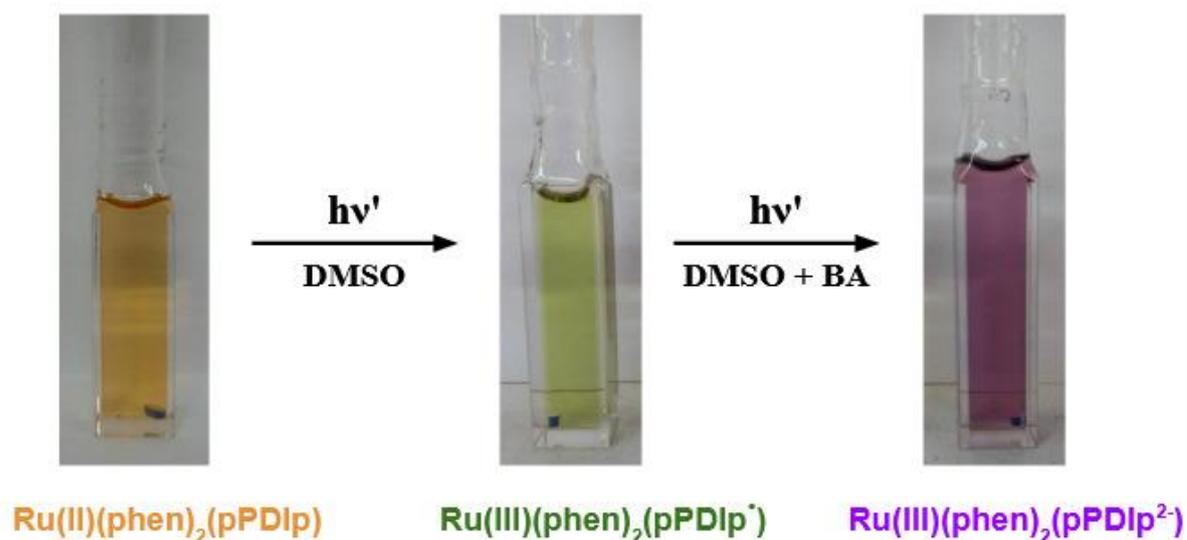


Figura 19. Soluções em atmosfera inerte (N₂) do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pPDIp)](PF₆)₂ em DMSO antes da fotólise (laranja), após a primeira redução (verde) e após segunda redução (violeta).

No espectro de absorção apresenta a formação da espécie pPDIp[•] e logo em seguida apresenta o consumo das bandas em 710 nm, 800 nm e 960 nm para dar origem à uma nova banda de absorção em 585 nm (Figura 20). Essa nova absorção já foi evidenciada em experimentos usando TEA como agente redutor frente ao RupPDIp e corresponde à formação da espécie diânion pPDIp²⁻.²⁴

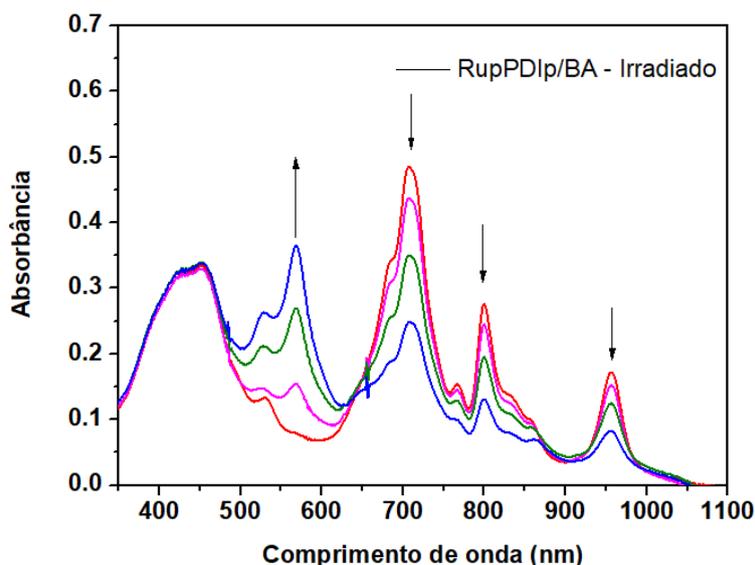


Figura 20. Espectro de absorção do complexo $cis-[Ru(phen)_2(pPDIp)](PF_6)_2$ na presença de álcool benzílico (BA) sob irradiação em 450 nm.

A segunda redução do complexo não é observada em DMSO. Por isso, é possível que o segundo elétron seja proveniente de um processo de oxidação do substrato alcoólico.

Porém, a investigação acerca da eficiência, mecanismo e dos produtos formados foram interrompidos pela pandemia do novo Covid-19.

4.1.5. Voltametria Cíclica em DMSO

A formação do ânion e diânion do perileno mostram uma possibilidade de aplicação em catálise fotoredox. Para avaliação do potencial do estado excitado, analisou-se os processos eletroquímicos do complexo RupPDIp em DMSO na Figura 21.

O primeiro par redox formado com $E_{1/2} = -0,215$ V está associado à formação do ânion pPDIp/pPDIp⁻. O par redox para a formação da espécie diânion pPDIp⁻/pPDIp²⁻ tem $E_{1/2} = -0,38$ V e por fim, os últimos dois processos observados correspondem às reduções das duas fenantrolinas não modificadas (phen/phen⁻) coordenadas ao metal, com $E_{1/2} = -1,165/-1,315$.

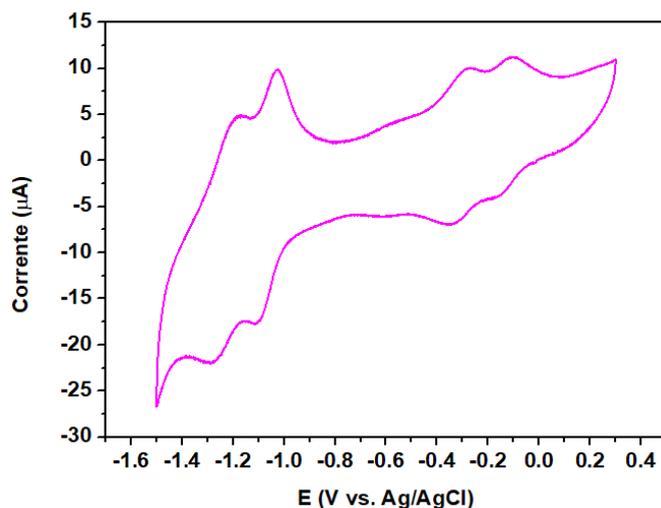


Figura 21. Voltametria cíclica do complexo *cis*-[Ru(phen)₂(pPDIp)](PF₆)₂ em DMSO.

Os resultados para todos os processos de redução observado estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Potenciais de redução para as componentes do complexo em DMSO.

	PDI/PDI⁻	PDI⁻/PDI²⁻	Phen/Phen⁻
Ru(II)(phen) ₂ (PDI) (V)	-0,25	-0,42	-1,20/1,37
E _{1/2} (V)	-0,215	-0,38	-1,165/-1,315

4.1.6. Potencial do Estado Excitado

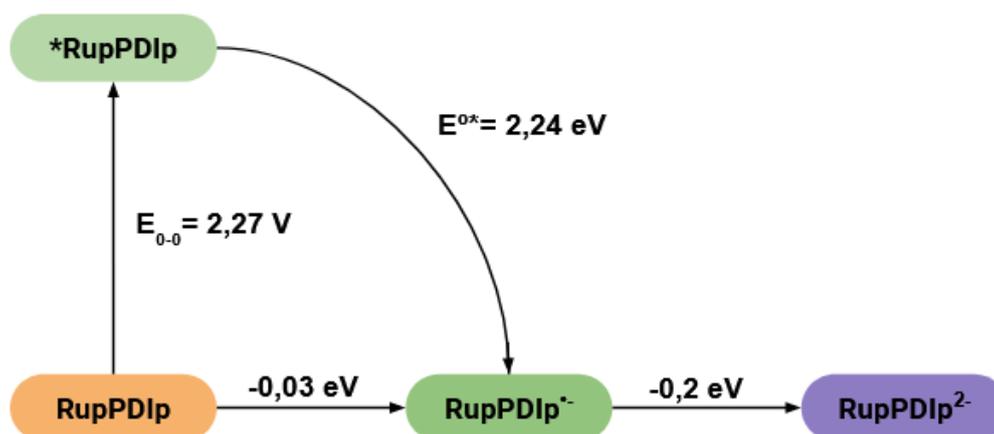
Se uma molécula recebe energia suficiente, então passará do estado fundamental S₀ para um estado de maior energia S₁ e de lá pode decair de diversas formas. Porém, se a energia for muito grande o elétron não se acomodará nos níveis mais energéticos sendo ejetado da molécula e, portanto, será oxidada.⁴⁷

Sabendo que a o potencial de oxidação é a energia necessária para retirar o elétron da molécula e a energia da transição 0-0 (E₀₋₀) é a energia entre S₀ e S₁,

podemos determinar o potencial do estado excitado (E^{0*}). Isto é, a energia necessária partindo de S_1 para que o elétron seja ejetado pode ser determinada pela equação 12.

$$E^{0*}(\text{pPDIp/pPDIp}) = E^0(\text{pPDIp/pPDIp}) + E_{0-0} \quad (12)$$

Com $E_{0-0} = 2.27 \text{ V}$, o complexo apresenta, em relação ao eletrodo de hidrogênio, um potencial do estado excitado $E^{0*}(\text{pPDIp/pPDIp}^*) = 2.24 \text{ V}$. Os resultados dos cálculos para cada processo estão no Esquema III.



Esquema 3. Valores de potencial para o complexo $\text{cis-}[Ru(\text{phen})_2(\text{pPDIp})](\text{PF}_6)_2$ em DMSO.

4.2. Testes de Inativação Fotodinâmica em Fungos

4.2.1 Curva de Crescimento - *Sporothrix brasiliensis*

O crescimento do fungo em suas duas formas foi monitorado de modo a determinar o melhor dia de cultivo e coleta das colônias, além de verificar diferença nos crescimentos da forma micelial e da forma leveduriforme. O melhor dia de coleta foi determinado no ponto em que a cultura de microrganismos atinge uma faixa de $10^6 - 10^7$ unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e de acordo com a Figura 22 é em torno do dia 7 para a forma micelial e o dia 9 para a forma leveduriforme (Figura 23).

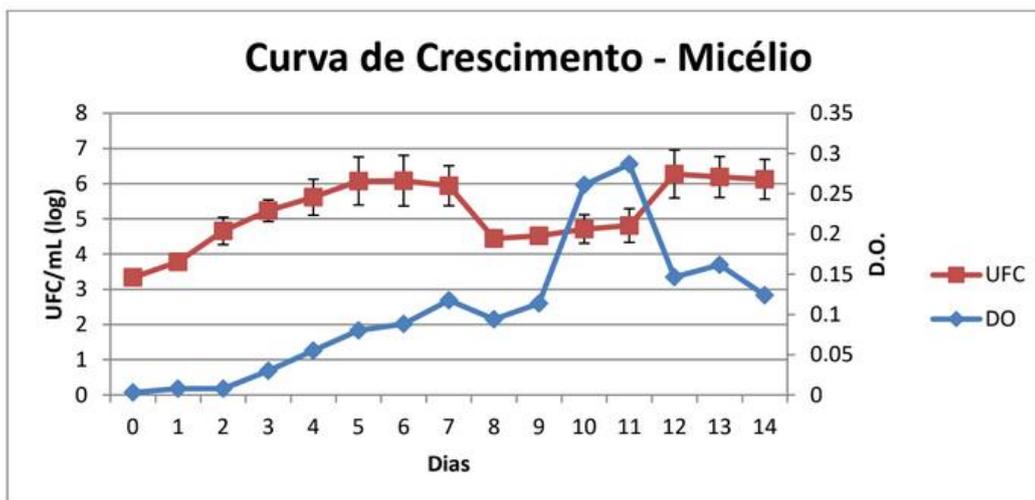


Figura 22. Curva de crescimento da forma micelial (pH 4,5 à 25° C) do fungo *Sporothrix brasiliensis*.

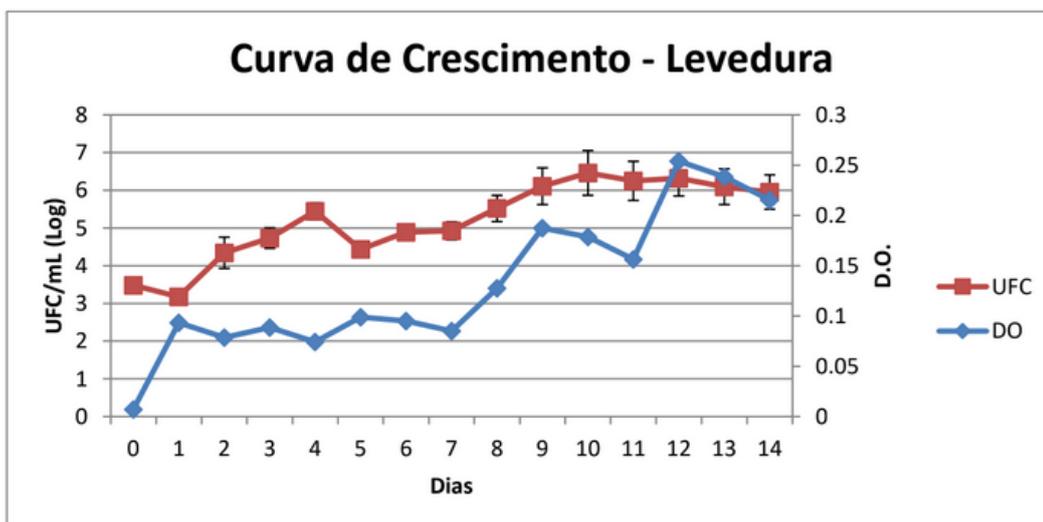


Figura 23. Curva de crescimento da forma leveduriforme (pH 7,8 à 37° C) do fungo *Sporothrix brasiliensis*.

4.2.2. Determinação do intervalo Droga-Luz

A determinação do melhor intervalo droga-luz, ou tempo de incubação, é definido como o tempo mínimo para acumulação do fotossensibilizador na célula-alvo. O complexo RupPDIp apresenta intensa emissão em 600 nm quando

irradiado em 450 nm, o que permite facilmente o mapeamento dessa molécula em sistemas biológicos, já que não está na mesma região da autofluorescência de algumas biomoléculas. A autofluorescência é a resposta gerada pela excitação de moléculas endógenas, como alguns resíduos de aminoácidos, porfirinas e NADH. Dito isso, o complexo fotossensibilizador foi testado em diversos tempos de incubação junto à forma micelial do fungo *S. brasiliensis*.⁴⁹

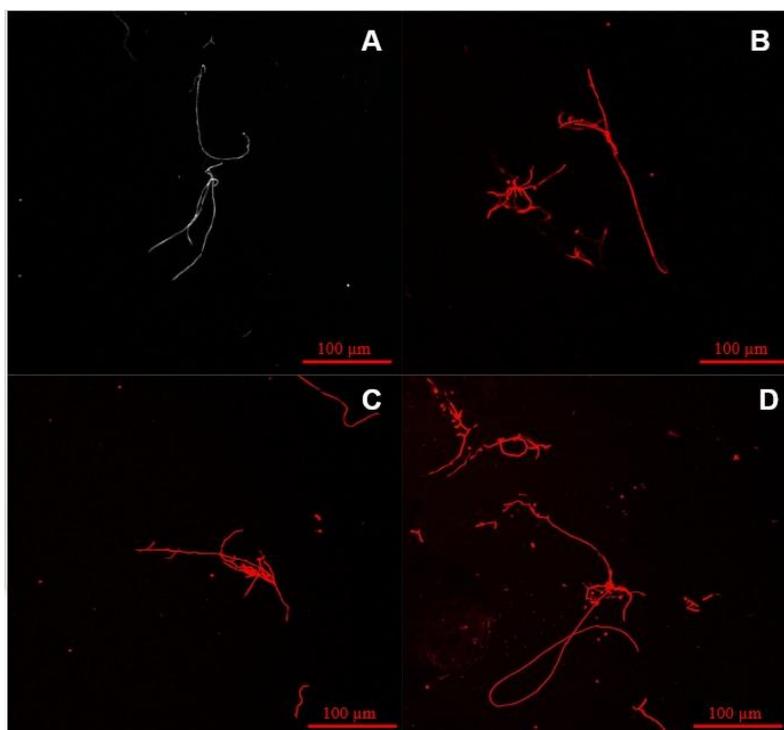


Figura 24. Imagens de microscopia confocal do fungo *Sporothrix brasiliensis* na sua forma micelial na presença de RupPDlp com tempos de incubação de (A) 0 minutos, (B) 10 minutos, (C) 20 minutos e (D) 60 minutos.

Nas imagens de microscopia confocal por fluorescência (Figura 24) é possível notar formas finas e alongadas conhecidas como hifas, responsáveis pela estrutura e sustentação dos fungos.⁵⁰ E uma vez que não possuem fluoróforos exógenos, o Controle é uma imagem de transmissão do fungo, mas na presença do complexo de Ru(II) a fluorescência é mostrada em vermelho, nos tempos de incubação de 10, 20 e 60 minutos. Na presença do fotossensibilizador é possível observar uma forte emissão proveniente das estruturas características do fungo, indicando uma interação entre eles e mostrando que o complexo pode estar inserido ou aderido na parede celular do microrganismo. Essa interação é importante por alguns motivos, começo dizendo que o tempo de vida do oxigênio

singleto e das demais espécies citotóxicas é curto possuem baixa difusão em solução, por isso a proximidade entre as espécies é necessário para danos citotóxicos significativos.⁵¹ Essa interação vai depender da especificidade do microrganismo pelo fotossensibilizador e pode ditar o tipo de morte causada nas células, por exemplo, se a molécula fotoativável estiver aderido na membrana celular, então os danos citotóxicos destruirão a estrutura das células, provocando uma morte não-programada, ou necrose. Se a molécula fotoativável penetrar a membrana e se ligar com componentes celulares (mitocôndria, DNA, RNA, lipossomos, etc.) os danos citotóxicos prejudicarão o funcionamento da célula e essa se programará para a morte, através de um processo de apoptose.⁵²

Enfim, o tempo de incubação definido foi de 20 minutos, uma opção viável para experimentos *in vitro* e possíveis aplicações *in vivo* e *in clínico*. O tempo definido mostra uma intensa emissão do complexo e que este ainda está aderido ou inserido no microrganismo. Em tempos menores, por exemplo 10 minutos, é possível notar partes do microrganismo sem fluorescência e, portanto, com baixo acúmulo de fotossensibilizador. Em tempos maiores, é possível notar certa fluorescência partindo do meio, o que pode indicar uma difusão do fotossensibilizador para longe ou fora do microrganismo.

Já existe na literatura protocolos para terapia fotodinâmica antimicrobiana em *Candida albicans* onde são usados 20 minutos de incubação para outros fotossensibilizadores e por modo de comparação, assim como na *Sporothrix*, esse foi o tempo utilizado para os ensaios com *C. albicans*.⁵³

4.2.3. Inativação Fotodinâmica *in vitro* - *Sporothrix brasiliensis*

A eficiência do complexo RupPDIp foi avaliada contra *Sporothrix brasiliensis* na forma micelial e na forma leveduriforme, para isso, utilizou-se dois sistemas de luzes que compreendem a absorção da molécula fotossensibilizadora, em 450 nm (luz azul) e em 525 nm (luz verde). A escala logarítmica obtida através da manipulação dos dados representa a quantidade de microrganismo viáveis ao crescimento, ou seja, que possuem a capacidade de crescer e se multiplicar, dessa

forma o Grupo Controle foi usado como referência para análise do efeito antifúngico, comparando as unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

O Controle irradiado (microrganismo + luz) para a luz em 450 nm com dose total de 36 J/cm² não mostrou redução na contagem das colônias, indicando nenhum efeito térmico ou de fotoinativação sobre o fungo em ambas as formas.

O efeito citotóxico do complexo no escuro pode ser observado nos grupos Controle FS (microrganismo + fotossensibilizador), apresentando redução de 2 log₁₀ em concentração de RupPDlp acima de 5.0 µM para as duas formas do fungo, isso mostra um leve efeito fungicida e que depende da concentração, já que concentrações menores que 5.0 µM não apresentou reduções.

Embora haja esse efeito citotóxico em altas concentrações, os grupos de TFD (microrganismo + fotossensibilizador + luz) mostram uma redução total nas colônias do fungo quando irradiado em 450 nm (luz azul) com dose de 36 J/cm².

A forma micelial apresenta uma redução de 6 log₁₀ em concentrações maiores que 10.0 µM e a forma leveduriforme também apresenta redução de 6 log₁₀, mas com concentrações maiores que 5.0 µM. Os resultados em triplicata foram submetidos a uma análise de variância e as reduções significativas ($p < 0.05$) estão sinalizadas (*) e apresentadas na figura. Um nível de significância de 0.05 mostra que a chance de erro em se afirmar uma diferença na contagem das colônias é de 5%. E um valor- $p < 0.05$ indica um erro menor que 5% e que se pode rejeitar a hipótese de que as populações analisadas sejam iguais, em outras palavras, mostra que existe uma diferença significativa nas colônias dos grupos sinalizados com asterisco na Figura 25.

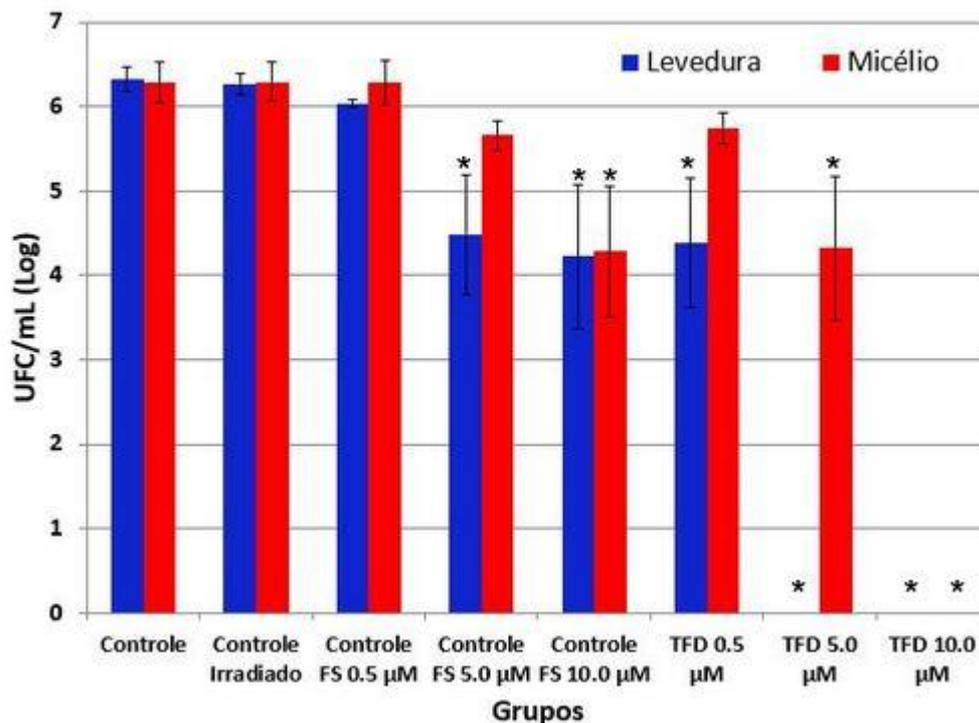


Figura 25. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em *Sporothrix brasiliensis*, na forma micelial (vermelho) e leveduriforme (azul) com dose de 36 J/cm² em 450 nm. *Reduções significativas no crescimento (valor-p < 0.05)

Fungos do clado patogênico *Sporothrix* possuem a produção de melanina como fator de virulência, conferindo a essas espécies resistência à antifúngicos, temperatura e oxidação por metais, além de possuir alta absorção na região próxima ao UV podendo competir com a absorção do fotossensibilizador e diminuindo a eficiência da terapia fotodinâmica antimicrobiana.⁵⁴ Por isso, de forma a melhorar eficiência da técnica e a penetração nos tecidos, as duas formas do fungo *S. brasiliensis* foram submetidas à irradiação em 525 nm (luz verde), região de absorção do ligante perileno.

Quando irradiado em 525 nm e entregando uma dose de 25.2 J/cm² as concentrações para total inativação do fungo foram menores que as usadas para 450 nm, mostrando uma maior eficiência nesse comprimento de onda e com uma concentração de 0.5 µM ambas as formas foram reduzidas a zero, ou seja, apresentaram redução de 6 log₁₀ em relação ao grupo Controle, apresentados na Figura 26.

A melhor eficiência do complexo nesse comprimento de onda pode ter

algumas razões, a alta absorção do fotossensibilizador nessa região, levando a formação de espécies reativas de oxigênio pela ativação da transição MLCT (metal-ligand charge transfer) e ativação do anel perileno. Além disso, o comprimento de onda utilizado está numa região fora da absorção de diversas biomoléculas comparado à irradiação na região azul, evitando competições e aumentando a absorção de luz pelo fotossensibilizador, melhorando significativamente os efeitos antifúngicos do complexo RupPDIp.¹⁴

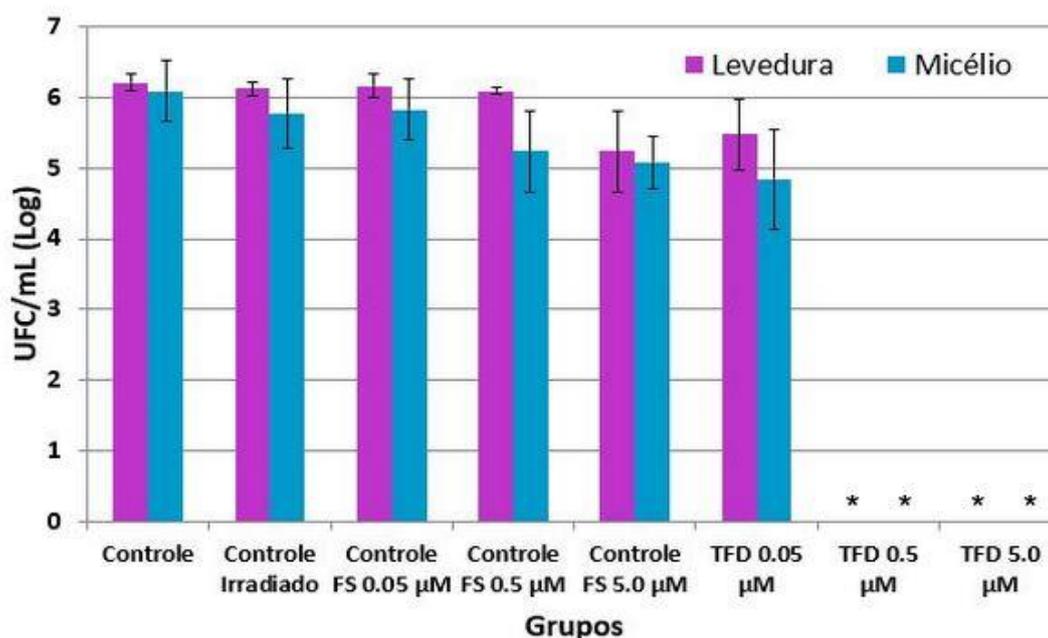


Figura 26. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em *Sporothrix brasiliensis*, na forma micelial (azul) e leveduriforme (roxo) com dose de 25.2 J/cm² em 525 nm. *Reduções significativas no crescimento (valor-p < 0.05)

A terapia fotodinâmica tem se mostrado uma solução promissora para os efeitos adversos causados pelos tratamentos convencionais. Estudos têm demonstrado que o azul de metileno (0,5-2 mg/mL) é o fotossensibilizador mais utilizado, com doses leves entre 28 e 40 J/cm², e apesar dos testes *in vitro* terem mostrado reduções significativas de 4 log₁₀ em colônias de *Sporothrix* de diferentes cepas, eles não alcançaram a inativação total.^{55,56,57,58} Diferente do observado para o complexo RupPDIp, que reduz completamente as colônias do fungo em concentrações mil vezes menor do que as encontradas na literatura para os compostos orgânicos, mostrando que é um bom candidato a fotossensibilizador em terapia fotodinâmica antimicrobiana.

4.2.4. Inativação Fotodinâmica *in vitro* - *Candida albicans*

Os ensaios de TFD com *Candida albicans* em sua forma leveduriforme foram testados com os mesmos comprimentos de onda, em 450 nm e 525 nm.

Para esse fungo o comportamento foi semelhante ao observado para a *Sporothrix*, um efeito fungicida em concentrações maiores que 5.0 μM do complexo reduzem 2 \log_{10} comparado ao grupo Controle.

Porém os efeitos da terapia fotodinâmica foram ainda mais satisfatórios frente a *Candida albicans*, sob irradiação em 450 nm com dose de 36 J/cm^2 o fotossensibilizador de Ru(II) mostra completa redução das colônias com concentrações a partir de 0.5 μM

Com a fonte de irradiação em 525 nm, uma redução total das colônias de *C. albicans* é observado em concentração acima de 0.05 μM na Figura 27.

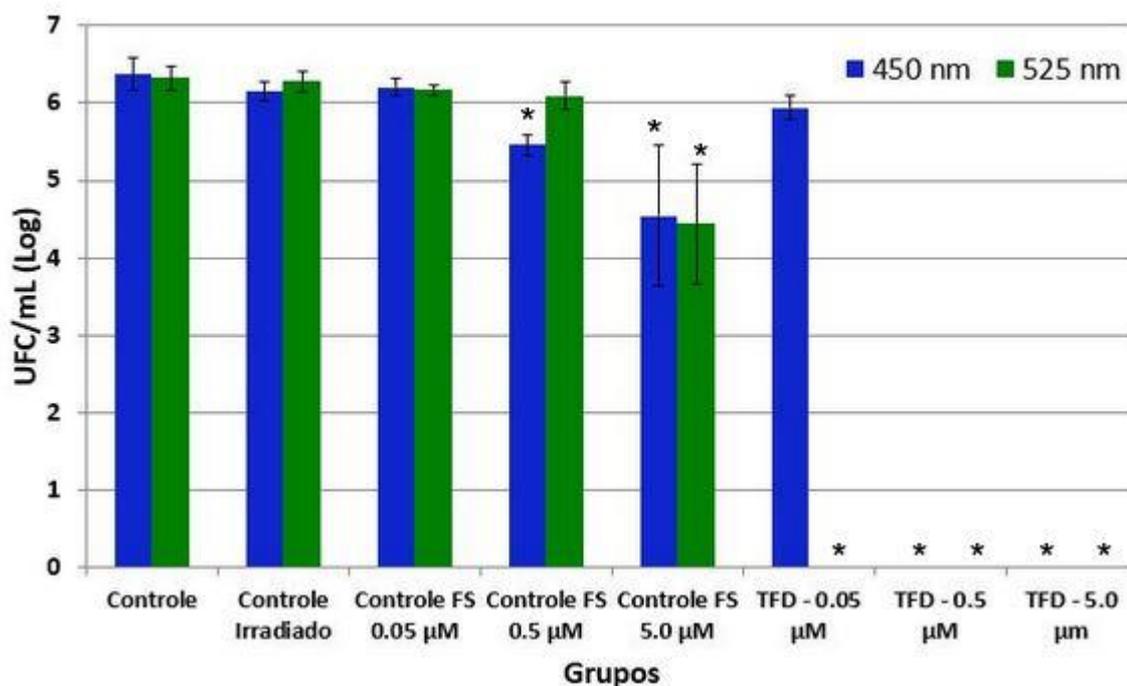


Figura 27. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana em *Candida albicans*, com irradiação em 450 nm (azul) e dose de 36 J/cm^2 e irradiação em 525 nm (verde) e dose de 25.2 J/cm^2 . *Reduções significativas no crescimento (valor- $p < 0.05$)

Neste caso, o complexo de Ru(II) se mostrou um melhor fotossensibilizador contra *Candida albicans*, precisando de uma concentração menor para reduzir as colônia a zero. Tal fato pode ser atribuído à baixa produção de melanina pelo fungo, o que o deixa mais suscetível a danos fotoinduzidos.⁵⁹ Uma possibilidade a ser investigada é a especificidade do complexo por essas espécies em relação a *Sporothrix*, uma vez que as interações com a membrana podem ser diferentes.

Diferente da *Sporothrix brasiliensis*, diversos trabalhos relatam o uso de fotossensibilizadores para fotoinativação in vitro de *Candida albicans*, por exemplo, Souza et al. testou os efeitos antifúngicos do azul de metileno, azul de toluidina e verde de malaquita.⁶⁰ Irradiando em 660 nm, com dose de 39 J/cm² ele obteve uma redução significativa de 3 log₁₀ nas colônias de *Candida albicans* utilizando uma concentração de 0.1 mg/mL para esses fotossensibilizadores.⁶⁰ Outro fotossensibilizador orgânico muito utilizado é a curcumina, que consegue eliminar completamente as colônias do fungo com uma concentração de 7.4 mg/mL, entregando uma dose de 37.5 J/cm² em 455 nm. Porém, depois de entregar uma dose de 0.4 J/cm², quase 70% das moléculas de curcumina sofrem fotobranqueamento, ou seja, perdem suas propriedades fotossensibilizadoras.⁶¹

Quando tratamos de infecções por microrganismo precisamos nos dar conta de um problema causado pelo mau hábito da população: o interrompimentos das terapias convencionais pode levar à perpetuação da doença, criando linhagens cada vez mais resistentes aos fármacos comerciais. Outro fator que atua na perpetuação da esporotricose, por exemplo, é o abandono de animais infectados, que contaminam outros animais na natureza e disseminam a doença em diversos espaços. Por isso, a terapia fotodinâmica antimicrobiana pode interromper esse ciclo, diminuindo o tempo da terapia, evitando desistências e atuando em estágios iniciais da doença.⁶²

Por fim, é importante salientar que a terapia fotodinâmica tem a vantagem de tratar diversas feridas ao mesmo tempo e para isso é comum o uso de luzes com baixo comprimento de onda,⁶³ porém, lesões mais profundas necessitam de luzes que possuem maior penetração na pele, corroborando o fato de o complexo de Ru(II) ser um bom fotossensibilizador, pois possui ótimos resultados em comprimentos de onda próximos à janela terapêutica, permitindo o tratamento de

lesões mais profundas na pele sem efeitos indesejados.

4.3. Avaliação da citotoxicidade e fotocitotoxicidade em células de melanoma e melanócito humano.

A eficiência do complexo RuPDIp como fotossensibilizador em células de câncer melanoma e células saudáveis de melanócitos humanos foi testada em diferentes concentrações e com irradiação em 415 nm e os grupos na ausência e na presença de luz foram comparados ao controle (100% de viabilidade celular).

Ambas as linhagens quando expostas ao complexo na ausência de irradiação não apresentaram reduções bruscas na viabilidade celular, reduzindo aproximadamente 20% da viabilidade na maior concentração utilizada, em outras palavras, o complexo de Ru(II) apresenta baixa citotoxicidade frente à essas células quando usado em concentrações menores que 100 μM (Figura 28).

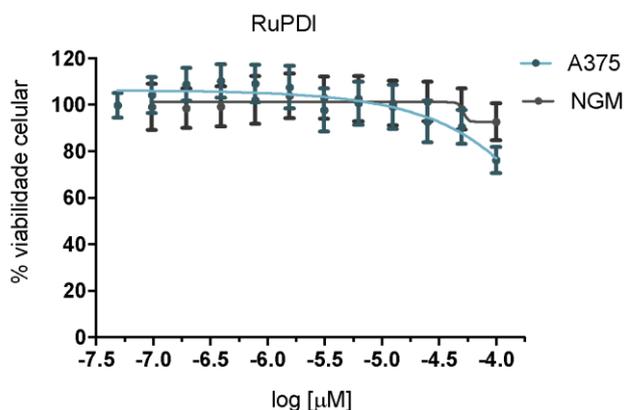


Figura 28. Citotoxicidade do complexo em células de melanoma (A375) e melanócito (NGM) humanos, na ausência de irradiação.

Porém, ao receber uma dose de 2.12 J/cm² em 415 nm, o complexo apresentou fotocitotoxicidade frente à linhagem NGM (melanócito) e A375 (melanoma), exibindo valores de IC₅₀ = 10 μM e IC₅₀ = 1.3 μM , respectivamente. Isto é, o complexo consegue reduzir 50% da viabilidade celular das células A375 com 1.3 μM , concentração que apresenta redução de aproximadamente 20% da viabilidade das células NGM,

mostrando que as células de melanoma humano são mais suscetíveis à terapia fotodinâmica do que as células saudáveis de melanócito (Figura 29).

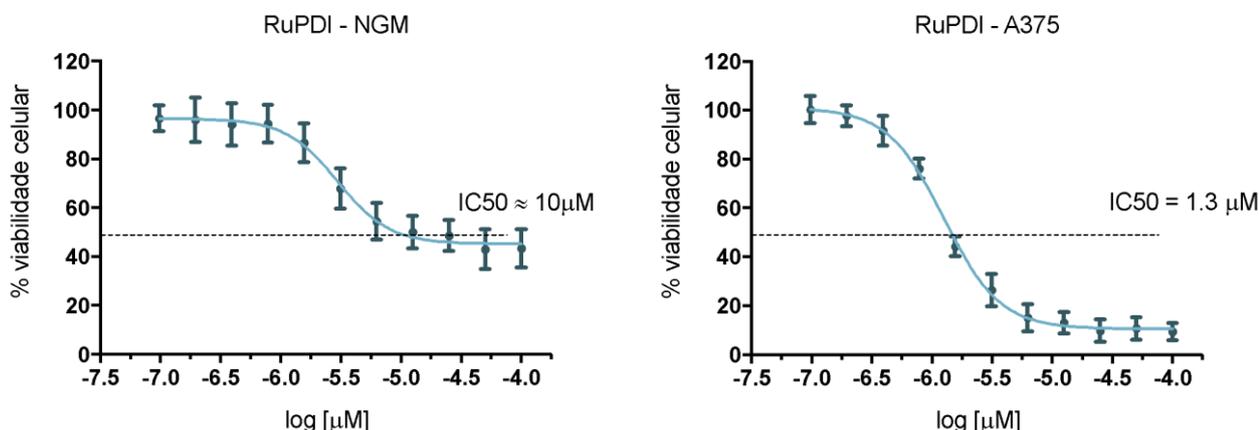


Figura 29. Fotocitotoxicidade do complexo em células de melanoma (A375) e melanócito (NGM) humanos, com dose de 2.12 J/cm² em 415 nm.

Por fim, testou-se uma dose de luz mais baixa, entregando 1.76 J/cm² em 415 nm era de se esperar que maiores concentrações fossem necessárias para alcançar uma redução de 50% na viabilidade celular de ambas as linhagens. De fato, a figura 30 mostra que agora para as células de melanócito (NGM) o IC₅₀ = 13 μM e para as células de melanoma, temos um IC₅₀ = 3.2 μM.

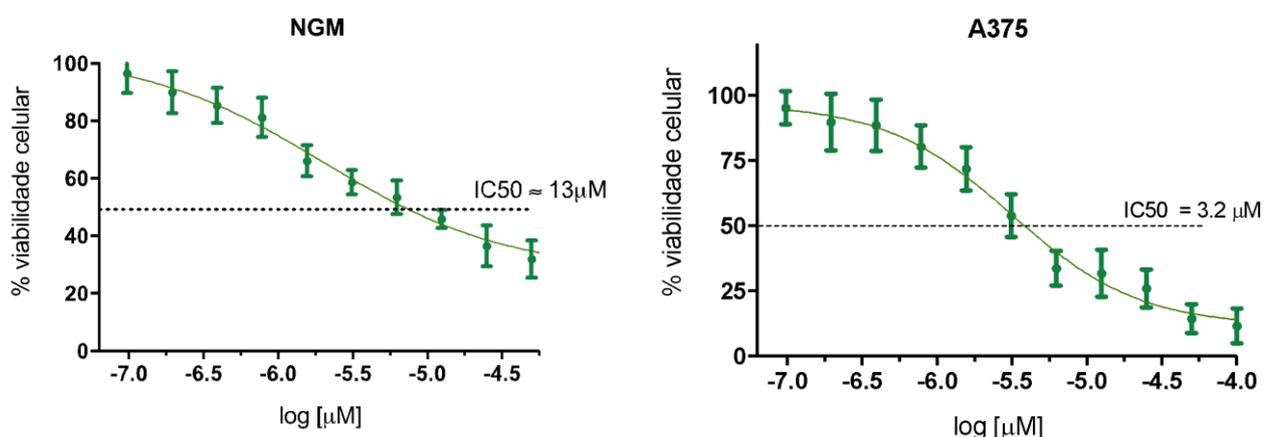


Figura 30. Fotocitotoxicidade do complexo em células de melanoma (A375) e melanócito (NGM) humanos, com dose de 1.76 J/cm² em 415 nm

Estudos recentes mostram o uso de diversos fotossensibilizadores contra células de melanoma humano (A375), com irradiações em comprimentos de onda dentro da janela terapêutica (~660 nm). O 5-ALA (Levulan®) inibe 90% do crescimento dessas células com concentração de 0.5 μM e dose de 0.58 J/cm^2 .⁶⁴

O uso de metaloporfirinas e metaloftalocianinas também mostra resultados interessantes, por exemplo, uma porfirina de zinco (ZnPcS_4) com dose de 10 J/cm^2 apresenta $\text{IC}_{50} = 2.5 \mu\text{M}$ contra a linhagem A375, bem como uma Ru(II) -ftalocianina que com apenas 1.0 μM e dose de 6 J/cm^2 reduz 90% na sua viabilidade celular.^{65,66}

Os resultados obtidos para o complexo RupPDIp mostram um alinhamento com a literatura, possui baixo IC_{50} frente às células de melanoma humano, porém em comprimentos de onda mais baixos. Por isso, é interessante se fazer testes com irradiação na região de absorção do anel perileno (> 500 nm).

A continuação dos parâmetros de TFD para as células de melanócito e melanoma foram interrompidos pela pandemia do novo Covid-19.

5. Considerações Finais

A partir dos experimentos realizados é possível concluir que o solvente desempenha papel fundamental sobre a estabilização do estado de separação de cargas que leva à formação da espécie ânion radicalar do ligante pPDIp no estado excitado.

O complexo de RupPDIp também se mostra um possível agente oxidante em reações fotoinduzidas, apresentando subseqüentes reduções na presença de substratos orgânicos.

Além disso, durante os testes de inativação fotodinâmica inativou completamente as colônias de *Sporothrix brasiliensis* com doses de luz e concentrações de fotossensibilizador mais baixas do que as já reportadas pela literatura. Assim como na *Candida albicans*, mais suscetível à TFD foi completamente inativada com 0.05 μM do nosso complexo em comprimentos de onda menos energéticos (>500 nm).

Atua muito bem em comprimentos de onda próximos à janela terapêutica, o que possibilita o tratamento de lesões mais profundas ou volumosas.

Por fim, pode ser um promissor agente no combate ao câncer de pele melanoma, inativando 50% das células de melanoma humano com 1.3 μM de RupPDlp e dose de 2.12 J/cm², sem provocar grandes danos à células de melanócitos.

6. Referências

- [1] JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Metal-based drugs*, v. 2008, 2008.
- [2] BALZANI, V.; CERONI, P.; JURIS, Alberto. *Photochemistry and photophysics: concepts, research, applications*. John Wiley & Sons, 2014.
- [3] KAUR, N.. Photochemical reactions as key steps in five-membered N-heterocycle synthesis. *Synthetic Communications*, v. 48, n. 11, p. 1259-1284, 2018.
- [4] CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N. & HAMBLIN, M. R. "Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization". *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 1 (4): 279-93, 2004.
- [5] ZOU, Z. et al. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy. *Apoptosis*, v. 22, n. 11, p. 1321-1335, 2017.
- [6] RIBEIRO, J. N. et al. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. *Eclética Química*, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2007.
- [7] RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singleto: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.
- [8] AGAZZI, M. L. et al. BODIPYs in antitumoral and antimicrobial photodynamic therapy: An integrating review. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, v. 40, p. 21-48, 2019.
- [9] DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. *JNCI: Journal of the national cancer institute*, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.

- [10] KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, p. 1098-1107, 2018.
- [11] CARRERA, E. T. et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser physics*, v. 26, n. 12, p. 123001, 2016
- [12] ION, R.M.. Photodynamic therapy (PDT): a photochemical concept with medical applications. *Rev. Roum. Chim*, v. 52, n. 12, p. 1093-1102, 2007.
- [13] ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, Michael R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.
- [14] SILVA, D. E. S. Complexos de metais de transição multifuncionais para o tratamento e diagnóstico da doença de Alzheimer. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química – UFSCar, 2016. Dissertação de mestrado, 103 p.
- [15] AGOSTINIS, Patrizia et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.
- [16] AZIZI, Arash et al. Comparison of the effect of photodynamic therapy with curcumin and methylene Blue on streptococcus mutans bacterial colonies. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 27, p. 203-209, 2019.
- [17] PANHÓCA, Vitor Hugo et al. Oral decontamination of orthodontic patients using photodynamic therapy mediated by blue-light irradiation and curcumin associated with sodium dodecyl sulfate. *Photomedicine and laser surgery*, v. 34, n. 9, p. 411-417, 2016.
- [18] MCFARLAND, Sherri A. et al. Metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: the future of multimodal oncology?. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 56, p. 23-27, 2020.
- [19] FREI, Angelo et al. Synthesis, characterization, and biological evaluation of new Ru (II) polypyridyl photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, v. 57, n. 17, p. 7280-7292, 2014.
- [20] HE, Lizhen et al. Cancer-Targeted Monodisperse Mesoporous Silica Nanoparticles as Carrier of Ruthenium Polypyridyl Complexes to Enhance Theranostic Effects. *Advanced Functional Materials*, v. 24, n. 19, p. 2754-2763, 2014.
- [21] SALLA, Cristian Andrey Momoli et al. Complexos de rutênio aplicados em OLEDs: síntese e caracterização. Dissertação de Mestrado, UFSC, 2015

- [22] SCHATZSCHNEIDER, Ulrich. Photoactivated biological activity of transition-metal complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 2010, n. 10, p. 1451-1467, 2010.
- [23] de Campos, I. A. S., dos Santos, E. R., Sellani, T. A., Herbozo, C. C., Rodrigues, E. G., Roveda Jr, A. C., ... & Carlos, R. M. (2018). Influence of the Medium on the Photochemical and Photophysical Properties of [Ru (phen) ₂ (pPDIp)] ²⁺. *ChemPhotoChem*, 2(8), 757-764.
- [24] Santos, E. R. D., Pina, J., Venâncio, T., Serpa, C., Martinho, J. M., & Carlos, R. M. (2016). Photoinduced energy and electron-transfer reactions by polypyridine ruthenium (II) complexes containing a derivatized perylene diimide. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(40), 22831-22843.
- [25] ROBERTSON, Claudine A.; EVANS, D. Hawkins; ABRAHAMSE, Heidi. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.
- [26] PEREZ-LAGUNA, Vanesa et al. A combination of photodynamic therapy and antimicrobial compounds to treat skin and mucosal infections: a systematic review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, v. 18, n. 5, p. 1020-1029, 2019.
- [27] RODRIGUES, Anderson Messias et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*, p. 1-30, 2020.
- [28] BARROS, Mônica Bastos de Lima et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, n. 4, p. 529-535, 2004.
- [29] GREMIÃO, Isabella DF et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Medical mycology*, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2015.
- [30] HOWARD, Dexter H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. *Journal of bacteriology*, v. 81, n. 3, p. 464, 1961.
- [31] ALMEIDA-PAES, Rodrigo et al. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One*, v. 11, n. 3, p. e0152796, 2016.
- [32] MOYES, David L.; NAGLIK, Julian R. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2011, 2011.

- [33] COLOMBO, Arnaldo L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of clinical microbiology*, v. 44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.
- [34] Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 80, n. 4, p. 835-851, 2019.
- [35] COCUAUD, Christophe et al. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 3, p. 507-512, 2005.
- [36] VETTORATO, Rodrigo et al. Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed in vitro and in vivo: case report. *Medical mycology case reports*, v. 19, p. 18-20, 2018.
- [37] MARIMON, Rita et al. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, n. 2, p. 732-734, 2008.
- [38] TUCCORI, Marco et al. Fatal hepatitis after long-term pulse itraconazole treatment for onychomycosis. *Annals of Pharmacotherapy*, v. 42, n. 7-8, p. 1112-1117, 2008.
- [39] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso: 10/11/2020
- [40] APALLA, Z.; NASHAN, D.; WELLER, R. B. & CASTELLSAGUÉ, X. "Skin cancer: epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches". *Dermatol. Ther. (Heidelb)*, 7, 5–19, 2017.
- [41] BOWDEN, G. T. "Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signaling". *Nat Rev Cancer*, 4 (1): 23-35, 2004.
- [42] GALO, André Luiz; COLOMBO, Márcio Francisco. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 488-492, 2009.
- [43] DOVIGO, Livia Nordi et al. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*, v. 54, n. 2, p. 123-130, 2011.

- [44] MOSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cyto-toxicity assays". *J. Immun. Meth.*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- [45] BUNCEL, Erwin; RAJAGOPAL, Srinivasan. Solvatochromism and solvent polarity scales. *Accounts of Chemical Research*, v. 23, n. 7, p. 226-231, 1990.
- [46] SPANO, F. C. "The spectral signatures of Frenkel polarons in H- and Jaggregates". *Acc. Chem. Res.*, 43 (3): 429-39, 2010.
- [47] TURRO, Nicholas J. *Modern molecular photochemistry*. University science books, 1991.
- [48] MOREIRA, Mariete B. et al. Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. *Química Nova*, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.
- [49] HUANG, Cheng-Yen; HSIEH, Ming-Ching; ZHOU, Qinwei. Application of tryptophan fluorescence bandwidth-maximum plot in analysis of monoclonal antibody structure. *AAPS PharmSciTech*, v. 18, n. 3, p. 838-845, 2017.
- [50] TORTORA, Gerard J. et al. *Microbiology: an introduction*. San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 2004.
- [51] MISBA, Lama; ZAIDI, Sahar; KHAN, Asad U. Efficacy of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilm: Role of singlet oxygen. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 183, p. 16-21, 2018.
- [52] CIOTTI, Sonia et al. GSK3 β is a key regulator of the ROS-dependent necrotic death induced by the quinone DMNQ. *Cell death & disease*, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2020.
- [53] DOVIGO, Livia N. et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers in surgery and medicine*, v. 43, n. 9, p. 927-934, 2011.
- [54] SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.
- [55] García-Malinis AJ, Milagro Beamonte A, Torres Sopena L, García-Callen O, Puertolas-Villacampa P, Gilaberte Y. Cutaneous sporotrichosis treated with methylene blue-daylight photodynamic therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018

- [56] LI, Jinran et al. Fungicidal efficacy of photodynamic therapy using methylene blue against *Sporothrix globosa* in vivo and in vivo. *European Journal of Dermatology*, v. 29, n. 2, p. 160-166, 2019.
- [57] GILABERTE, Yolanda et al. Cutaneous sporotrichosis treated with photodynamic therapy: an in vitro and in vivo study. *Photomedicine and laser surgery*, v. 32, n. 1, p. 54-57, 2014.
- [58] NUNES MARIO, Débora Alves et al. In vitro photodynamic inactivation of *Sporothrix schenckii* complex species. *Medical mycology*, v. 52, n. 7, p. 770-773, 2014
- [59] CASADEVAL, Arturo et al. Melanin, radiation, and energy transduction in fungi. *The Fungal Kingdom*, p. 509-514, 2017.
- [60] SOUZA, Rodrigo C. et al. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers in medical science*, v. 25, n. 3, p. 385-389, 2010.
- [61] DOVIGO, Livia N. et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochemistry and photobiology*, v. 87, n. 4, p. 895-903, 2011
- [62] NAKASU, Ceres Cristina Tempel et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. *Brazilian journal of microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 2020.
- [63] KIM, Miri; JUNG, Haw Young; PARK, Hyun Jeong. Topical PDT in the treatment of benign skin diseases: principles and new applications. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 10, p. 23259-23278, 2015.
- [64] CAI, Jingjing et al. 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy inhibits survival activity and promotes apoptosis of A375 and A431 cells. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 21, p. 257-262, 2018.
- [65] NAIDOO, Channay; KRUGER, Cherie Ann; ABRAHAMSE, Heidi. Targeted photodynamic therapy treatment of in vitro A375 metastatic melanoma cells. *Oncotarget*, v. 10, n. 58, p. 6079, 2019.
- [66] NEGRI, Laísa Bonafim et al. Photobiomodulation combined with photodynamic therapy using ruthenium phthalocyanine complexes in A375 melanoma cells: Effects of nitric oxide generation and ATP production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 198, p. 111564, 2019.