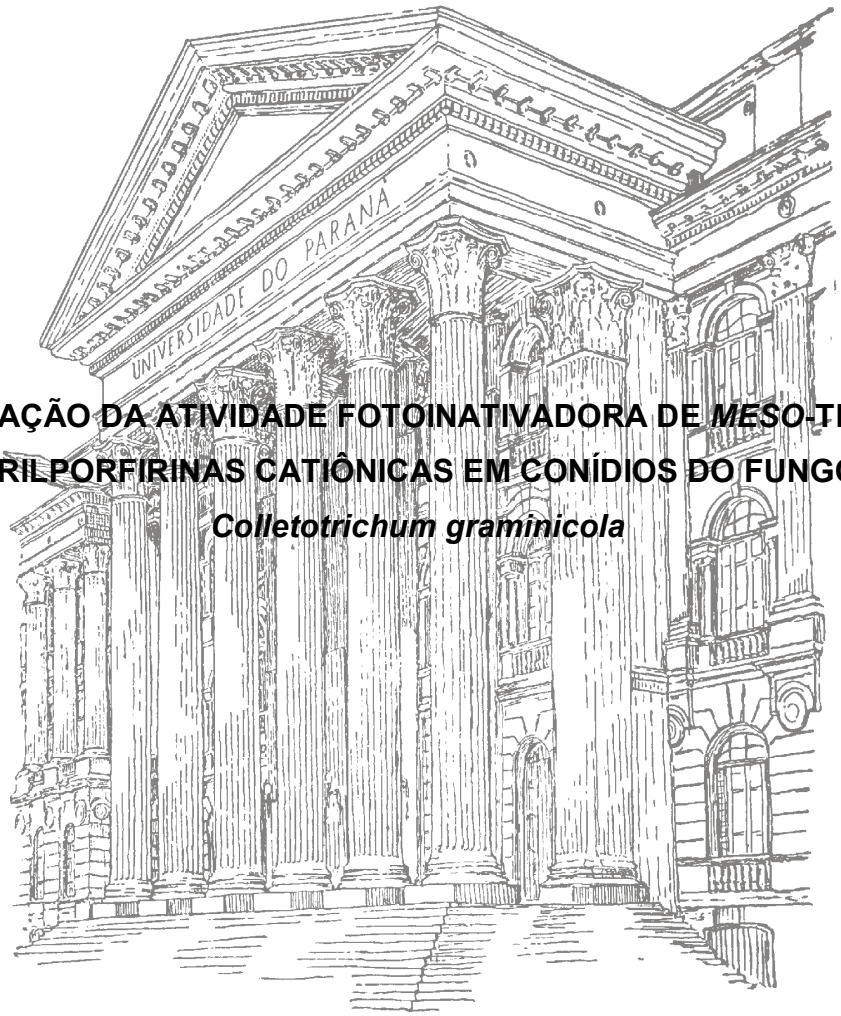
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA CHEVONICA VANDRESEN



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOINATIVADORA DE *MESO*-TETRA-ARILPORFIRINAS CATIÔNICAS EM CONÍDIOS DO FUNGO *Colletotrichum graminicola*

CURITIBA
2013

CAMILA CHEVONICA VANDRESEN

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOINATIVADORA DE *MESO*-TETRA-ARILPORFIRINAS CATIÔNICAS EM CONÍDIOS DO FUNGO *Colletotrichum graminicola*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof[a] Dr[a] Sandra Mara Woranovicz Barreira
Co-orientador: Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves

CURITIBA
2013

Vandresen, Camila Chevonica
Avaliação da atividade fotoinativadora de *meso*-tetra-arilporfirinas catiônicas em conídios do fungo *Colletotrichum graminicola* / Camila Chevonica Vandresen – Curitiba, 2013.
125 f. : il. (algumas color) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira
Coorientador: Professor Dr. Alan Guilherme Gonçalves
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Porfirinas. 2. Síntese química. 3. Inativação fotodinâmica. 4. *Colletotrichum*. I. Barreira, Sandra Mara Woranovicz. II. Gonçalves, Alan Guilherme. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 547.593

TERMO DE APROVAÇÃO

CAMILA CHEVONICA VANDRESEN

Título: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOINATIVADORA DE *MESO*-TETRAARILPORFIRINAS CATIÔNICAS EM CONÍDIOS DO FUNGO *COLLETOTRICHUM GRAMINICOLA***

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Profª. Drª. Sandra Mara Woranovicz Barreira
Orientadora

Profª. Drª. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 22 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e oportunidade de realizar esse trabalho e dar mais um passo em minha vida acadêmica.

Aos meus pais, Roberto e Rozilda e ao meu noivo Ivadir, pelo apoio e compreensão.

Aos meus orientadores. Professora Sandra Barreira, que com tanto carinho me acolheu e me acompanhou incansavelmente com sua infinita compreensão, apoio e amizade em todos os momentos. Ao Professor Alan Gonçalves, pelo incentivo, acompanhamento e ótimas sugestões.

À Embrapa Milho e Sorgo, na pessoa do Dr. Luciano Cota, pelo fornecimento do micro-organismo e treinamento fornecido.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico da UFPR. Á Professora Wanda Abrahão por proporcionar a estrutura para o desenvolvimento da parte microbiológica. Ao Vítor, pela pronta disponibilidade e auxílio com os equipamentos e materiais. Ao professor Fábio Murakami, pela orientação no cultivo e conservação do micro-organismo e em toda a parte microbiológica.

Ao laboratório de Micologia Médica da UEM, especialmente à Professora Terezinha, por contribuir com seu conhecimento e à Flávia, pelo carinho e auxílio na realização dos ensaios de CIM e CFM.

À todo o grupo de pesquisa das porfirinas, sem exceção, Prof.Miguel Noseda; Prof. Diogo Ducatti, Prof. Alexandre Orsato, Stephanie por todo apoio e grandes contribuições.

À Íris, pela amizade, carinho e por ter me ajudado com tanta paciência.

Às queridas companheiras da bioquímica Juliana Dallagnol e Andressa, que muito mais que colegas de trabalho se tornaram grandes amigas. Obrigada pelo companheirismo, amizade, paciência, apoio, incentivo e imenso carinho e por me ajudarem tanto. Ju, obrigada também pela realização da avaliação do MALDI-TOF.

A Juliana Freitas e Geison, pelo apoio, incentivo, carinho, ajuda em inúmeras contagens, disponibilidade, amizade e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação, por todo o apoio, compreensão e a disponibilização de materiais e ferramentas para a conclusão desse trabalho. Ao Departamento de Bioquímica, pelo fornecimento da infraestrutura e equipamentos de RMN e MALDI-TOF. Ao Pronex Carboidratos e Fundação Araucária pelos recursos financeiros para execução do projeto e ao REUNI pelo suporte financeiro.

RESUMO

A inativação fotodinâmica (PDI) consiste em um tipo de intervenção baseado na associação de luz, fotossensibilizador e oxigênio molecular (O_2), que resulta na destruição de um alvo biológico específico. Dentre os fotossensibilizadores empregados na PDI, 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridino-4-il)porfirina (Tetra-Py^+) tem demonstrado ser efetivo na fotoinativação de diversos micro-organismos. *Colletotrichum graminicola* é um fitopatógeno que causa antracnose foliar e do colmo em milho (*Zea mays* L.). *C. graminicola* é altamente resistente em condições ambientais, sendo também resistente a fungicidas comumente empregados na agricultura. Dessa forma, a antracnose tem causado impacto importante nas culturas de milho do Brasil. Além disso, o uso abusivo de fungicidas na cultura do milho representa um problema de saúde pública. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliação da fotoinativação de *C. graminicola* utilizando Tetra-Py +, além de quatro derivados porfirínicos com ambos os grupos N-metil-piridina catiônica *meso*-ligados e grupos fenil *meso*-ligados (Tri-Py^+, Di -*cis*-Py^+, Di-*trans*-Py^+ e Mono-Py^+). Com esse propósito, os experimentos foram realizados empregando suspensões de conídios padronizadas a 10^5 e 10^4 conídios / mL. As concentrações dos fotossensibilizadores foram 5, 10, 15 e 25 μM e o tempo de irradiação máximo foi ajustado para 20 minutos. Além dos ensaios de fotoinativação, três tipos de experimentos controles foram executados simultaneamente: controle claro, branco e controle escuro. A fotoestabilidade das porfirinas e a produção de oxigênio singlete foram determinadas para todos os compostos. Entre as porfirinas avaliadas, apenas o derivado Di-*cis*-Py^+ demonstrou toxicidade no escuro e, assim, não foi utilizado para estudos de PDI. As outras porfirinas evidenciaram propriedades fotoinativadoras em diferentes níveis, que foram relacionadas com o número de cargas e sua distribuição na estrutura da molécula. Estas características estruturais também refletiram na fotoestabilidade e produção de oxigênio singlete. As porfirinas Tri-Py^+ e Di-*trans*-Py^+ demonstraram os melhores resultados, ocorrendo fotoinativação completa na concentração de 5 μM, com um tempo de irradiação de cinco minutos. A porfirina Tetra-Py^+ mostrou uma propriedade fotoinativadora mais branda, para a qual a fotoinativação total foi evidente na concentração de 50 μM, para o mesmo período de cinco minutos irradiação. Por sua vez, a porfirina Mono-Py^+ foi o derivado menos eficaz (25 μM, 20 minutos), inativando totalmente apenas a suspensão de conídios menos concentrada. Como conclusão, a fotoinativação de *C. graminicola* empregando *meso*-tetra-arilporfirinas catiônicas como fotossensibilizadores ocorreu em níveis significativos, demonstrando a possibilidade de utilização desses compostos em associação com a luz solar para inativação do micro-organismo. Esse processo pode contribuir para o controle da antracnose na cultura do milho no Brasil.

Palavras-chave: Porfirinas. Síntese química. Inativação fotodinâmica. *Colletotrichum*.

ABSTRACT

Photodynamic inactivation (PDI) is a type of intervention based on the association of light, photosensitizer and molecular oxygen (O_2), which results in the destruction of a specific biological target. Among the photosensitizers utilized in PDI, 5,10,15,20-tetrakis(*N*-methyl pyridinium-4-yl)porphyrin (Tetra-Py^+) has demonstrated to be effective in the photoinactivation of diverse microorganisms. *Colletotrichum graminicola* is a fungal pathogen that causes leaf and stalk anthracnose in maize (*Zea mays*). *C. graminicola* is highly resistant under environmental conditions, being also resistant to fungicides commonly used in agriculture. In this way, anthracnose has caused an important impact in Brazil's maize crops. In addition, the abusive use of fungicides in maize cultivation represents a public health issue. Thus, the objective of the present work was the evaluation of *C. graminicola* photoinactivation using Tetra-Py^+, plus four porphyrin-derivatives having both *meso*-linked *N*-methyl-pyridine cationic centers and *meso*-linked phenyl groups (Tri-Py^+, Di-*trans*-Py^+, Di-*cis*-Py^+ and Mono-Py^+). For this purpose, experiments were performed with standardized conidial suspensions at 10^5 and 10^4 conidia/mL. The concentrations of the photosensitizers were 5, 10, 15 and 25 μM and the maximum irradiation time was set to 20 minutes. In addition to the photoinactivation assays, three types of control experiments were simultaneously executed: blank, light control and dark control. Porphyrin photo-stability and production of oxygen singlet were also determined for all compounds. Among the porphyrins herein evaluated, only Di-*cis*-Py^+ derivative demonstrated toxicity in the dark and thereby it was not employed for PDI studies. The other porphyrins presented photoinactivating properties at varying levels that were related to the number of charges and their distribution in the molecule structure. These structural features also reflected in the photo-stability and singlet oxygen production. Porphyrins Tri-Py^+ and Di-*trans*-Py^+ demonstrated the best results, giving complete photoinactivation at 5 μM with an irradiation time of five minutes. Porphyrin Tetra-Py^+ showed a milder photoinactivation property, which was complete at 50 μM with the same irradiation time. Porphyrin Mono-Py^+ was the least effective derivative (25 μM, twenty minutes), resulting in total inactivation only for the less concentrated conidial suspension. In conclusion, the photoinactivation of *C.. graminicola* using cationic *meso*-substituted porphyrins occurred in significant levels, demonstrated the possibility of using these compounds in combination with sunlight for inactivation of microorganism. This process may contribute to the control of maize anthracnose qin Brazil.

Key-words: Porphyrins. Chemical synthesis. Photodynamic inactivation. *Colletotrichum*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS CORANTES FENOTIAZÍNICOS UTILIZADOS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES.....23
FIGURA 2 – DIAGRAMA MODIFICADO DE JABLONSKI DEMONSTRANDO OS MECANISMOS DE REAÇÕES ENVOLVIDOS NA PDI.....24
QUADRO 1 – EFEITOS DA PDI EM DIFERENTES MOLÉCULAS CELULARES 25
FIGURA 4 – ESTRUTURA BÁSICA DO MACROCICLO PORFIRÍNICO.....26
FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS PORFIRINAS AVALIADAS POR CORMICK E COLABORADORES.....31
QUADRO 2 – ESPÉCIES PATOGÊNICAS PERTENCENTES AO GÊNERO *Colletotrichum* E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS 32
FIGURA 6 – ESQUEMA DAS FASES DE INFECÇÃO POR ESPÉCIES HEMIBIOTRÓFICAS INTRACELULARES PERTENCENTES GÊNERO *Colletotrichum*.....33
QUADRO 3 – CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS DE *C. graminicola* 34
FIGURA 7 – CONÍDIOS EM FORMA DE FOICE DE *C. graminicola* 35
FIGURA 8 – CONÍDIOS DE *C. graminicola* REVESTIDOS PELA MATRIZ MUCILAGINOSA 36
FIGURA 9 – ASPECTO DE PLANTAS ACOMETIDAS POR ANTRACNOSE FOLIAR E DO COLMO.....38
QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA FAA.....41
QUADRO 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS AVALIADOS 43
FIGURA 10 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS REAGENTES 44
QUADRO 6 – DERIVADOS PORFIRÍNICOS OBTIDOS A PARTIR DA CONDENSAÇÃO ENTRE PIRROL, BENZALDEÍDO E PIRIDINA-4-CARBOXALDEÍDO.....45
FIGURA 11 – ESQUEMA DE IDENTIFICAÇÃO DAS PLACAS PARA REALIZAÇÃO DA PDI.....48
FIGURA 12 – LÂMPADA LUMACARE MODELO LC 122A.....49
FIGURA 13 – ESTRUTURA DA MICROPLACA UTILIZADA PARA OS ENSAIOS DE CIM.....51

FIGURA 14 – ESQUEMA DA PLACA DE PETRI MOLDE DE AGAR SABOURAUD DEXTROSADO 52
FIGURA 15 – ESQUEMA DAS ETAPAS DE SÍNTESE DAS *MESO*-TETRA-ARILPORFIRINAS CATIÔNICAS AVALIADAS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES 53
FIGURA 16 – ESTRUTURA QUÍMICA DA TETRAFENILPORFIRINA (TPP). 54
FIGURA 17 – ESTRUTURA DA PIRIDINA RELACIONANDO AROMATICIDADE E BASICIDADE 54
FIGURA 18 – ESTRUTURA QUÍMICA DA *TETRAQUIS*(4-PIRIDIL)PORFIRINA. 55
QUADRO 7 – RENDIMENTOS PERCENTUAIS OBTIDOS PELOS AUTORES CALCULADOS ATRAVÉS DE QUANTIDADES MOLARES. 55
QUADRO 8 – RENDIMENTOS PERCENTUAIS OBTIDOS PELOS AUTORES CALCULADOS ATRAVÉS DE PROPORÇÃO NO PRECIPITADO CRISTALINO. 55
QUADRO 9 – DERIVADOS PORFIRINICOS SIMÉTRICOS EM SUA FORMA NEUTRA 57
QUADRO 10 – DERIVADOS PORFIRINICOS ASSIMÉTRICOS EM SUA FORMA NEUTRA 58
FIGURA 19 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PORFIRINAS DIPIRIDILADAS E SUAS DIFERENÇAS 60
FIGURA 20 – ESQUEMA DE SEPARAÇÃO NA METODOLOGIA ADAPTADA DE ZIMMERMANN E COLABORADORES. 61
FIGURA 21 – ESPECTRO DE MALDI-TOF (MODO POSITIVO) DE MONO-PY^+ 64
FIGURA 22 – ESPECTRO DE MALDI-TOF (MODO POSITIVO) DOS DERIVADOS MULTICATIONIZADOS DI-*TRANS*-PY^+ E DI-*CIS*-PY^+ E TRI-PY^+ E TETRA-PY^+ 65
FIGURA 23 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO MONO-PY^+ 67
FIGURA 24 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO DI-*TRANS*-PY^+ 67
FIGURA 25 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO DI-*CIS*-PY^+ 68
FIGURA 26 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO TRI-PY^+ 68
FIGURA 27 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO DERIVADO TETRA-PY^+ 69
FIGURA 28 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS DERIVADOS CATIONIZADOS NA REGIÃO ENTRE 350-800 nm NO TEMPO INICIAL E APÓS 20 MINUTOS DE IRRADIAÇÃO A 100 mW/cm². 70

GRÁFICO 1 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS APÓS IRRADIAÇÃO DE 100 mW/cm² 72
GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO 74
FIGURA 29 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO DOS DERIVADOS CATIONIZADOS NA REGIÃO ENTRE 350-800 nm NO TEMPO INICIAL E APÓS 20 MINUTOS NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO.....74
GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS APÓS IRRADIAÇÃO DE 100 mW/cm² DESCONTANDO A AGREGAÇÃO 76
GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DO DERIVADO MONO-PY^+ SOB IRRADIAÇÃO E NO ESCURO.....77
FIGURA 30 – REAÇÃO ENTRE O DFiBF E OXIGÊNIO SINGLETE DEMONSTRANDO A FORMAÇÃO DO ENDOPERÓXIDO TRANSPARENTE NO COMPRIMENTO DE ONDA DA ANÁLISE (415 nm). 78
GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA ABSORBÂNCIA EM λ DE 415 nm DE DFiBF NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS DERIVADOS APÓS IRRADIAÇÃO A 9,0 mW/cm² E COMPRIMENTOS DE ONDA SUPERIORES A 540 nm. 80
GRÁFICO 6 – RESULTADOS (log UFC/mL) APÓS APLICAÇÃO DE DUAS INTENSIDADES DE IRRADIAÇÃO POR TRINTA MINUTOS EM CONÍDIOS DE *C. graminicola* 82
FIGURA 31 – GRÁFICOS EM COLUNAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO TETRA-PY^+ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 5, 25, 50 E 75 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE TRINTA MINUTOS. 84
FIGURA 32 – RESULTADOS GRÁFICOS EM LINHAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO TETRA-PY^+ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 5, 25, 50 E 75 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE TRINTA MINUTOS. 85

FIGURA 33 – GRÁFICOS EM COLUNAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO TETRA-PY$^+$ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 87
FIGURA 34 – GRÁFICOS EM LINHAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO TETRA-PY$^+$ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 88
FIGURA 35 – GRÁFICO EM COLUNAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO TRI-PY$^+$ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS..90
FIGURA 36 -GRÁFICO EM COLUNAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO TRI-PY$^+$ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 1,0 E 2,5 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. ...91
FIGURA 37 –GRÁFICO EM COLUNAS (log UFC/mL) EMPREGANDO DI-*CIS*--PY$^+$ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 93
FIGURA 38 – GRÁFICO EM COLUNAS (log UFC/mL) DO *SCREENING* ESCURO EMPREGANDO DI-*CIS*-PY$^+$.....94
FIGURA 39 – GRÁFICO EM COLUNAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO DI-*TRANS*-PY$^+$ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 96
FIGURA 40 – GRÁFICO EM COLUNAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO DI-*TRANS*-PY$^+$ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 1,0 E, 2,5 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 97
FIGURA 41 – GRÁFICO EM COLUNAS (log UFC/mL) DA PDI EMPREGANDO MONO-PY$^+$ COMO FOTOSSENSIBILIZADOR NAS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 15 E, 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 99

FIGURA 42 – IMAGENS DAS MICROPLACAS OBTIDAS APÓS INCUBAÇÃO NO ENSAIO DE CIM, COM AMPLIAÇÃO DE UM POÇO EVIDENCIANDO O CRESCIMENTO FÚNGICO.....101
QUADRO 11 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS PORFIRINICOS ADEQUADOS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES.....103
QUADRO 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DERIVADO PORFIRINICO NÃO ADEQUADO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR POR TER DEMONSTRADO TOXICIDADE NO ESCURO.....103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROPORÇÕES ENTRE PIRROL E ALDEÍDOS AVALIADAS PARA SÍNTESE 44
TABELA 2 – VOLUME DE REAGENTES E SOLVENTE INSERIDOS EM CADA CONDIÇÃO AVALIADA.....45
TABELA 3 – RENDIMENTOS PERCENTUAIS CALCULADOS ATRAVÉS DE QUANTIDADES MOLARES 56
TABELA 4 – RENDIMENTOS PERCENTUAIS CALCULADOS ATRAVÉS DE PROPORÇÃO NO PRECIPITADO CRISTALINO 56
TABELA 5 – RENDIMENTOS OBTIDOS PARA OS DERIVADOS QUATERNIZADOS 63
TABELA 6 – MASSAS ESPERADAS PARA OS DERIVADOS PORFIRÍNICOS PIRIDILADOS EM SUA FORMA QUATERNIZADA 64
TABELA 7 – SINAIS OBTIDOS NOS ESPECTROS DE RMN DE H^1 PARA OS DERIVADOS CATIONIZADOS RELACIONANDO AOS RESPECTIVOS ÁTOMOS DE HIDROGÊNIO. 66
TABELA 8 – VALORES EM DUPLICATA EM PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS APÓS IRRADIAÇÃO DE 100 mW/cm² 71
TABELA 9 – VALORES EM DUPLICATA EM PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO 73
TABELA 10 – VALORES PERCENTUAIS EM DUPLICATA DO DECAIMENTO DA BANDA SORET NA PRESENÇA DE IRRADIAÇÃO DESCONTANDO O PROCESSO DE AGREGAÇÃO. 76
TABELA 11 – VALORES EM DUPLICATA RELATIVOS AO PERCENTUAL DE QUEDA DA ABSORBÂNCIA DO DFiBF NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE PORFIRINAS EM λ DE 415 nm APÓS IRRADIAÇÃO A 9,0 mW/cm² E COMPRIMENTOS DE ONDA SUPERIORES A 540 nm. 79
TABELA 12 – VALORES (log UFC/mL) EM TRIPLICATA APÓS APLICAÇÃO DE DUAS INTENSIDADES DE IRRADIAÇÃO POR TRINTA MINUTOS EM CONÍDIOS DE *C. graminicola* 81

TABELA 13 – VALORES DE (log UFC/mL) EM TRIPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO TETRA-PY^{+} NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 25, 50 E 75 μM. E IRRADIAÇÃO POR UIM PERÍODO MÁXIMO DE TRINTA MINUTOS, COMO DESCRITO POR GOMES E COLABORADORES (2011).....83
TABELA 14 – VALORES (log UFC/mL) EM TRIPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO TETRA-PY^{+} NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 86
TABELA 15 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO TRI-PY^{+} NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 90
TABELA 16 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO TRI-PY^{+} NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,0 E 2,5 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS. 91
TABELA 17 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO DI-*CIS*-PY^{+} NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS.....92
TABELA 18 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO DI-*TRANS*-PY^{+} NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS 95
TABELA 19 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO DI-*TRANS*-PY^{+} NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,0 E 2,5 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE 20 MINUTOS. 96
TABELA 20 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO MONO-PY^{+} NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS.....98
TABELA 21 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA OBTIDAS PARA AS CINCO PORFIRINAS AVALIADAS EM CONÍDIOS DE *C. graminicola*.....101
TABELA 22 – CONCENTRAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR E TEMPO DE IRRADIAÇÃO NECESSÁRIOS PARA INATIVAÇÃO SIGNIFICATIVA DE CONÍDIOS DE *C. graminicola*. 104

LISTA DE SIGLAS

ASD – Agar Sabouraud Dextrosado

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

$CDCl_3$ - clorofórmio deuterado

CIM – Concentração inibitória mínima

CFM – Concentração fungicida mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DFiBF – 1,3 – difenilisobenzofurano

DMF – *N, N* – Dimetilformamida

DMSO – dimetilsulfóxido

$DMSO_{d6}$ – dimetilsulfóxido deuterado

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAA – Agar farinha de aveia

MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight

PBS – Phosphate buffered saline

PDI – Photodynamic inactivation

Rf – Retention Factor

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

UR – Umidade Relativa do ar

LISTA DE ABREVIATURAS

Di-*cis*-Py^+ - Iodeto de 15,20-difenil-5,10-(*N*-metilpiridino-4-il)porfirina

Di-*trans*-Py^+ - Iodeto de 10,20-difenil-5,15 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina

Mono-Py^+ - Iodeto de 10,15,20-trifenil-5 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina

Tetra-Py^+ - Iodeto de *tetraquis*-5,10,15,20 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina

Tri-Py+ - Iodeto de 20-fenil-5,10,15 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 OBJETIVOS 19
1.1.1 Objetivo geral 19
1.1.2 Objetivos específicos 19
2 REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA 21
2.1.1 Definição e aplicações 21
2.1.2 Componentes e processo de destruição celular 22
2.2 PORFIRINAS 26
2.2.1 Características estruturais e químicas 26
2.2.2 Derivados porfirínicos e PDI 28
2.3 FITOPATÓGENOS 31
2.3.1 Aspectos do *Colletotrichum graminicola* 32
2.4 ANTRACNOSE DO MILHO 38
2.4.1 Panorama atual da antracnose 39
3 MATERIAL E MÉTODOS 41
3.1 FITOPATÓGENO *Colletotrichum graminicola* 41
3.1.1 Obtenção 41
3.1.2 Cultivo 41
3.1.3 Conservação 42
3.1.4 Preparo e padronização da suspensão de conídios para PDI 42
3.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA 43
3.2.1 Fotossensibilizadores 43
3.2.1.1 *Síntese dos derivados de partida* 44
3.2.1.2 *Caracterização por espectrometria de massas (MALDI-TOF)* 46
3.2.1.3 *Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)* 46
3.2.1.4 *Cationização* 47
3.2.1.5 *Armazenamento e utilização na PDI* 47
3.2.2 Procedimento e avaliação da PDI 48
3.2.3 Análise gráfica e estatística 49
3.3 ENSAIOS FOTOFÍSICOS 50

3.3.1 Fotoestabilidade dos derivados porfirínicos 50
3.3.2 Estudos de geração de oxigênio singlete 50
3.4 ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA 51
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA 52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 53
4.1 SÍNTESE DAS *MESO*-TETRA-ARILPORFIRINAS CATIÔNICAS 53
4.1.1 Síntese dos derivados na forma neutra 53
4.1.2 Processamento do meio reacional e separação dos derivados 57
4.1.3 Caracterização por MALDI-TOF e RMN de 1H 61
4.1.4 Cationização 62
4.1.5 Caracterização dos compostos quaternizados por MALDI-TOF 64
4.1.6 Caracterização dos compostos quaternizados por RMN de H^1 66
4.2 ENSAIOS FOTOFÍSICOS 69
4.2.1 Fotoestabilidade das *meso*-tetra-arilporfirinas catiônicas 70
4.2.2 Estudos de geração de oxigênio singlete 78
4.3 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE CONÍDIOS DE C. *graminicola* 81
4.3.1 Definição da intensidade luminosa utilizada 81
4.3.2 Definição da concentração de fotossensibilizador empregando Tetra-Py+ 82
4.3.3 PDI empregando Tetra-Py^+ como fotossensibilizador 86
4.3.4 PDI empregando Tri-Py^+ como fotossensibilizador 89
4.3.5 PDI empregando Di-*cis*-Py+ como fotossensibilizador 92
4.3.6 PDI empregando Di-*trans*-Py^+ como fotossensibilizador 95
4.3.7 PDI empregando Mono-Py^+ como fotossensibilizador 98
4.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA e ATIVIDADE FUNGICIDA 100
4.5 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E AVALIAÇÃO EM ENSAIOS *IN VIVO* 103
5 CONCLUSÃO 106
REFERÊNCIAS 108
ANEXOS 116

1 INTRODUÇÃO

Atualmente se encontra bem caracterizada a relação patogênica entre certos micro-organismos e os seres vivos. Vários procedimentos têm sido utilizados para controle de tais enfermidades. Porém, as metodologias usualmente empregadas para inativação dos micro-organismos não são inertes ao meio ambiente e nem mesmo totalmente eficazes (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004). Assim, a busca por novos procedimentos com características bem estabelecidas de eficácia associadas à inocuidade ao meio ambiente tem sido constante.

Nesse contexto, a inativação fotodinâmica (PDI) consiste em uma importante ferramenta a ser utilizada. O processo é composto pela interação entre uma molécula fotossensibilizadora e luz em comprimento de onda específico, com a promoção da molécula para um estado excitado que, na presença de oxigênio, culmina na geração de espécies reativas que determinam a destruição e morte celular (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). A toxicidade gerada, porém, é de certa forma seletiva, visto que os maiores danos gerados para as células são evidenciados quando há exposição à luz, o que contribui para a ausência de indução de resistência nos micro-organismos expostos.

Dentre os compostos fotossensibilizadores investigados atualmente se encontram os derivados porfirínicos, que são constituídos, em sua estrutura básica, por um macrociclo composto por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por ligações metínicas (MILGROM, 1997). Modificações moleculares realizadas nessa estrutura básica, tais como introdução de grupos hidrofílicos ou inserção de cargas, levam à geração de diversos derivados porfirínicos.

A atividade fotodinâmica inativadora desses compostos em relação a fungos filamentosos e leveduras tem sido avaliada *in vitr*o (CARRÉ *et al*, 1999; FRIEDBERG *et al*., 2001; LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005; CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005; CORMICK *et al.*, 2009) e os resultados obtidos foram satisfatórios, especialmente quando há presença de cargas positivas na estrutura (CORMICK *et al.*, 2009).

Os fungos são micro-organismos eucarióticos caracterizados por extrema variabilidade (HERRERA; ULLOA, 1990) e estão presentes como habitantes de diversos ambientes. Vários gêneros demonstram relação simbiôntica com outros

seres vivos. Porém, alguns podem se tornar capazes de ocasionar doenças. Aqueles que acometem os vegetais são denominados fitopatógenos. As enfermidades presentes não devem ser consideradas apenas epidemias, pois adicionalmente provocam drásticas reduções nos rendimentos agrícolas, interferindo profundamente no âmbito econômico (KNOGGE, 1996).

Colletotrichum graminicola é um fungo imperfeito pertencente à classe dos Coelomycetos (HERRERA; ULLOA, 1990). Representa um fitopatógeno, agente causal da antracnose (CARDWELL; HEPPERLY; FREDERIKSEN, 1989; COSTA *et al.*, 2010) e se relaciona diretamente às doenças do colmo e foliares do milho (*Zea mays*) (COSTA *et al.*, 2010). A incidência de tais enfermidades pode ser superior a 70% e perdas na produtividade permanecem entre 18 e 50% (COÊLHO *et al.*, 2001; EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa), 2009). Essas infecções podem ocasionar ainda, tombamento da planta (COÊLHO *et al.*, 2001) e redução no peso dos grãos e espigas (EMBRAPA, 2009).

O patógeno apresenta elevada capacidade de sobrevivência em restos de cultura, sendo observada viabilidade dos esporos em resíduos vegetais previamente parasitados por um período de 18 meses, ocasionando rápido acúmulo de inóculo nas áreas de cultivo (VIZVARY; WARREN, 1982).

Os tratamentos atuais utilizados consistem em novas técnicas de cultivo e utilização de agrotóxicos. O emprego de tais compostos químicos no Brasil se relaciona não somente à questão econômica, mas social e de saúde pública. São gerados custos adicionais atribuídos aos efeitos negativos observados no âmbito da saúde pública, sendo a redução na perda produtiva apenas uma pequena porção a ser considerada na análise do custo-benefício para o uso desses compostos (SOARES, 2010). Além disso, a resistência do micro-organismo a fungicidas quinolínicos, comumente utilizados na agricultura, tem sido descrita (ADAME; OLAYA; KÖLLER, 2003; CROUCH; CLARKE; HILMAN, 2005).

Os principais estudos para controle da antracnose estão relacionados ao desenvolvimento de linhagens genéticas de milho resistentes à infecção e avaliação genética do fungo para conhecimento da patogenia e correta identificação do micro-organismo, que apresenta elevada variabilidade genética (COÊLHO *et al.*, 2001; LIMA; MENEZES, 2002) e patogênica (BARBOSA, 2002).

O Brasil apresenta elevada produtividade de milho. Para consumo interno, o grão é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos

para cereais matinais. A produção é crescente a cada ano e a exportação, cada vez mais importante, pois o vegetal é utilizado como ingrediente para a produção de ração animal (BRASIL, 2013). Dessa maneira, as perdas de produtividade ocasionadas refletem diretamente na economia brasileira.

O desenvolvimento de métodos para controle de antracnose que se apresentem eficazes e inócuos ao meio ambiente e à saúde humana e animal é um importante aspecto a ser considerado. Sendo assim, a avaliação da atividade fotodinâmica inativadora dos derivados porfirínicos em relação aos esporos do fungo *Colletotrichum graminicola* pode se tornar uma ferramenta a ser utilizada para o controle da antracnose do milho em regiões brasileiras, bem como para auxiliar a agricultura nos aspectos econômico, social e de saúde pública.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a ação fotodinâmica inativadora promovida por derivados porfirínicos sobre o fungo *Colletrotichum graminicola*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Demonstrar a utilização das porfirinas e seus derivados como fotossensibilizadores.
- Cultivar o fungo *Colletotrichum graminicola*, maximizando a produção de conídios.
- Sintetizar uma série de *meso*-tetra-arilporfirinas catiônicas estruturalmente relacionadas.
- Analisar as propriedades fotofísicas e fungicidas dessas porfirinas.

- Avaliar a atividade fotodinâmica inativadora desses compostos em conídios do fungo *Colletotrichum graminicola*.
- Correlacionar as propriedades fotofísicas e fotoinativadoras dos derivados porfirínicos.
- Comparar a atividade fotodinâmica inativadora dos diferentes derivados testados, indicando aqueles com maior potencialidade de inativação fotodinâmica.
- Analisar a relação estrutura-atividade dos compostos, demonstrando aqueles com viabilidade superior para transposição para ensaios *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

2.1.1 Definição e aplicações

Um processo fotodinâmico se relaciona à utilização da combinação de um fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular com o objetivo de ocasionar destruição seletiva de um alvo biológico (OCHSNER, 1997). Tais alvos biológicos podem estar relacionados aos seres humanos, como células tumorais (OCHSNER, 1997; BONNETT; MARTÍNEZ, 2001) ou infecções localizadas provocadas por micro-organismos (PERUSSI, 2007). Nesse caso, o processo é denominado Terapia Fotodinâmica (*Photodynamic Therapy*, PDT). Quando os alvos se relacionam a micro-organismos ou estruturas específicas desses, o processo é denominado Quimioterapia Antimicrobiana Fotodinâmica (*Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy*, PACT) (WAINWRIGHT, 1998) ou Inativação Fotodinâmica (*Photodynamic Inactivation*, PDI) (GAD *et al*., 2004).

A PDI foi inicialmente descrita em 1900, quando Raab observou a morte do protozoário *Paramecium caudatum* após exposição à luz na presença do corante laranja de acridina (RAAB, 1900[1], citado por WAINWRIGHT, 1998; LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004; PERUSSI, 2007). Desde então, vários estudos têm buscado avaliar tais processos inativadores e seu mecanismo de inativação (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005).

A PDI pode ser empregada para a destruição de vários tipos de micro-organismos, incluindo bactérias, vírus, fungos (PERUSSI, 2007) e parasitas (JORI; BROWN, 2004). Também foi descrita a efetividade do processo fotodinâmico para bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*) e Gram negativas (*Escherichia coli*) (ALVES *et al.*, 2009). Felber e colaboradores (1973) descreveram melhora significativa nos sintomas da infecção pelo vírus herpes simplex quando expostos a

[1] RAAB, O. Z. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. **Zeitschrift Biologie** n. 39, p. 524–46, 1900.

um corante fotossensibilizador e à luz visível. Outros estudos evidenciaram a inativação fotodinâmica de parasitas importantes, como *Plasmodium falciparum* (GRELLIER, 1997), *Acanthamoeba palestinensis* (KASSAB *et al*., 2003) e *Leishmania amazonensis* (PELOI *et al*., 2011).

De acordo com Calzavara-Pinton, Venturini e Sala (2005), inúmeros fungos e leveduras podem ser inativados *in vitro* a partir da utilização de fotossensibilizadores. Neste contexto, foram realizadas avaliações da PDI em leveduras tais como *Saccharomyces cerivisiae* (CARRÉ *et al.*, 1999) e *Candida albicans* (LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005; CORMICK *et al.*, 2009) ou fungos filamentosos, como *Aspergillus fumigatus* (FRIEDBERG *et al.*, 2001) e micromicetos (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004).

A PDI também pode ser empregada para descontaminação de ambientes (JORI; BROWN, 2004), para purificação de água para consumo humano (PERUSSI, 2007) e higienização de alimentos (LUKSIENE; PECIULYTE; LUGAUSKAS, 2004).

2.1.2 Componentes e processo de destruição celular

A PDI apresenta três componentes específicos: a utilização de luz visível em comprimento de onda específico, com concentrações intracelulares de compostos denominados fotossensibilizadores e oxigênio (considerado o reagente) (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). De acordo com Luksiene, Peciulyte, Lugauskas (2004), a combinação desses dois componentes completamente atóxicos (luz e os fotossensibilizadores) em um ambiente contendo oxigênio promove a destruição total das células nas quais os compostos se acumulam.

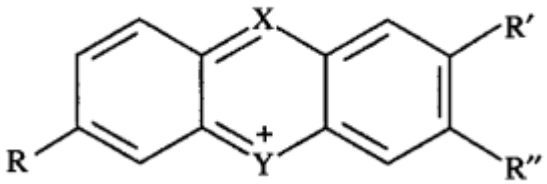
A fonte de luz a ser utilizada pode variar, como lâmpadas de argônio, que emitem em comprimento de onda de 488-514 nm, entre outras. É importante ressaltar que são utilizadas lâmpadas de baixa potência no processo de PDI, uma vez que a inativação dos micro-organismos já ocorre em potências da ordem de miliwatts. Além disso, em termos de morte celular, uma iluminação de elevada potência associada a um curto período de tempo pode demonstrar resultados distintos daqueles obtidos através de uma iluminação de baixa potência processada por um período mais longo (WAINWRIGHT, 1998), inferindo que, além da potência

luminosa, o tempo de irradiação constitui uma variável importante no processo da PDI.

Um fotossensibilizador, para ser considerado adequado, normalmente apresenta estrutura planar, rígida e com elevado grau de conjugação (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001). Além das características químicas, a extensão da indução da morte nos micro-organismos com o mínimo efeito sobre as células do hospedeiro e a prevenção de uma possível reinfecção são aspectos a serem considerados na avaliação de um fotossensibilizador a ser utilizado (JORI *et al.*, 2006).

Idealmente, o composto deve ser promovido ao seu estado excitado através da radiação utilizada; deve estar presente em concentração suficiente para que absorva maior quantidade de fótons que os outros reagentes presentes; e a energia do estado triplete do fotossensibilizador deve ser mais elevada que a do reagente (CAREY; SUNDBERG, 2007).

Como agentes fotossensibilizadores utilizados para PDI pode-se relacionar os corantes fenotiazínicos (FIGURA 1), ftalocianinas e porfirinas (WAINWRIGHT, 1998; PERUSSI, 2007; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). Dentre esses se destacam as porfirinas e seus derivados.



	R	R″	R′	X	Y
Azul de metileno	$(CH_3)_2N$	$N(CH_3)_2$	H	N	S
Azul de toluidina	$(CH_3)_2N$	NH_2	CH_3	N	S
Vermelho neutro	$(CH_3)_2N$	NH_2	CH_3	N	NH
Proflavina	H_2N	NH_2	H	CH	NH

Figura 1 – Estrutura química de alguns corantes fenotiazínicos utilizados como fotossensibilizadores
FONTE: Adaptado de Wainwright (1998)

O efeito fotodinâmico é dependente de vários fatores físicos e químicos, como pico de absorção, intensidade de absorção e rendimento de oxigênio singlete. Além disso, coeficiente de partição óleo-água, grau de ionização e presença de grupos carregados que interferem com a captação do fotossensibilizador e o padrão

de distribuição entre os compartimentos celulares são fatores determinantes para a efetividade do processo (CALZAVARA-PINTON; VENTURINI; SALA, 2005). Além disso, segundo Engelmann (2007), a ligação à membrana celular consiste em um importante aspecto a ser considerado na avaliação da efetividade da PDI e seu estudo está diretamente relacionado à estrutura química do composto utilizado.

Segundo Donnelly, Mccarron e Tunney (2008), após a interação dos compostos com a luz, ocorre a sensibilização, ou seja, a absorção de um fóton. Dessa maneira, a molécula do sensibilizador é promovida do estado fundamental (S_0) a um estado excitado, denominado estado singlete (S_1), que apresenta vida curta. O fotossensibilizador pode retornar ao seu estado fundamental emitindo fluorescência ou ser convertido à sua forma triplete (T_1) através de conversão interna, sendo a diferença de energia entre os estados perdida na forma de calor. A seguir, ocorre a transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio em seu estado fundamental triplete ($^3O_2$), retornando o sensibilizador para estado S_0 e culminando na formação do oxigênio singlete ($^1O_2$).

As mudanças nos estados eletrônicos nos compostos podem seguir dois tipos distintos de reações em organismos (FIGURA 2).

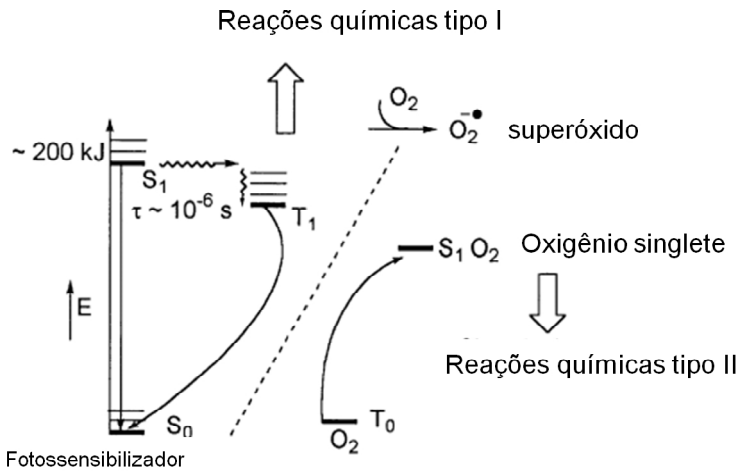


Figura 2 – Diagrama modificado de Jablonski demonstrando os mecanismos de reações envolvidos na PDI
FONTE: traduzido de Bonnett e Martínez (2001)

Nas reações tipo I, o próprio fotossensibilizador interage com o oxigênio e ocorre transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio que resultam na produção de radicais – superóxido, hidroxila, entre outros - que irão interagir com os substratos, ou seja, as macromoléculas intracelulares.

Ao contrário, nas reações do tipo II, ocorre transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete para a molécula de $^3O_2$, culminando na geração do $^1O_2$ (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001; DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2008). Stief (2003) em seu estudo demonstrou atividade antibacteriana, citostática, antiviral e antitrombótica observada para o $^1O_2$ gerado através das reações do tipo II.

As espécies reativas de oxigênio geradas ocasionam a destruição celular através da interação com biomoléculas. Tal processo acarreta alterações fisiológicas e metabólicas que culminam na morte das células. Dentre essas podem ser destacadas interações com organelas intracelulares, dependendo da captação do fotossensibilizador e a sua capacidade de promover a geração das espécies reativas. Em relação aos micro-organismos, Wainwright (1998) descreveu distintos sítios de ação e mecanismos de interação ocasionados após a PDI (QUADRO 1). Castano, Demidova e Hamblin (2004) evidenciaram interação elevada com lipídios, aminoácidos e DNA, especialmente nas reações desencadeadas através do mecanismo do tipo II.

Sítio de ação	**Ação**	**Resultado**	**Consequência**	**Citotoxicidade**
Água	Abstração de hidrogênio	Formação do Radical Hidroxila ($HO^{\cdot}$)	Formação de peróxido de hidrogênio e superóxido (O_2^{-})	Reações de oxidação posteriores
Parede celular/lipídios de membrana insaturados/esteróis	Peroxidação	Peroxidação	Formação de hidroperóxidos	Aumento na permeabilidade de íons (Bomba Na^+/K^+)
Peptídeos	Abstração de hidrogênio	Ligações peptídicas trocadas	Inativação enzimática	Perda da facilidade de reparo de erros, lise celular
Cadeia respiratória	Reações redox	———	———	Inibição da respiração
Resíduos de ácidos nucleicos (especialmente guanosina)	Oxidação da base nitrogenada ou açúcar	8-hidroxiguanosina	Degradação do nucleotídeo/açúcar	Substituição de bases, clivagem, mutação.

QUADRO 1 – EFEITOS DA PDI EM DIFERENTES MOLÉCULAS CELULARES
FONTE: Wainwright (1998)

Por essas razões, na ausência de oxigênio um processo fotodinâmico não ocorre. Tal fato foi demonstrado por Matsumoto e colaboradores (2011) através da avaliação de um procedimento de inativação com presença de luz e fotossensibilizador, mas na ausência de oxigênio, em atmosfera saturada de

argônio. Nessa avaliação, não foi observada destruição do micro-organismo, comprovando a ineficiência do processo na ausência de um dos três componentes da PDI.

2.2 PORFIRINAS

2.2.1 Características estruturais e químicas

A palavra porfirina é proveniente do termo *porphura*, utilizado na Grécia Antiga como designação da cor púrpura. Esses compostos são pigmentos fortemente corados e exibem a cor a qual se referem em sua denominação (MILGROM, 1997).

De acordo com o autor, derivados porfirínicos estão presentes fisiologicamente em múltiplos organismos. Nos vegetais, há a clorofila, um pigmento de coloração verde envolvido nos processos fotossintéticos. Nos mamíferos tais estruturas são encontradas no grupo heme, componente da hemoglobina e mioglobina, proteínas envolvidas no transporte e armazenamento de oxigênio, respectivamente.

As porfirinas são compostos macrocíclicos que contêm em sua estrutura básica quatro anéis pirróis ligados através de ligações metínicas (FIGURA 4).

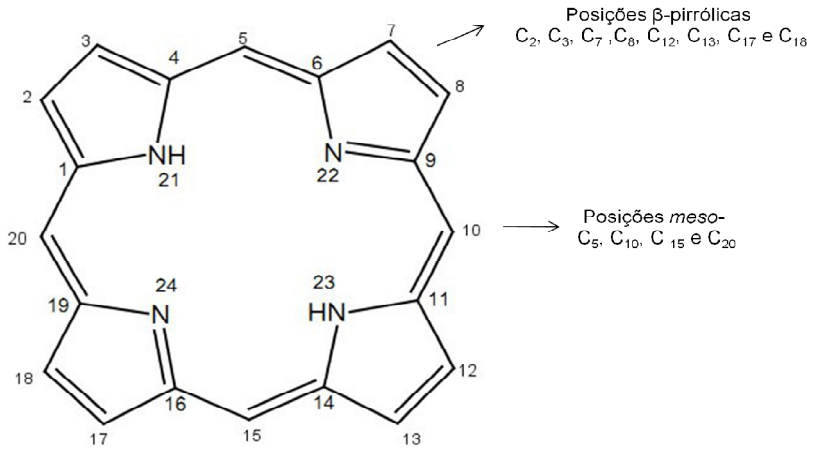


Figura 4 – Estrutura básica do macrociclo porfirínico
FONTE: Adaptado de Čeklovský (2009)

O macrociclo porfirínico contém vinte e dois elétrons π, porém, somente dezoito deles contribuem para o caráter aromático do macrociclo. Os demais apresentam caráter de dupla ligação (MILGROM, 1997).

A característica aromática do macrociclo é comprovada por algumas propriedades, como: elevado calor de combustão, estrutura planar e participação em reações de substituição eletrofílica, características de compostos aromáticos. Porém, a diferença existente entre o benzeno, por exemplo, e o macrociclo consiste nas características das distintas posições do macrociclo que demonstram reatividade variável: posições *meso* e posições β-pirrólicas. O grau de reatividade irá depender da deslocalização da densidade eletrônica do macrociclo (MILGROM, 1997).

As porfirinas normalmente são insolúveis em água, porém, a inserção de substituintes (aniônico ou catiônico) em suas diferentes posições (*meso* ou β-pirrólicas) proporcionam variações significativas na solubilidade desses compostos (ČEKLOVSKÝ, 2009).

Porfirinas hidrossolúveis podem sofrer reações de coordenação, polimerização, agregação molecular, reações de oxidação-redução e fotorreações. Posições específicas do macrociclo estão mais susceptíveis a determinados tipos de reações (ČEKLOVSKÝ, 2009):

- Grupos N-H demonstram propriedades de ácidos de Brownsted-Lowry;
- Dois átomos de nitrogênio que realizam ligações duplas e que contêm pares de elétrons livres expressam propriedades de bases de Lewis;
- As ligações das pontes metínicas sofrem reações de substituição eletrofílica.

O espectro de absorção das porfirinas apresenta dois tipos de bandas, localizadas nas regiões 400-450 nm (banda Soret) e 500-650 nm (bandas Q). A banda Soret apresenta maior intensidade, sendo a localização altamente influenciada pela posição de substituição do macrociclo. Por sua vez, o número e intensidade das bandas Q e seus componentes podem indicar se a porfirina apresenta substituição ou não e se há a presença de um metal no interior do macrociclo (GOUTERMAN, 1961; GOUTERMAN; WAGNIÈRE; SNYDER, 1963).

2.2.2 Derivados porfirínicos e PDI

Em relação à utilização de porfirinas como fotossensibilizadores na PDI, Bonnett e Martínez (2001) relataram que tais compostos exibem as seguintes vantagens: estabilidade química gerada pela aromaticidade presente na estrutura básica, rendimentos apreciáveis de oxigênio singlete e baixa toxicidade. Essas características são melhores observadas nas porfirinas de segunda geração, uma vez que aquelas denominadas como de primeira geração se mostram impuras.

Inicialmente, foi desenvolvido o produto Photofrin®, considerado de primeira geração, composto por uma mistura de monômeros, dímeros e oligômeros de porfirinas derivadas da hematoporfirina. Esses derivados iniciais estavam sendo utilizados para tratamentos de tumores em seres humanos e apresentavam alguns inconvenientes, como: seletividade baixa, ocasionando fotossensibilidade cutânea, baixa penetração e composição complexa, o que acarretava dificuldades na avaliação de resultados do tratamento (BONNETT, MARTÍNEZ, 2001). Sendo assim, novos derivados têm sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a seletividade, para reduzir o possível dano a células saudáveis. Ao relacionar com a PDI, há uma busca pela seleção de células fúngicas objetivando ser o mais inerte possível para as células do organismo acometido.

Modificações moleculares em porfirinas vêm sendo avaliadas em diversos estudos. Segundo Jori e colaboradores (2006), essas alterações estruturais podem ser realizadas através da inserção de substituintes que podem afetar apreciavelmente a cinética e a extensão da ligação com as células dos micro-organismos. O parâmetro principal a ser avaliado consiste no grau de hidrofobicidade do composto, que pode ser modulado através do número de grupos catiônicos presentes ou por meio da inserção de cadeias carbônicas de diferentes comprimentos nos átomos de nitrogênio envolvidos na cationização.

Para emprego na PDI, a necessidade de um derivado porfirínico com maior ou menor grau de hidrofobicidade está diretamente relacionada ao micro-organismo objeto de estudo e suas características (JORI *et al*., 2006), sendo que derivados anfifílicos – que exibem hidrofobicidade intermediária – são eficientes na inativação de fungos filamentosos (GOMES *et al*., 2011).

Considerando esse parâmetro, Engelmann e colaboradores (2007) testaram um novo método para avaliação do coeficiente de partição óleo/água e correlacionaram a derivados porfirínicos cationizados. Para esse aspecto foi observado um efeito significativo da estereoquímica e natureza dos substituintes carregados positivamente presentes no fotossensibilizador.

As porfirinas podem ser cationizadas através da inserção de substituintes carregados positivamente nas posições periféricas do macrociclo tetrapirrólico (JORI *et al.*, 2006).

Derivados porfirínicos e sua efetividade em PDI foram avaliados por Carré e colaboradores (1999) na inativação da levedura *Saccharomyces cerivisiae.* Tais derivados apresentavam açúcares como substituintes, sendo então denominados glicoporfirinas. Como resultados, os autores encontraram que os compostos com maior caráter anfifílico, ou seja, aquelas com menor número de substituintes glicídicos são mais eficazes, apresentando os dois polos (hidrofóbico e hidrofílico). Essas penetram com maior facilidade nas células, produzindo melhores resultados. Os mecanismos de ação propostos pelos pesquisadores podem estar relacionados à permeabilidade da membrana, que pode ser alterada. Recentemente, Matsumoto e colaboradores (2011), realizaram estudo de inativação da levedura empregando fotossensibilizadores representados por complexos de porfirina-fósforo com variações em seus substituintes. Os autores evidenciaram que a inserção de diferentes grupos químicos no núcleo porfirínico ocasiona alterações amplas, incluindo modificações nos parâmetros físico-químicos, como solubilidade em água e, especialmente nas propriedades fotodinâmicas, dentre as quais estão incluídas a bioafinidade pelo micro-organismo a ser inativado, com variáveis níveis de captação e a concentração mínima efetiva para destruição celular. De acordo com os autores, a adição de cadeias carbônicas maiores como substituintes reduz a solubilidade em água, porém remete a um processo maior de captação do fotossensibilizador pelas células leveduriformes, assim como eleva a eficiência do procedimento de inativação fotodinâmica.

Segundo Perussi (2007), um fotossensibilizador carregado positivamente (catiônico) se liga rapidamente aos micro-organismos, sendo lentamente capturado pelas células hospedeiras, o que permite seletividade. Dessa maneira, os derivados porfirínicos catiônicos exibem propriedades fotossensibilizadoras importantes e têm

sido avaliados para o tratamento e controle de micro-organismos através da PDI (CAMINOS; DURANTINI, 2008).

Inserções de grupos carregados positivamente nas posições β no núcleo porfirínico mostram efeito significativo na afinidade de ligação das porfirinas com o DNA, sendo que o aumento na quantidade de cargas positivas substituintes reforça a interação com a macromolécula (CHEN *et al.*, 2006).

Na busca por tratamentos alternativos devido à resistência fúngica aos medicamentos usuais, Lambrechts, Aalders e Van Marle (2005) avaliaram o efeito da PDI promovido por uma porfirina catiônica sobre a levedura *Candida albicans*. A porfirina catiônica foi eficaz em inativar as leveduras e a organela alvo consistiu na membrana citoplasmática. Na ausência de luz, a porfirina não penetra na célula, apenas adere à membrana. Através da lavagem, pôde ser observada a inibição total promovida pela PDI, confirmando a ligação fraca da membrana à porfirina. Com pouca iluminação, houve inativação de praticamente 100% das células, corroborando que o dano da membrana já foi suficiente para a inativação fotodinâmica.

Cormick e colaboradores (2009) compararam a atividade fotodinâmica inibidora de porfirinas tri e tetra-catiônica com a inibição observada para porfirina aniônica (FIGURA 5) sobre a levedura *Candida albicans*. Os autores observaram que a atividade é diretamente dependente da concentração do fotossensibilizador e inversamente relacionada à densidade celular. Dentre as porfirinas catiônicas avaliadas, não houve variação em atividade. Já a porfirina aniônica exibiu atividade inferior, o que se relacionou à fraca ligação com as células leveduriformes e consequente remoção por lavagem. As porfirinas catiônicas foram boas geradoras de oxigênio singlete e demonstraram ligação com as células muito mais pronunciada do que a observada para a porfirina aniônica. Em relação ao tempo de irradiação necessário para inativação, as porfirinas catiônicas ocasionaram morte celular significativa em cinco minutos. Por sua vez, a destruição celular demonstrada pela porfirina com caráter aniônico foi semelhante à observada nos grupos controle (com porfirina no escuro e na ausência de porfirina sob irradiação).

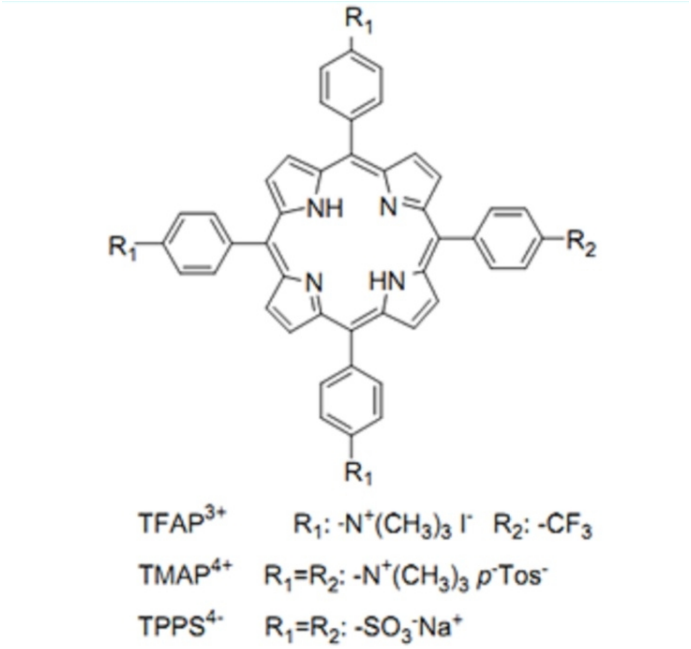


Figura 5 – Estrutura química das porfirinas avaliadas por Cormick e colaboradores
FONTE: Cormick *et al.* (2009)

Recentemente, Gomes e colaboradores (2011) relacionaram a atividade fotoinativadora de derivados porfirínicos catiônicos sobre esporos do fungo *Penicillium chrysogenum*. Os resultados obtidos evidenciaram distintas eficiências dos derivados como fotossensibilizadores na inativação do micro-organismo. Essas diferenças se relacionaram diretamente à variação de substituintes na posição *meso* dos compostos, que remetem a alterações nas propriedades fotofísicas e, consequentemente, em suas capacidades fotoinativadoras.

Como demonstrado, variações na estrutura química dos derivados porfirínicos proporcionam diferenças significativas na eficiência da PDI e podem ser utilizadas para aumentar a inativação de micro-organismos patogênicos.

2.3 FITOPATÓGENOS

Atualmente se encontra caracterizada a relação entre os micro-organismos e os seres vivos, inclusive para os fungos. Vários apresentam relações de simbiose com os organismos, ou seja, ambos são beneficiados. Porém, alguns fungos ou micro-organismos podem adquirir a capacidade de causar doenças. Aqueles que se

relacionam patogenicamente com vegetais são denominados fitopatógenos (KNOGGE, 1996). Segundo o autor, esses micro-organismos causam um efeito negativo não apenas ocasionando as enfermidades, mas proporcionando perdas significativas no âmbito econômico.

2.3.1 Aspectos do *Colletotrichum graminicola*

O gênero *Colletotrichum* consiste em um grupo de fungos imperfeitos pertencentes à classe *Coleomycetes*, Ordem *Melanconiales*, família *Melanconiaceae*. Esses fungos formam seus conídios em conidióforos presentes em estruturas especiais denominadas acérvulos e picnídios, que contêm tecido fúngico, tecido do hospedeiro ou ambos (HERRERA; ULLOA, 1990). Segundo o autor, o gênero *Colletotrichum* é um dos mais importantes e difundidos na natureza e tais micro-organismos são parasitas de plantas, ocasionando nelas a enfermidade denominada antracnose. Apresentam uma grande gama de hospedeiros e seus conídios alongados, hialinos e septados. São reconhecidas 22 espécies para esse gênero que parasitam vegetais específicos, das quais as principais estão relatadas no Quadro 2.

Espécie	**Hospedeiro**
Colletotrichum gloeosporioides	Diversos
Colletotrichum truncatum	Soja
Colletotrichum circinans	Feijão
Colletotrichum lindemuthianum	Feijão e alfafa
Colletotrichum graminicola	Milho

QUADRO 2 – ESPÉCIES PATOGÊNICAS PERTENCENTES AO GÊNERO *Colletotrichum* E SEUS RESPECTIVOS HOSPEDEIROS
FONTE: Adaptado de Herrera, Ulloa (1990).

Dentre as espécies citadas destaca-se o fungo *Colletotrichum graminicola*, o agente causal de antracnose foliar e do colmo no milho (*Zea mays* L.). De acordo com Perfect e colaboradores (1999), a espécie consiste em um patógeno hemibiotrófico intracelular, apresentando estágios de infecção compostos por biotrofismo e necrotrofismo. No primeiro, a nutrição fúngica é realizada através das

células vivas do hospedeiro e no segundo, a nutrição é proveniente de células do hospedeiro mortas pelo próprio fungo.

A infecção se processa a partir da adesão e germinação dos conídios à superfície do hospedeiro culminando na formação dos tubos germinativos seguida do desenvolvimento do apressório melanizado que forma vesículas e penetra diretamente na cutícula vegetal, formando a hifa primária. A seguir, a hifa cresce entre a membrana plasmática das células vegetais e a parede celular. Após a colonização, a hifa primária biotrófica coloniza novas células do mesofilo vegetal, tornando-se constrita quando passa através da parede celular. É observada a presença de uma matriz interfacial separando a membrana plasmática da célula vegetal da parede celular fúngica. Dessa forma, as células recém infectadas permanecem viáveis por certo período de tempo. Aproximadamente 48 horas após a penetração inicial a hifa secundária necrotrófica é formada e a matriz que circundava a hifa primária se desintegra. Finalmente, a hifa secundária necrotrófica secreta enzimas que degradam a parede celular vegetal e ocorre rapidamente a expansão das lesões necróticas (FIGURA 6) (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985; PERFECT *et al.*, 1999).

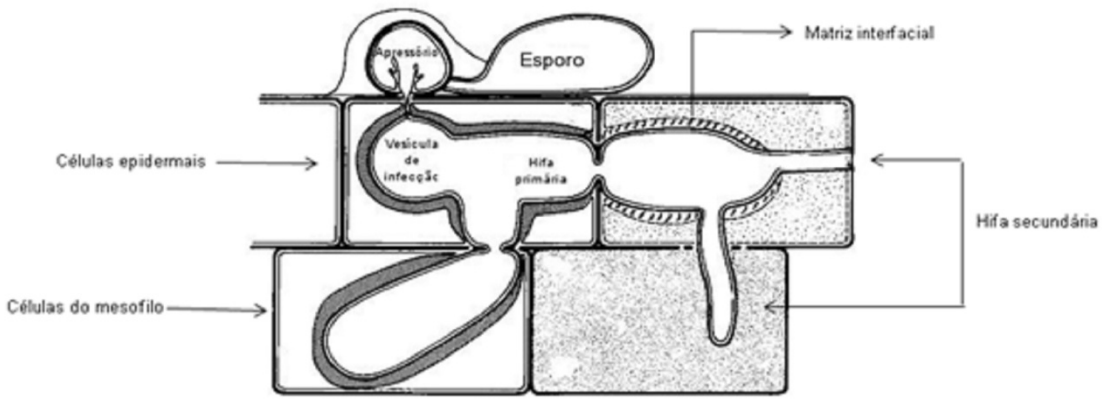


Figura 6 – Esquema das fases de infecção por espécies hemibiotróficas intracelulares pertencentes gênero *Colletotrichum*.
FONTE: adaptado de Perfect *et al.* (1999)

Durante a infecção por *C. graminicola* são observados dois tipos de conídios, denominados ovais e em formato de foice. Panaccione, Vaillancourt e Hanau (1989) avaliaram ambos e os descreveram morfologicamente, além de avaliarem critérios como germinação e reação frente a enzimas degradativas de parede celular (QUADRO 3).

Característica	**Conídios ovais**	**Conídios em forma de foice**
Tamanho	24-30 x 4-5 μm	6-13 x 3-5 μm
Culturas para recuperação	Com agitação em ambiente escuro	Presença de luz
Número e posição de núcleos	Variável (1 ou 2 mais comumente)	Único
Reação frente à enzimas de digestão da parede celular	Parede celular rompida facilmente	Maior resistência
Número de Protoplastos liberados por conídio	Único	Mais de um protoplasto
Germinação	Presente	Presente (maior proporção)

QUADRO 3 – CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS DE *C. graminicola*
FONTE: Panaccione, Vaillancourt e Hanau (1989)

Os autores evidenciaram conídios ovais presentes precocemente na infecção, em folhas jovens recentemente inoculadas e em lesões necróticas antigas. Entretanto, aqueles conídios em forma de foice se desenvolveram apenas no período intermediário, não sendo observados logo após a infecção. Além disso, foi caracterizada a produção de ambos em meio de cultura, originando apressórios melanizados. Nas infecções foliares, a presença de ambos os tipos de conídios foi relacionada. Da mesma maneira, ao serem inoculados em sementes de milho susceptíveis, ambos produziram sintomas no vegetal. Porém, o mesmo não foi observado em sementes insensíveis ao patógeno, que demonstraram sintomas de antracnose apenas após a inoculação com os conídios em forma de foice. Sendo assim, os conídios em forma de foice (FIGURA 7) exibem maior resistência e constituem uma fonte potencial de inóculo.

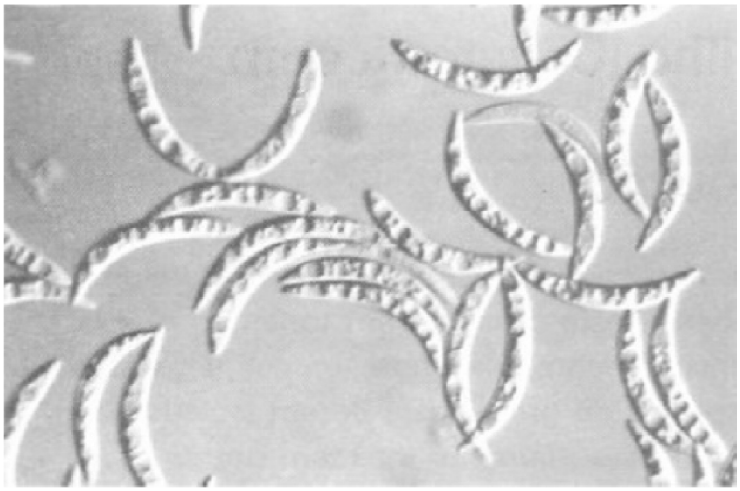


Figura 7 – Conídios em forma de foice de *C. graminicola*
FONTE: Embrapa (2001)

A produção dos conídios pode ser observada quando o fungo é submetido a condições adversas, tais como umidade relativa baixa (NICHOLSON; MORAES, 1980) e luminosidade (PANACCIONE; VAILLANCOURT; HANAU, 1989). Segundo Vaillancourt lab (2011), os conídios resultam de processos mitóticos e são produzidos a partir de estruturas especializadas denominadas conidióforos. Ao contrário, os conídios ovais são provenientes apenas dos corpos frutíferos presentes na superfície vegetal (acérvulos), apesar daqueles em forma de foice eventualmente serem provenientes de tais estruturas. Ao redor dos conídios são observadas estruturas escuras em forma de “fio de cabelo” denominadas setas, que são úteis para identificação em culturas recentes do micro-organismo.

Tendo em vista as características do fungo e de sua patogênese, vários estudos têm sido realizados desde meados dos anos 1980 com o intuito da elucidação da constituição bioquímica do micro-organismo e para avaliação de novas formas de controle para a antracnose. No início da década, Nicholson e Moraes (1980) já indicaram a presença de uma matriz mucilaginosa hidrossolúvel associada aos conídios do fungo (FIGURA 8). Os autores pesquisaram a interferência de diferentes condições de umidade relativa (UR) presentes no ambiente na germinação conidial, bem como alterações nas atividades enzimáticas. Como resultados, em condições de laboratório, a viabilidade dos conídios permanece substancialmente em UR de até 45%, sendo observada perda após três ou quatro semanas, provenientes provavelmente de um choque osmótico. Quando submetidos à reidratação, ocorreu aumento na viabilidade conidial. A perda da

matriz gerou redução na viabilidade dos conídios, porém quando em contato com a matriz purificada novamente, a viabilidade aumentou. Portanto, como papéis da matriz para os conídios de *C. graminicola* estão: a proteção contra dessecação periódica e reidratação quando as condições de UR estão baixas. Os conídios produzidos em umidade relativa baixa constituem fontes secundárias de inóculo após breves períodos de chuvas, uma vez que a reidratação proporciona reativação dessas estruturas fúngicas. Além disso, enzimas provavelmente não são inativadas após períodos de secagem da matriz.

A composição da matriz mucilaginosa foi avaliada por Nicholson, Butler e Asquith (1986), evidenciando a presença de glicoproteínas e a elevada afinidade das macromoléculas por compostos fenólicos. Dessa forma, os conídios são protegidos de compostos fenólicos frequentemente produzidos como um mecanismo de defesa pelo hospedeiro vegetal.

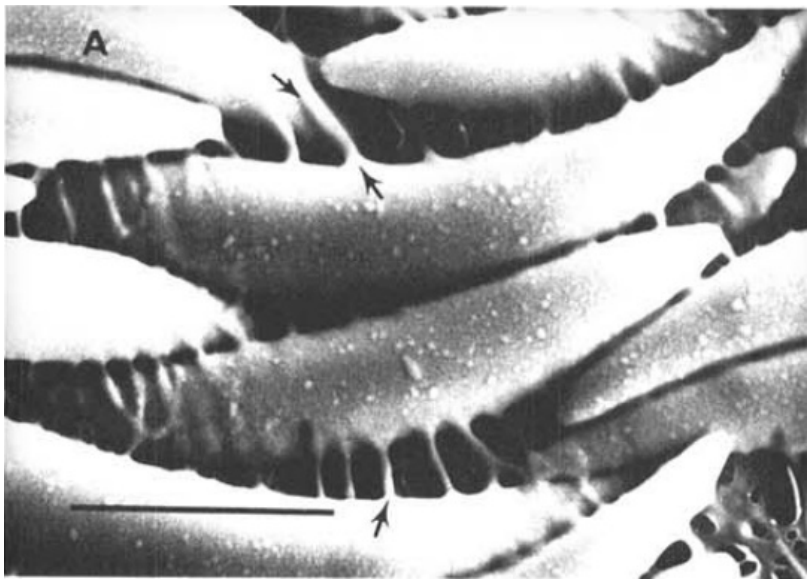


Figura 8 – Conídios de C*. graminicola* revestidos pela matriz mucilaginosa
FONTE: Nicholson e Moraes (1980)

Vizvary e Warren (1982) avaliaram a sobrevivência do patógeno no solo, através de cultivos e avaliação da esporulação em solo estéril e não esterilizado em distintas temperaturas. Dentre as observações estão que a esporulação frequente durante o inverno ou nos períodos mais frios é uma potencial fonte de inóculo para plantas. Os autores relataram ainda, que aparentemente o fungo não apresenta fases de crescimento ou de saprofitismo dependentes do solo. O fungo sobrevive

em resíduos de estruturas previamente parasitadas e apresenta a capacidade de sobrevivência como um saprófita por um período de até 18 meses em tecidos colonizados previamente parasitados, mas morre rapidamente quando conídios caem no solo. Além disso, não foram identificadas estruturas de resistência mais fortes.

Mercure, Kunoh e Nicholson (1994) avaliaram a antracnose foliar em milho e constataram que a adesão do patógeno às folhas ocorre preferencialmente naquelas mais jovens.

Outros dados importantes foram obtidos por Wicklow, Jordan e Gloer (2009), que avaliaram a presença de metabólitos do fungo que funcionam como antifúngicos e testaram esses compostos contra outros fungos descritos como patógenos do milho. As constatações foram obtidas a partir da mensuração de halos de inibição produzidos nos meios de cultura contendo os demais fungos. Monorden e monociclinas I e II estão entre os compostos produzidos por *C. graminicola*. Tais compostos demonstram atividade inibitória em relação a uma proteína denominada chaperona, que se constitui importante para a síntese de esteroides e quinases. Além disso, exibem importantes papéis na patogênese, bem como na inibição das defesas da planta.

Além das características fisiológicas do fungo que contribuem para a sua patogênese, algumas características adquiridas acentuam a dificuldade do controle da antracnose que acomete o milho.

A resistência de *C. graminicola* a fungicidas está descrita. Tal falta de sensibilidade foi avaliada por Avila-Adame, Olaya e Köller (2003) através de análises *in vitro* e *in vivo* da ação de fungicidas quinolínicos, comumente utilizados sobre o micro-organismo, azoxistrobina e trifloxistrobina. Esses compostos apresentam como mecanismo de ação fungicida a inibição da respiração celular por meio da interação com o centro do citocromo b. Os autores observaram que nas plantas previamente tratadas a intervenção não foi efetiva. Ao contrário, para aquelas que nunca tiveram contato prévio com os compostos o controle demonstrou ser adequado. Entretanto, no segundo contato, não foi evidenciada efetividade. Para os testes *in vivo* não foi observada redução na virulência com aumento da dose do fungicida. Testes *in vitro* confirmaram a necessidade de doses mais elevadas que a testada para controle da doença. Por meio da avaliação genética do citocromo b, os autores concluíram que o patógeno desenvolve rápida resistência aos fungicidas

testados a partir de mutações no citocromo b. Essas podem reduzir a interação entre o fungicida e citocromo b além da possibilidade de ocasionar também mudanças nas mitocôndrias.

Os resultados obtidos foram reforçados por Crouch, Clarke e Hillman (2005) que, em estudo com delineamento semelhante, concluíram que o fungo expressa a habilidade de se adaptar aos compostos químicos, não existindo mutações em micro-organismos que nunca foram expostos a esses compostos. Portanto, a resistência aos fungicidas não é proveniente de linhagens específicas, mas sim de adaptações dos fungos ao tratamento.

2.4 ANTRACNOSE DO MILHO

Todas as partes da planta podem ser acometidas pelo fungo. Na fase foliar da doença, os sintomas são expressos como manchas escuras de tamanho e formato variáveis e bordas irregulares. Tais lesões são ricas em acérvulos. Já no colmo vegetal, as lesões são observadas na casca e se mostram encharcadas, estreitas e ovaladas a elípticas (FIGURA 9). Em estágios mais avançados, as lesões vão escurecendo, podendo tornar-se negras, devido à grande quantidade de acérvulos (EMBRAPA, 2001).

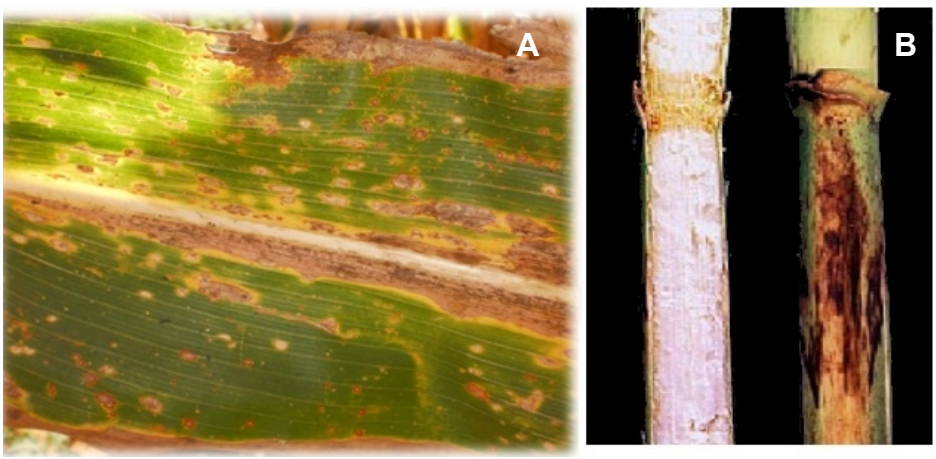


Figura 9 – Aspecto de plantas acometidas por antracnose foliar (A) e do colmo (B)
FONTE: A: O autor (2011); B: Bergstrom e Nicholson (1999)

A antracnose do colmo foi reconhecida como um dos principais problemas da cultura do milho (COÊLHO *et al.*, 2001). De acordo com o autor, a enfermidade pode ocasionar tombamento da planta e queda no rendimento entre 18 e 40%. A incidência pode ser superior a 70% e perdas na produtividade em torno de 50%. Além disso, há redução no peso dos grãos e espigas (EMBRAPA, 2009).

Dentre os tratamentos atuais estão presentes a utilização de fungicidas e a rotação de culturas. Os primeiros acarretam não somente danos aos vegetais, como também à população, interferindo nos aspectos econômicos, sociais e de saúde pública, com a geração de custos excessivos, além de prejuízos diretamente relacionados à sociedade.

2.4.1 Panorama atual da antracnose

Os estudos encontrados na literatura evidenciam os efeitos proporcionados pela infecção, os mecanismos utilizados pelo fungo para contaminação e sobrevivência e caracterizam geneticamente os micro-organismos, especialmente com técnicas de biologia molecular, tais como PCR. O enfoque genético é relevante, pois são identificados diferentes patotipos.

Cardwell, Hepperly e Frederiksen (1989) realizaram um estudo avaliando os distintos patotipos do fungo e relacionaram os seus efeitos em sementes. Os autores evidenciaram que as variações genéticas presentes podem dificultar o controle da antracnose.

Coêlho e colaboradores (2001) relacionaram genes de resistência à infecção e realizaram testes objetivando avaliar a patogenicidade de dois isolados de *C. graminicola* em quatro linhagens e dois híbridos de milho, além de verificar o modo de herança da resistência à infecção.

Relacionando a grande variabilidade genética existente no *C. graminicola*, Lima e Menezes (2002) avaliaram, a partir de padrões eletroforéticos, a variação de isoenzimas que constituem ferramentas úteis para diferenciação intraespecífica.

Os estudos acima mencionados enfocaram especialmente a variabilidade genética e evidenciaram a manipulação genética como uma alternativa para produção de plantas resistentes à infecção.

Para o controle da antracnose, há necessidade de busca por novas práticas culturais, como a rotação de culturas, manejo adequado dos restos culturais e tratamento das sementes com fungicidas (EMBRAPA, 2001). Nesse contexto, além da resistência fúngica a compostos comumente utilizados (AVILA-ADAME; OLAYA; KÖLLER, 2003; CROUCH; CLARKE; HILLMAN, 2005), Soares (2010) evidenciou o impacto da utilização desses compostos químicos na saúde pública e relatou que os danos ambientais e à saúde humana não são refletidos nos custos desses insumos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FITOPATÓGENO *Colletotrichum graminicola*

3.1.1 Obtenção

O fitopatógeno foi obtido através da coleção de fitopatógenos da Embrapa Milho e Sorgo, localizada na cidade de Sete Lagoas, estado de Minas Gerais, Brasil. Estes fungos foram provenientes de isolados de milho da cidade de Campo Mourão, Paraná, no ano de 2007.

3.1.2 Cultivo

O isolado de *C. graminicola* foi cultivado em placas de Petri de 60 x 15 mm contendo meio de cultura Agar farinha de aveia (FAA) (QUADRO 4).

Componente	**Concentração (g/1000mL meio)**
Farinha de aveia	60,0
Agar bacteriológico	15,0
Água destilada	qsp. 1000 mL

QUADRO 4 – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA FAA
FONTE: Embrapa (2010)

O meio foi preparado utilizando um liquidificador para homogeneização dos componentes sólidos com a água destilada, seguida da fervura e esterilização em autoclave, 121°C/1 atm, 15 minutos. Após o resfriamento à temperatura aproximada de 50°C foi realizada suplementação com antibiótico estreptomicina perfazendo uma concentração de 20 μg de antibiótico/mL de meio de cultura. Posteriormente, aproximadamente 10 mL do meio de cultura ainda líquido foram distribuídos nas placas de Petri, as quais foram armazenadas a temperatura de 4°C até a utilização.

O micro-organismo foi repicado para o meio de cultura através da técnica de semeadura em superfície e incubado em estufa BOD em temperatura de 30 ± 2°C com ciclos alternados de luminosidade (12 horas) por um período de cinco dias.

3.1.3 Conservação

Para conservação, foi realizado repique de uma porção da massa conidial do micro-organismo das placas de meio FAA para tubos de polipropileno contendo 300 μL de uma solução de leite em pó desnatado a 10% previamente autoclavada. A seguir, os tubos foram incubados em condições idênticas às descritas para o cultivo (item 3.1.2) culminando na obtenção de uma suspensão láctea conidial. Após esse processo, os tubos foram congelados e mantidos a temperatura de -20°C. Para recuperação, os tubos foram descongelados, homogeneizados e, com o auxílio de alça bacteriológica, repicados para novas placas de Petri contendo meio FAA e incubados novamente.

3.1.4 Preparo e padronização da suspensão de conídios para PDI

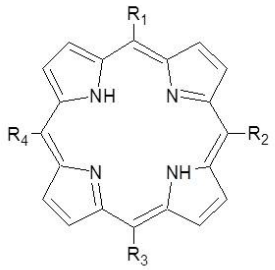
A suspensão conidial para utilização na PDI foi preparada em dois tubos de ensaio de 20 mL empregando como diluente um volume de 10 mL de uma solução aquosa de Tween 80 0,1% previamente autoclavada, utilizada para desagregação dos conídios. Posteriormente, em um dos tubos foi inserida na solução uma porção da massa conidial proveniente da placa de Petri contendo o micro-organismo e submetida à homogeneização com o auxílio de “vórtex”. A concentração conidial na suspensão foi determinada através de contagem em Câmara de Neubauer e padronizada a 10^5 conídios/mL por meio de inserção de maior quantidade de diluente ou conídios. A seguir, foi transferido um volume de 1,0 mL para o segundo tubo contendo o diluente a fim de ser obtida a segunda suspensão teste para PDI, com concentração de 10^4 conídios/mL.

3.2 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA

3.2.1 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores utilizados correspondem a derivados porfirínicos *meso* substituídos, contendo ao menos um grupo químico cationizado. Tais derivados apresentam similaridade estrutural e por isso são denominados como membros de uma "família" de compostos (QUADRO 5).

Núcleo porfirínico



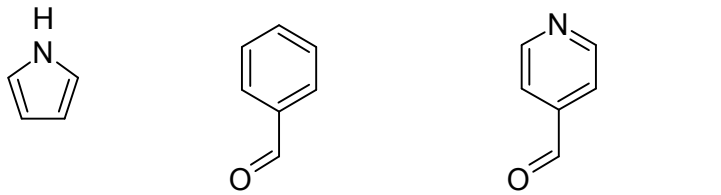
Porfirina	Nomenclatura	R_1	R_2	R_3	R_4
1	Iodeto de10,15, 20-trifenil-5 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina				
2	Iodeto de 10,20-difenil- 5,15 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina				
3	Iodeto de 15,20-difenil-5,10 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina				
4	Iodeto de 20-fenil-5,10, 15 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina				
5	Iodeto de tetraquis-5,10,15,20 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina				

QUADRO 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS AVALIADOS
FONTE: O autor (2012)

Os derivados foram sintetizados inicialmente em sua forma neutra e posteriormente cationizados.

3.2.1.1 Síntese dos derivados de partida

Para a formação dos derivados porfirínicos na forma neutra foi empregada uma mistura de pirrol, benzaldeído e piridina-4-carboxaldeído (FIGURA 10).



Pirrol Benzaldeído Piridina-4-carboxaldeído

Figura 10 – Estrutura química dos reagentes
FONTE: O autor (2012)

Em relação à proporção dos aldeídos, foram avaliadas quantidades equimolares de ambos os compostos, excesso de benzaldeído e excesso de piridina-4-carboxaldeído (TABELA 1).

TABELA 1 – PROPORÇÕES ENTRE PIRROL E ALDEÍDOS AVALIADAS PARA SÍNTESE

Condição	Pirrol (mmol)	Benzaldeído (mmol)	Piridina-4-carboxaldeído (mmol)
Condição 1	2	1	1
Condição 2	4	3	1
Condição 3	4	1	3

FONTE: O autor (2012)

Em um balão volumétrico de fundo redondo com capacidade de 50 mL, foram adicionados ácido propiônico (solvente e catalisador), pirrol, benzaldeído e piridina-4-carboxaldeído. As proporções foram adaptadas para reações empregando 2 mmol de pirrol inicialmente para facilitar a posterior separação dos compostos. Os respectivos volumes de cada reagente inseridos para cada condição estão descritos na Tabela 2.

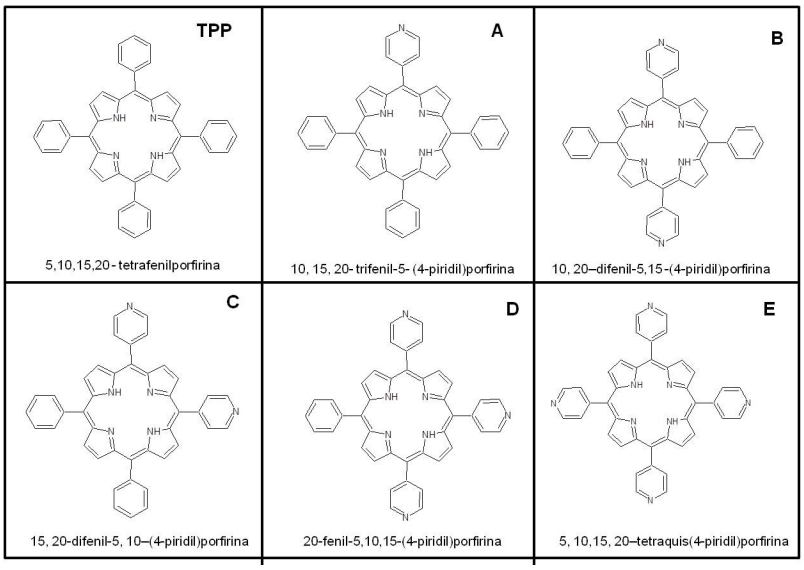
TABELA 2 – VOLUME DE REAGENTES E SOLVENTE INSERIDOS EM CADA CONDIÇÃO AVALIADA

Condição	Pirrol (μL)	Benzaldeído (μL)	Piridina-4-carboxaldeído (μL)	Ácido propiônico (solvente) (mL)
1	140	100	106	5,0
2	140	148	56	5,0
3	140	50	160	5,0

FONTE: O autor (2012)

Posteriormente, o meio reacional foi inserido sob agitação em banho de glicerina a temperatura de refluxo (aproximadamente 145°C), a qual foi mantida por um período de uma hora. Inicialmente o meio reacional apresentou uma coloração amarela clara e, ao entrar em contato com a temperatura elevada adquiriu uma coloração escura.

A seguir, o meio reacional foi processado através de precipitação e separação das porfirinas por meio de filtração, sendo obtido um precipitado cristalino de coloração roxa, o qual contém seis compostos (QUADRO 6).



QUADRO 6 – DERIVADOS PORFIRÍNICOS OBTIDOS A PARTIR DA CONDENSAÇÃO ENTRE PIRROL, BENZALDEÍDO E PIRIDINA-4-CARBOXALDEÍDO
FONTE: O autor (2012)

Dentre esses derivados porfirínicos, cinco são os compostos de interesse a serem quaternizados (A-E), os quais foram separados através de cromatografia em coluna empregando como fase estacionária sílica gel. Para a primeira separação – derivados TPP, A e B – foi utilizado clorofórmio como fase móvel. A seguir, a coluna

foi eluída com metanol e o solvente evaporado. O resíduo obtido contendo a mistura de C, D e E foi inserido em uma segunda coluna, utilizando como fase móvel clorofórmio/metanol (98/2 v/v) para separação dos demais derivados.

A avaliação da separação foi realizada através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) com a utilização de placas de alumínio contendo sílica gel aderida, atuando como fase estacionária. A mistura foi dissolvida em clorofórmio e, com o auxílio de um capilar, aplicada na placa, a qual foi submetida ao procedimento em câmara contendo aproximadamente 2 mL de cada fase móvel utilizada (clorofórmio ou clorofórmio metanol 98:2 v/v).

3.2.1.2 Caracterização por espectrometria de massas (MALDI-TOF)

As amostras foram previamente adicionadas da matriz HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinamínico) para realização destas análises. Os espectros de massas foram obtidos com o espectrômetro MALDI-TOF/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics), empregando o programa FlexControl 2.0 (Bruker Daltonics). Foi empregado modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de laser e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 300 – 2000 Da. A análise e tratamento dos espectros foram realizados com o auxílio do programa FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltonics).

3.2.1.3 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos com o espectrômetro BRUKER Avance DRX 400, operando na frequência base de 400,13 MHz para o núcleo de ^{1}H. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados, $CDCl_3$ no caso das porfirinas em sua forma neutra e $DMSO_{d6}$ para os compostos quaternizados. A seguir, as soluções foram inseridas em tubos de 5 mm de diâmetro para análise a temperatura de 30ºC. Os deslocamentos químicos expressos em ppm foram determinados com base no sinal central dos solventes

deuterados: $CDCl_3$ a 7,27 ppm e $DMSO_{d6}$ a 2,50 ppm. A análise dos espectros foi realizada com o auxílio do programa ACD Labs 12.0 – 1D NMR processor.

3.2.1.4 Cationização

O processo de cationização foi realizado de acordo com uma modificação da metodologia descrita por Casas e colaboradores (1993), a qual emprega dimetilformamida (DMF) como solvente e um largo excesso de iodeto de metila, traduzido por uma proporção de 120 equivalentes em relação ao derivado porfirínico. A reação descrita foi mantida a temperatura ambiente “overnight” e monitorada por CCD empregando como fase móvel uma mistura 95/5 (v/v) de clorofórmio: etanol.

3.2.1.5 Armazenamento e utilização na PDI

As soluções estoque (1 mM) dos compostos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e acondicionadas a 4 ºC em frasco âmbar. Para utilização na PDI, esses compostos foram diluídos a concentrações teste determinadas de acordo com a seguinte equação:

=

Onde:

Ci = concentração inicial do derivado porfirínico (1000 μM)

Vi = volume de solução estoque a ser utilizada (μL);

Cf = concentração de derivado a ser testada (μM);

Vf = volume final do meio reacional da PDI (5000 μL).

Foram avaliadas quatro concentrações teste para cada fotossensibilizador, estabelecidas em 5, 10, 15 e 25 μM.

3.2.2 Procedimento e avaliação da PDI

Os ensaios de PDI foram realizados de acordo com adaptações na metodologia descrita por Gomes e colaboradores (2011) para conídios do fungo *Penicillium chrysogenum.* Foram avaliadas as concentrações teste aliadas a dois tratamentos controle e um tratamento com ausência de qualquer componente da PDI, denominado “branco”. Os controles foram realizados empregando isoladamente luz ou fotossensibilizador sobre os conídios de *C. graminicola*. O primeiro foi o denominado controle claro e o segundo, controle escuro. No caso do último, foi empregada a maior concentração teste avaliada na PDI, 25 μM. Os procedimentos foram realizados de maneira idêntica para ambas as concentrações de suspensão conidial previamente padronizadas.

Para os experimentos foram empregadas microplacas estéreis para cultura de tecidos contendo seis poços. Durante os ensaios, essas foram mantidas sob agitação magnética e em um recipiente contendo gelo, para evitar aquecimento do meio reacional e interferência no procedimento. Em cada poço da microplaca foi realizada uma avaliação, de modo que uma microplaca foi utilizada para avaliação de quatro concentrações teste e dois controles (FIGURA 11).

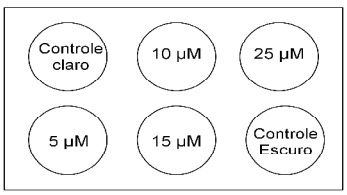


Figura 11 – Esquema de identificação das placas para realização da PDI
FONTE: O autor (2011)

O volume final para cada poço das microplacas para cultura de tecidos estabelecido foi 5,0 mL, empregando tampão fosfato salina (PBS) como diluente (GOMES *et al*., 2011). Na obtenção do meio reacional para testes e controles, foram inseridos em cada poço volumes específicos de cada componente: PBS, suspensão de conídios e fotossensibilizador.

O “branco” foi realizado em tubo de ensaio estéril com capacidade para 20 mL através da adição de 100 μL de cada suspensão de conídios a 4,9 mL de PBS seguida de homogeneização em vórtex.

A incidência de luz em cada poço da placa foi realizada empregando como fonte luminosa a lâmpada Lumacare LC 122A (FIGURA 12) com intensidade de 100 mW/cm², durante um período de vinte minutos para cada poço isoladamente.

Figura 12 – Lâmpada Lumacare modelo LC 122A
FONTE: Lumacare (2012)

Foram recolhidas amostras de 100 μL do meio reacional nos períodos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos e distribuídas em duplicata em placas de Petri contendo meio de cultura Agar Sabouraud Dextrosado, homogeneizadas com o auxílio de alça de Drigalski e incubadas em estufa BOD a 30 ± 2ºC por um período de 48 horas sob condições de luz fluorescente intermitente (12 horas). Após esse período foi realizada contagem das colônias, multiplicação pelo fator de diluição e cálculo do log UFC/mL. Todos os resultados foram expressos em escala logarítmica. Foram realizados três experimentos independentes para as porfirinas Mono-Py^+ e Tetra-Py^+ e dois experimentos independentes para os demais derivados avaliados.

3.2.3 Análise gráfica e estatística

Foram realizadas com o auxílio do programa Prisma 5.0. A análise gráfica foi realizada empregando gráfico em colunas demonstrando o respectivo desvio padrão obtido nos experimentos independentes. Foram plotados gráficos isolados para cada concentração teste de fotossensibilizador relacionando branco, controles e a PDI para ambas as concentrações de suspensão conidial avaliadas. A análise estatística foi realizada através do teste de Newman-Keuls, com nível de significância de $p<0,05$. Os gráficos obtidos para ambas as concentrações de conídios foram agrupados entre si e com os controles para facilitar a visualização dos resultados.

3.3 ENSAIOS FOTOFÍSICOS

3.3.1 Fotoestabilidade dos derivados porfirínicos

Estudos relacionados à fotoestabilidade dos fotosensibilizadores foram realizados através de uma solução aquosa de cada derivado. Tais soluções foram submetidas à irradiações nas mesmas condições àquelas utilizadas para os ensaios biológicos de PDI e foi considerado o espectro UV-visível em diferentes tempos de irradiação. A absorbância foi mensurada entre 350- 800 nm a cada minuto durante 4 minutos, a cada 2 minutos até completar 10 minutos, após esse período a cada 5 minutos até completar 20 minutos de irradiação. Os experimentos foram realizados em duplicata empregando espectrofotômetro Shimadzu 1800 UV e interpretados com o auxílio do programa UV Probe 2.3.

3.3.2 Estudos de geração de oxigênio singlete

Foram realizados de acordo com metodologia descrita por Hadjur e colaboradores (1998). Uma solução estoque de cada derivado porfirínico na concentração de 0,1 mM e outra de 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF) com concentração de 10 mM foram preparadas utilizando DMF:água (9:1). Em células de quartzo, foram preparados 2 mL de solução contendo DFiBF 50 μM e porfirina 0,5 μM, em DMF/H_2O 9:1. As células foram irradiadas com luz em intensidade de 9,0 mW/cm^2 e comprimento de onda 550-800 nm. Durante a irradiação, as soluções foram mantidas sob agitação magnética em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 415 nm com o auxílio de espectrofotômetro Shimadzu 1800 UV a cada minuto durante os quinze minutos iniciais e posteriormente após vinte minutos de irradiação. A porcentagem de redução da absorbância pelo DFiBF, proporcional à produção de $^1O_2$, foi calculada por comparação entre a absorbância inicial da solução ao tempo zero de irradiação e a absorbância registrada ao fim de cada período de irradiação avaliado.

3.4 ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O ensaio foi realizado a partir de uma adaptação da Norma M38-A (CLSI, 2002), que determina o procedimento de avaliação de agentes antifúngicos em fungos filamentosos. Inicialmente foi preparada uma suspensão de conídios em tampão PBS e padronizada à concentração de 10^4 conídios/mL. Para realização dos ensaios foram empregadas microplacas de 96 poços. Foram inseridos 100 μL de caldo RPMI nas colunas 1 a 11 e 200 μL na coluna 12 em todas as linhas. A seguir foram adicionados 100 μL da solução estoque de porfirina na coluna 1. Após homogeneização foram retirados 100 μL da mistura (meio + porfirina) e inseridos na coluna seguinte (2). O procedimento foi repetido até a coluna 10 da primeira linha seguindo da coluna 1 até a coluna 10 da segunda linha, totalizando dezenove transferências. Portanto, para cada derivado foram utilizadas duas linhas da placa (FIGURA 13).

	Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11*	12**
Mono-Py$^+$	A												
	B												
Di-*trans*-Py$^+$	C												
	D												
Di-*cis*-Py$^+$	E												
	F												
Tri-Py$^+$	G												
	H												

Figura 13 – Estrutura da microplaca utilizada para os ensaios de CIM
FONTE: O autor (2012)
NOTA: *: controle positivo; **: controle negativo.
Para o derivado Tetra-Py$^+$ foi empregada microplaca adicional.

A seguir, foram adicionados 100 μL da suspensão conidial previamente preparada em cada poço da microplaca, exceto nos poços da coluna 12, que correspondem ao controle negativo. A seguir, as placas foram incubadas em estufa a 35°C por um período de quatro dias.

3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA

Após a leitura das microplacas, para avaliação da atividade fungicida, cada poço foi homogeneizado com auxílio de agulha flambada e a seguir, uma placa molde contendo Agar Sabouraud dextrosado (FIGURA 14) foi perfurada nos respectivos poços.

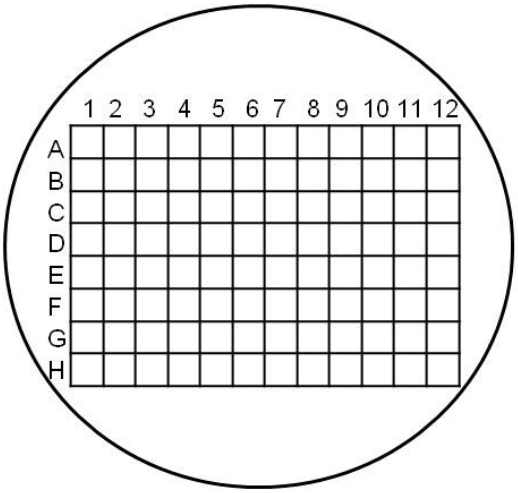


Figura 14 – Esquema da placa de Petri molde de Agar Sabouraud dextrosado
FONTE: O autor (2012)

Esse procedimento foi repetido para todos os 96 poços da microplaca. A seguir, as placas foram incubadas nas mesmas condições anteriores e avaliadas posteriormente. Nos locais do molde onde não há crescimento considera-se que a droga exerce ação antifúngica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DAS *MESO*-TETRA-ARILPORFIRINAS CATIÔNICAS

As etapas para obtenção dos derivados empregados como fotossensibilizadores estão indicadas na figura 15.

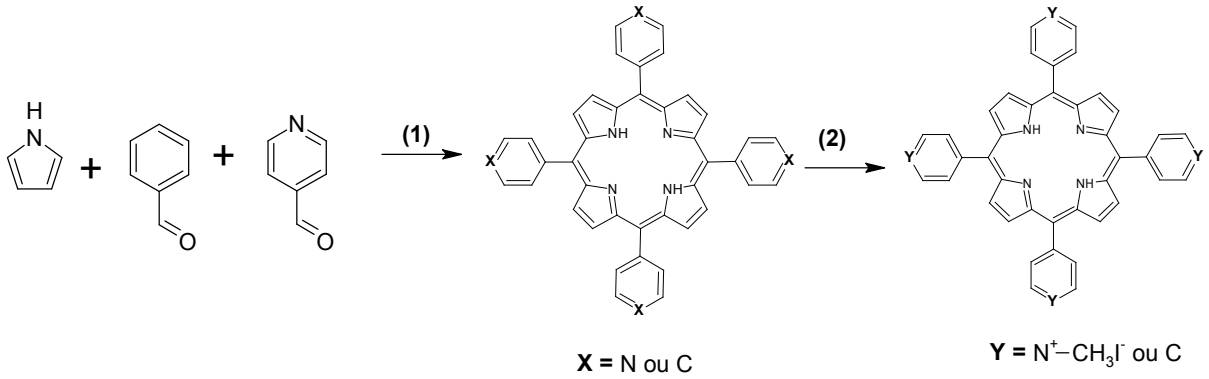


Figura 15 – Esquema das etapas de síntese das *meso*-tetra-arilporfirinas catiônicas avaliadas como fotossensibilizadores
FONTE: O autor (2013)
NOTA:(1): ácido propiônico/refluxo, 1h
(2): N,N-dimetilformamida, CH_3I/temperatura ambiente, “overnight”.

4.1.1 Síntese dos derivados na forma neutra

A síntese da série de derivados porfirínicos foi realizada de acordo com uma adaptação da metodologia inicialmente proposta por Adler e colaboradores (1967) para a síntese da *meso*-tetrafenilporfirina (TPP). Os autores empregaram uma mistura de pirrol e benzaldeído em refluxo em ácido propiônico, com temperatura aproximada de 141°C, por um período de trinta minutos. A condensação desses dois compostos resulta na obtenção do núcleo básico das porfirinas substituído nas posições *meso* por anéis aromáticos, provenientes do benzaldeído (FIGURA 16).

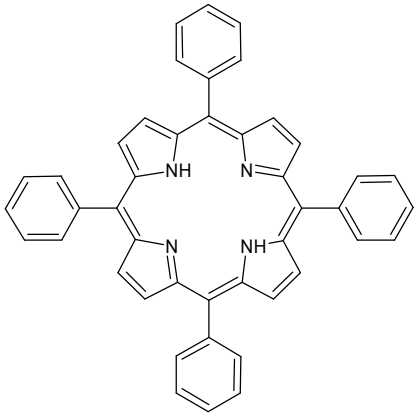


Figura 16 – Estrutura química da Tetrafenilporfirina (TPP).
FONTE: O autor (2011)

Segundo os autores, o mesmo procedimento pode ser adaptado para a obtenção de diversas outras porfirinas *meso*-substituídas, geralmente com substituintes aromáticos, como o caso dos anéis piridínicos.

A piridina se relaciona eletronicamente ao benzeno, pois a junção de um elétron proveniente do nitrogênio com os cinco elétrons provindos dos cinco átomos de carbono confere à piridina um sexteto de elétrons, como o presente no benzeno (SOLOMONS; FRYHLE, 2001) (FIGURA 17).

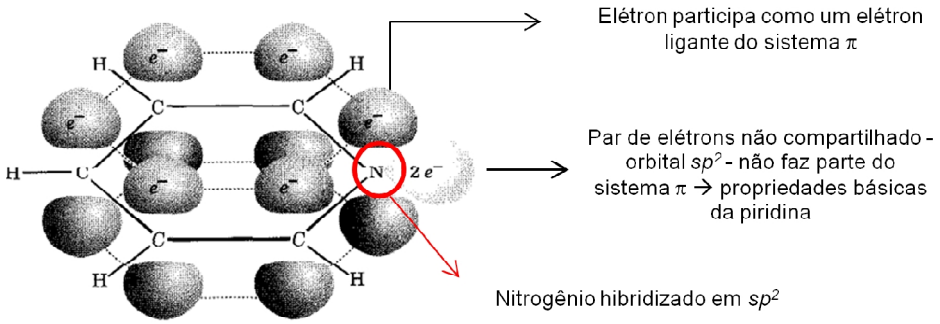


Figura 17 – Estrutura da piridina relacionando aromaticidade e basicidade
FONTE: Adaptado de Solomons e Fryhle (2001).

Sendo assim, o emprego de uma mistura de pirrol e um aldeído derivado da piridina – piridina-4-carboxaldeído – nas mesmas condições reacionais descritas por Adler e colaboradores (1967) resulta na formação da porfirina *meso* - tetra substituída *tetraquis*(4-piridil) porfirina (FIGURA 18).

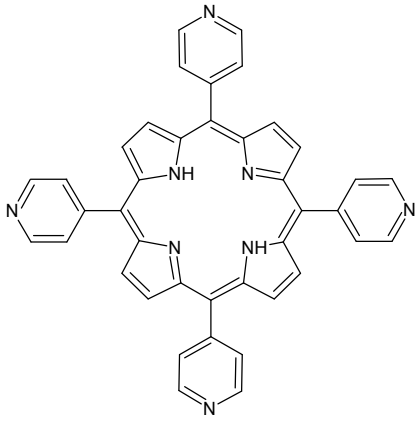


Figura 18 – Estrutura química da *tetraquis*(4-piridil)porfirina.
FONTE: O Autor (2011)

Para o presente estudo, no entanto, foi almejada a síntese de uma família de derivados porfirínicos que contêm substituições “mistas” nas posições *meso*, incluindo anéis benzênicos e piridínicos. A mistura de pirrol, benzaldeído e piridina-4-carboxaldeído ocasiona a condensação e a formação dos compostos de interesse. Estas condições foram descritas por Fleischer e Shachter (1991); Meng, James e Skov (1994) e Zimmerman e colaboradores (2003) e, dessa maneira, são obtidos seis derivados porfirínicos (QUADRO 6, p.45).

Os rendimentos dos derivados obtidos pelos autores foram expressos de duas maneiras. A primeira se relaciona a cálculos envolvendo quantidades molares empregando a proporção pirrol:porfirina 4:1 (MENG, JAMES E SKOV (1994, ZIMMERMAN*, et al.*, 2003) (QUADRO 7), e a segunda relaciona diretamente a quantidade de produto com a quantidade total de precipitado cristalino obtido (FLEISCHER; SHACHTER, 1991) (QUADRO 8).

Autor	**TPP**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
Meng, James e Skov (1994)	7,5	9,0	4,5	1,5	2,0	1,0
Zimmerman e colaboradores (2003)	-----	2,9	0,7	1,2	2,3	-----

QUADRO 7 – RENDIMENTOS PERCENTUAIS OBTIDOS PELOS AUTORES CALCULADOS ATRAVÉS DE QUANTIDADES MOLARES.
FONTE: Adaptado de Meng, James e Skov (1994) e Zimmerman e colaboradores (2003).
NOTA: As estruturas dos compostos TPP, A, B, C, D e E constam no quadro 6, p. 45.

Autor	**TPP**	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
Fleischer e Shachter (1991)	30	20	2	8	15	25

QUADRO 8 – RENDIMENTOS PERCENTUAIS OBTIDOS PELOS AUTORES CALCULADOS ATRAVÉS DE PROPORÇÃO NO PRECIPITADO CRISTALINO.
FONTE: Adaptado de Fleischer e Shachter (1991)
NOTA: As estruturas dos compostos TPP, A, B, C, D e E constam no quadro 6, p. 45.

Nesse contexto, para fins de comparação, para as três condições avaliadas no presente estudo (TABELA 1, p. 44) os rendimentos foram calculados com base nas duas formas e estão descritos nas tabelas 3 e 4.

TABELA 3 – RENDIMENTOS PERCENTUAIS CALCULADOS ATRAVÉS DE QUANTIDADES MOLARES

Condição	TPP	A	B	C	D	E
1	3,1	2,7	0,4	1,4	3,4	2,7
2	5,4	4,8	0,5	1,6	0,4	0,2
3	0,3	0,9	1,1	1,0	3,1	2,5

FONTE: O autor (2012)
NOTA: As estruturas dos compostos TPP, A, B, C, D e E constam no quadro 6, p. 45.

TABELA 4 – RENDIMENTOS PERCENTUAIS CALCULADOS ATRAVÉS DE PROPORÇÃO NO PRECIPITADO CRISTALINO

Condição	TPP	A	B	C	D	E
1	22	19	3	10	24	22
2	40	35	4	12	3	1
3	3	10	13	12	37	30

FONTE: O autor (2012)
NOTA: As estruturas dos compostos TPP, A, B, C, D e E constam no quadro 6, p. 45.

A condição 1 assemelha-se àquela empregada por Meng, James e Skov (1994). Todos os derivados foram obtidos com rendimentos inferiores àqueles evidenciados pelos autores especialmente em relação aos derivados menos polares (TPP, A e B) (QUADRO 6, p.45), os quais foram obtidos em quantidade inferior. Por sua vez, na condição 1 foi observada quantidade similar de C e um aumento progressivo dos derivados D e E.

Por sua vez, Zimmerman e colaboradores (2003) obtiveram rendimentos similares para os derivados B e C, porém superior para A e inferior para D (condição 2). Nesse caso, as diferenças observadas podem ser devidas ao tempo de reação, visto que os autores empregaram tempo de 1,5 horas, o que ocasiona modificações no meio reacional comparando com um tempo inferior de reação (1 hora).

Já em relação a Fleischer e Shachter (1991), os rendimentos seguiram as mesmas proporções para os derivados menos polares ocorrendo inversão, ou seja, menor quantidade apenas para os derivados D e E.

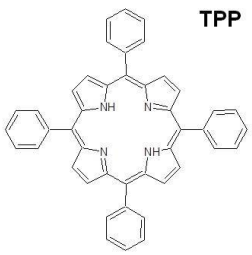
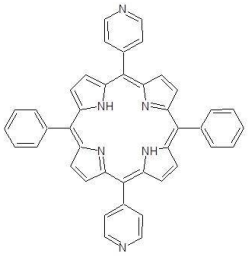
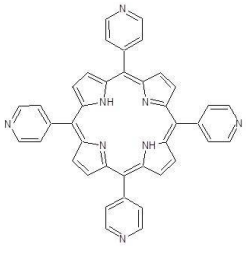
A condição 3 foi avaliada para comparação da obtenção dos derivados com as condições anteriormente descritas. Foi realizada empregando proporções inversas às descritas pelos autores nos quais foi baseada a condição 2. O objetivo

da avaliação consistiu na visualização da influência da proporção dos reagentes no processo. De acordo com os dados obtidos, foi observado que a mais elevada proporção de determinado aldeído resulta na formação dos derivados correspondentes, estando os intermediários B e C com proporções relativamente constantes. Sendo assim, a condição 2 resulta na maior formação de TPP e A ao passo que a condição 3 resulta em maior obtenção de D e E. Tais dados comprovam que a maior disponibilidade de benzaldeído ou piridina-4-carboxaldeído acarreta na condensação preferencial com pirrol resultando no aumento dos derivados correspondentes.

Os baixos rendimentos obtidos estão em concordância com dados descritos na literatura e são consequência da formação de subprodutos no meio reacional, os quais são provenientes de condensação parcial, polimerização ou mesmo da formação de agregados de porfirinas. Essas impurezas são eliminadas no procedimento de processamento do meio reacional.

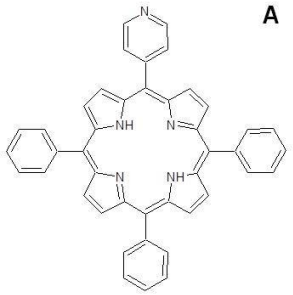
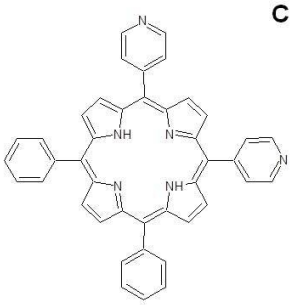
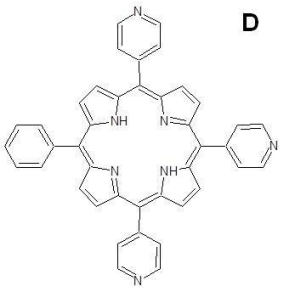
4.1.2 Processamento do meio reacional e separação dos derivados

Apesar da similaridade estrutural, as *meso*-tetra-arilporfirinas obtidas demonstram variações relacionadas à simetria e polaridade que interferem diretamente nesses dois processos. Em relação ao primeiro, dentre os seis compostos obtidos, três são considerados simétricos e ao ser traçado um plano imaginário que divide a molécula de posição *meso* a *meso*, as metades obtidas são uma imagem especular uma da outra. Tais compostos são: TPP, B e E (QUADRO 9).

TPP	B	E
		
5,10,15,20- tetrafenilporfirina	10, 20–difenil-5,15-(4-piridil)porfirina	5, 10,15, 20–tetraquis(4-piridil)porfirina

QUADRO 9 – DERIVADOS PORFIRINICOS SIMÉTRICOS EM SUA FORMA NEUTRA
FONTE: O Autor (2012)

Os demais são assimétricos, não apresentando as características de simetria molecular descritas acima. A assimetria dos compostos A, C e D (QUADRO 10) remete a uma variação no momento dipolar da molécula, resultando em um aumento na polaridade desses.

A	C	D
		
10, 15, 20- trifenil-5- (4-piridil)porfirina	15, 20-difenil-5, 10–(4-piridil)porfirina	20-fenil-5,10,15-(4-piridil)porfirina

QUADRO 10 – DERIVADOS PORFIRINICOS ASSIMÉTRICOS EM SUA FORMA NEUTRA
FONTE: O Autor (2012)

Além da simetria, através da comparação dos substituintes nas posições *meso* do macrociclo porfirínico podem ser observadas diferenças significativas nas polaridades dos diferentes derivados. Tal fato decorre diretamente das diferenças químicas existentes entre o anel benzênico e o anel piridínico. O primeiro se apresenta altamente apolar, visto que há somente a presença de átomos de carbono e hidrogênio, não contribuindo para alterações no momento dipolar do anel. Ao contrário, o anel piridínico se apresenta como uma estrutura heteroaromática e, devido à presença do átomo de nitrogênio, há uma variação no momento dipolar do composto. Tal fato pode ser comprovado através da observação dos momentos dipolares dos compostos: 0,8 para o benzeno e 1,59 para a piridina. O aumento do momento dipolar dos substituintes remete a um aumento na polaridade global do derivado porfirínico. Quanto maior o número de substituintes piridínicos e menor de anéis benzênicos nas posições *meso* do macrociclo mais elevada é a polaridade. Nesse contexto, pode ser inferido um aumento na polaridade dos derivados obtidos na seguinte ordem: TPP<A<B<C<D<E.

Em relação ao processo de purificação, após o período de refluxo o meio reacional apresenta uma coloração enegrecida, não sendo possível a distinção dos derivados porfirínicos. Porém, em etapa posterior ao resfriamento, o precipitado cristalino é obtido diretamente (ADLER *et al.*, 1967) e pode ser separado por

filtração seguida por lavagem com solvente apropriado para não ocasionar dissolução das porfirinas.

Para auxiliar o processo da obtenção do precipitado foi utilizada a técnica descrita por Meng, James e Skov (1994) empregando acetona como solvente de lavagem, seguindo as seguintes etapas:

1. Após o término do período de uma hora em refluxo, retira-se parte do ácido propiônico do meio reacional utilizando a temperatura de refluxo;
2. Resfriamento do meio até a temperatura ambiente;
3. Adição de aproximadamente 5 mL de acetona sob agitação;
4. Filtração em disco de papel de filtro e lavagem com acetona;
5. Secagem do precipitado em estufa a temperatura de 50°C por 24 horas.

A purificação baseada em tal metodologia ocasionou resultados adequados para todas as condições avaliadas. A acetona, com suas características de solvente polar aprótico e com constante dielétrica com valor 21 (SOLOMONS; FRYHLE, 2001) não proporcionou dissolução do produto cristalino, permitindo a obtenção de todos os derivados adequadamente.

O processo original empregado por Meng, James e Skov (1994) foi modificado na etapa da retirada inicial de parte do solvente da reação, o que não foi realizado pelos autores, que efetuavam a separação do precipitado inicial por filtração, seguindo posteriormente as etapas de 2 a 5 e junção dos precipitados obtidos após secagem ao ar. Tal variação foi necessária, pois durante a separação dos compostos em coluna cromatográfica, foi observado que a presença do ácido propiônico – mesmo após o processo de lavagem – dificulta a separação, acarretando variação na retenção dos compostos na coluna. Por isso, a retirada de parte do ácido propiônico logo após o término do período de uma hora, seguida da precipitação com solventes acarretou melhora no processo da separação e por isso foi empregada.

Por sua vez, a separação dos derivados presentes no precipitado cristalino foi realizada de acordo com metodologia adaptada em relação àquela empregada por Zimmerman e colaboradores (2003) utilizando a técnica de cromatografia em coluna. Inicialmente foi realizada uma CCD dos padrões com a fase móvel clorofórmio:metanol (98/2 v/v). Os compostos foram adequadamente separados, apenas D e E demonstraram tempo de retenção (Rf) próximos. O procedimento em coluna foi realizado de maneira idêntica ao realizado pelos autores, empregando

duas colunas de sílica gel (2 x 16 cm), a primeira apresentando clorofórmio como fase móvel e a segunda, a mistura de clorofórmio:metanol (98/2 v/v).

A primeira coluna proporcionou a separação dos compostos na seguinte ordem: TPP, A, B e C. A inversão da retirada dos dois derivados dipiridilados está divergente da observada pelos autores, mas é justificada pela polaridade e simetria dos compostos. No composto B, as substituições pelos anéis piridínicos se encontram em lados opostos do macrociclo, portanto, esse composto é simétrico e consequentemente, menos polar. Por sua vez, o derivado C apresenta assimetria e polaridade mais elevada, uma vez que as substituições com anéis piridínicos se encontram em posições *meso* vizinhas (FIGURA 19).

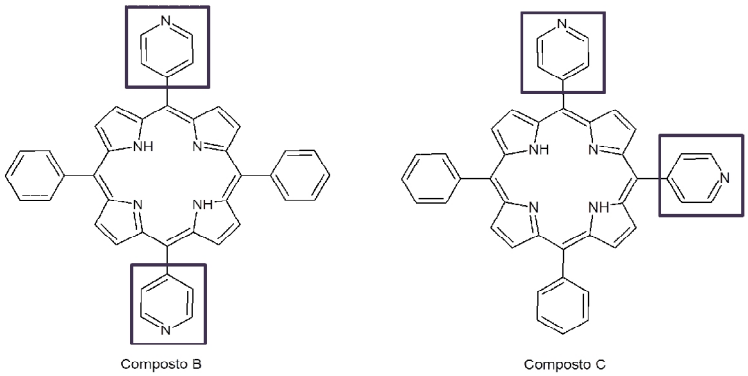


Figura 19 – Estruturas químicas das porfirinas dipiridiladas e suas diferenças
FONTE: O autor (2012).

O processo cromatográfico foi acompanhado por CCD utilizando como parâmetro o Rf dos padrões obtidos anteriormente. Em etapa posterior ao isolamento, o solvente foi evaporado em rotaevaporador e as porfirinas, armazenadas ao abrigo da luz.

Após a retirada dos quatro primeiros compostos, a mistura entre D e E - que não migra na primeira coluna - foi extraída com metanol e o solvente foi evaporado. A seguir, os derivados na mistura foram solubilizados em clorofórmio:metanol (98/2 v/v) e inseridos na segunda coluna, a qual empregou essa mistura de solventes como fase móvel. Da mesma maneira do que a relatada por Zimmerman, e colaboradores (2003), os compostos D e E foram separados de maneira satisfatória, sendo E o último a ser eluído.

Na primeira coluna, para o composto C (mais polar que B), a interação com a fase móvel composta apenas por clorofórmio (apolar) é reduzida, acarretando

“arraste” da mancha. Tal fato ocasionou um tempo elevado para retirada do derivado, além de gasto excessivo de solvente (aproximadamente 300 mL). Sendo assim, uma modificação foi avaliada.

A distinção na metodologia está relacionada à eluição e separação de TPP, A e B na primeira coluna, seguida da extração com metanol e inserção na segunda coluna, sendo isolados os derivados C, D e E ao invés de somente os dois últimos (FIGURA 20). Essa modificação acarretou separação adequada com reduzido gasto de solvente, pois o composto C interage de maneira mais eficiente com a fase móvel empregada na segunda coluna, evitando o arraste e gastos desnecessários de solvente. Nesse caso, a eluição sequencial de ambas as fases móveis em apenas uma coluna ocasionou a mistura dos derivados C e D e a ausência da eluição de E, por isso, foi necessário o emprego da segunda coluna.

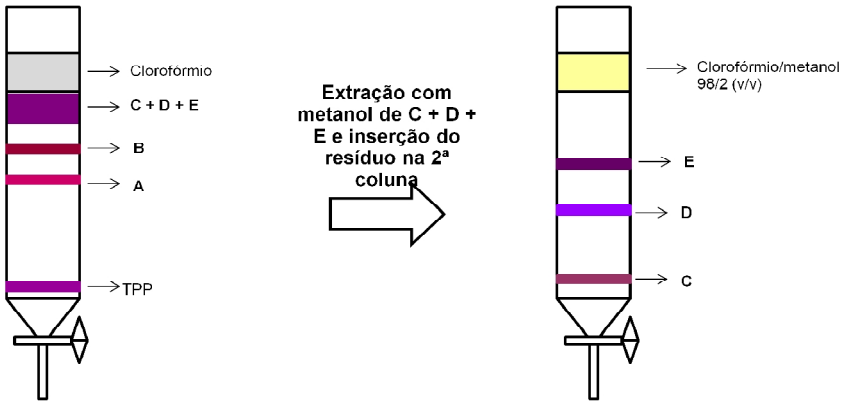


Figura 20 – Esquema de separação na metodologia adaptada de Zimmermann e colaboradores (2003).
FONTE: O autor (2012)

4.1.3 Caracterização por MALDI-TOF e RMN de 1H

Os derivados na forma neutra foram identificados e se encontram em conformidade com a literatura (MENG; JAMES; SKOV, 1994). Os respectivos espectros se encontram nos anexos 1, 2, 3 e 4.

4.1.4 Cationização

A cationização dos derivados porfirínicos previamente obtidos representa um tipo reação química de substituição nucleofílica. No caso da piridina, a reação é denominada quaternização de Menschutkin, a qual ocorre entre uma amina terciária e um haleto de alquila. O anel piridínico apresenta comportamento semelhante a aminas trissubstituídas, apesar das primeiras apresentarem maior basicidade (trietilamina - pka ~10) em relação à piridina pka ~5 (SLOMP, 2012). A característica básica assim como nucleofílica do anel é conferida pela presença do par de elétrons livre, que não participa do fenômeno da ressonância. Segundo Arnett e Reich (1980), o núcleo piridínico oferece um adequado controle dos fatores estéricos e eletrônicos com a presença de um centro nucleofílico claramente definido. Isso contribui para a facilidade na cationização da piridina quando comparada às demais aminas trissubstituídas.

Por essa razão, segundo Slomp (2012), a necessidade da base inorgânica, a qual geralmente está presente em quaternizações de aminas terciárias com a finalidade de neutralizar o ácido formado a partir da reação entre a amina e o haleto orgânico é muitas vezes dispensada pela própria reatividade do anel.

O término da reação foi visualizado pela ausência de migração do produto, uma vez que as cargas presentes nos produtos interagem predominantemente com a sílica, corroborando na ausência da migração na CCD.

Segundo Casas e colaboradores (1993), após o final da reação, o solvente deve ser retirado do meio reacional e em seguida, o resíduo deve ser resuspenso em metanol e precipitado com éter etílico.

O DMF é um solvente que apresenta elevada temperatura de ebulição (140°C) e reduzida temperatura de congelamento (-61°), o que dificulta sua retirada. Tal processo pode ocorrer por meio da utilização de uma bomba de vácuo com elevada potência, liofilização posterior ao congelamento ou utilização de elevadas temperaturas. Devido à ausência de bomba com elevada potência, aliada ao não congelamento do solvente nos congeladores usuais (temperatura de -20°C) assim como à dificuldade experimental observada no trabalho com temperaturas elevadas, o produto foi diretamente precipitado com éter etílico para separação, processo

utilizado por Gomes e colaboradores (2011). A seguir, o precipitado foi lavado com éter, filtrado em papel de filtro e seco em estufa a 50°C por um período de 48 horas.

Os rendimentos obtidos para os produtos quaternizados estão descritos na tabela 5.

TABELA 5 – RENDIMENTOS OBTIDOS PARA OS DERIVADOS QUATERNIZADOS

Derivado	**Rendimento (%)**
Mono-Py$^+$ (monometilado)	90
Di-*trans*-Py$^+$ (dimetilado)	38
Di-*cis*-Py$^+$ (dimetilado)	27
Tri-Py$^+$ (trimetilado)	60
Tetra-Py$^+$ (tetrametilado)	64

FONTE: O autor (2012)

As reações de quaternização são descritas como quantitativas, com rendimentos próximos a 100% (CASAS *et al*., 1993), valor similar ao obtido apenas para o derivado Mono-Py$^+$.

O emprego da precipitação direta com éter etílico objetiva purificar o produto e separá-lo do meio reacional através de filtração posterior. Em relação ao índice de polaridade, o qual representa uma medida da polaridade relativa de um solvente, o éter etílico adicionado apresenta um índice de 2,8, enquanto para o DMF, o valor consiste em 6,4, o qual é superior ao dobro do primeiro (PERFINITY, 2012). A adição de uma quantidade superior de éter etílico em relação ao DMF resulta na precipitação dos produtos pela diferença de polaridade existente entre os solventes.

A obtenção de rendimentos baixos está relacionada a um processo de precipitação aparentemente ineficiente para os derivados de polaridade intermediária e aqueles mais polares, os quais permanecem parcialmente solubilizados no solvente reacional mesmo com a adição do solvente apolar para precipitação por até três vezes. Aliado à precipitação, a utilização de discos de papel de filtro proporciona aderência dos compostos, uma vez que a celulose, devido à suas características de hidrofobicidade, interage com os compostos, que mesmo com suas cargas positivas, possuem a estrutura hidrofóbica básica das porfirinas.

Apesar dos baixos rendimentos, os produtos foram obtidos em quantidades satisfatórias para o emprego na PDI e, por essa razão, o processo de purificação não foi aperfeiçoado.

4.1.5 Caracterização dos compostos quaternizados por MALDI-TOF

As massas esperadas para os compostos quaternizados estão relacionadas na tabela 6.

TABELA 6 – MASSAS ESPERADAS PARA OS DERIVADOS PORFIRÍNICOS PIRIDILADOS EM SUA FORMA QUATERNIZADA

Porfirina	**Massa esperada (Da)**	**Massa [M-I*] (Da)**
Mono-Py$^+$	757,170	630,265
Di-*trans*-Py$^+$	900,093	646,283
Di-*cis*-Py$^+$	900,093	646,283
Tri-Py$^+$	1043,016	662,302
Tetra-Py$^+$	1185,940	678,320

Fonte: O autor (2012)
NOTA: * O número de átomos de iodo é variável de acordo com o número de nitrogênios quaternizados.

O espectro de MALDI-TOF (positivo) para o derivado Mono-Py$^+$ demonstra a presença de um íon molecular [H-I]$^+$ com *m/z* de 630 (FIGURA 21).

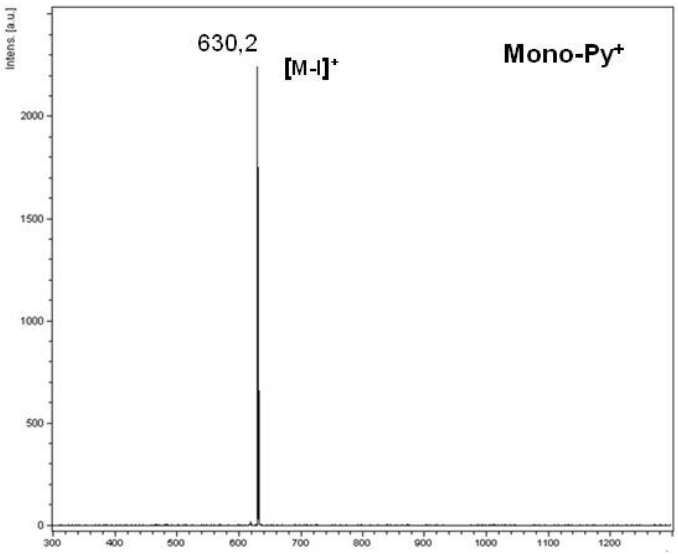


Figura 21 – Espectro de MALDI-TOF (modo positivo) de Mono-Py$^+$
FONTE: O autor (2012)

Os espectros de MALDI-TOF (modo positivo) para os derivados multicationizados demonstram fragmentações adicionais (FIGURA 22).

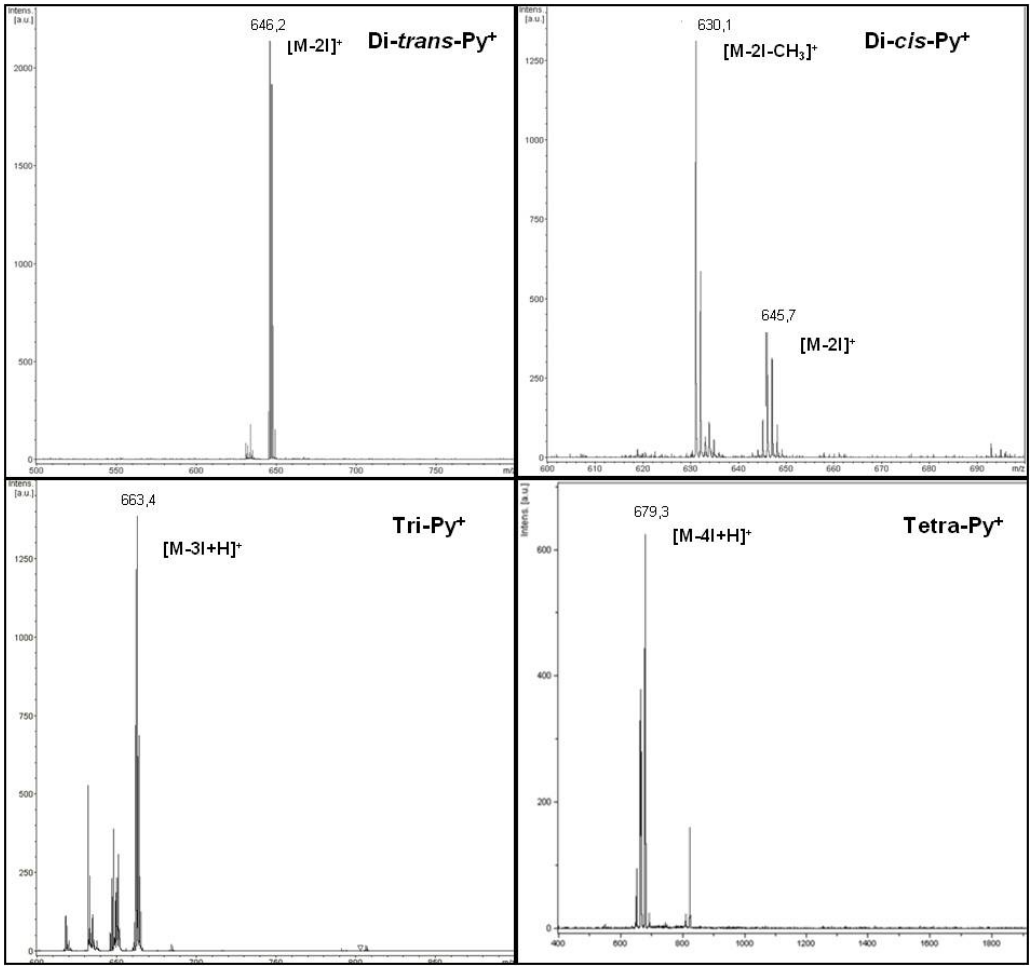


Figura 22 – Espectro de MALDI-TOF (modo positivo) dos derivados multicationizados Di-*trans*-Py^+ e Di-*cis*-Py^+ (acima) e Tri-Py^+ e Tetra-Py^+ (abaixo)
FONTE: O autor (2012)

O derivado diquaternizado na forma *trans* apresenta um íon molecular $[M-2I]^+$ com *m/z* de 646 e apenas alguns fragmentos com intensidade consideravelmente inferior. Por sua vez, o derivado diquaternizado na forma *cis* apresenta fragmentação superior, o que é evidenciado através da presença de um íon $[M-2I]^+$ de menor intensidade com *m/z* de 645 aliado um íon com intensidade comparável ao íon molecular observado para o derivado di-*trans*-Py^+ que apresenta *m/z* de 630, o qual se relaciona ao íon $[M-2I-CH_3]^+$.

O espectro de MALDI-TOF (modo positivo) para o derivado Tri-Py^+ demonstra a presença de um íon molecular $[H-3I+H]^+$ com *m/z* de 663. Em relação ao derivado tetraquaternizado, pode observado um íon molecular $[H-4I+H]^+$ com *m/z* de 679. Ambos os espectros mostram fragmentações adicionais.

A presença de inúmeros íons com intensidade considerável está presente em quantidades variáveis nos espectros dos diferentes derivados. Este perfil de

espectro de massas é característico de moléculas policationizadas, as quais podem ser decompostas na fase gasosa resultando em íons moleculares com diferentes tamanhos (KALDAPA *et al.*, 2000); SLOMP, 2012). De acordo com os espectros obtidos para os quatro derivados, maior fragmentação foi observada nas moléculas assimétricas (Di-*cis*-Py^+ e Tri-Py^+) em relação às simétricas, o que pode representar que moléculas policationizadas assimétricas sofrem maior decomposição e consequente maior fragmentação quando comparadas àquelas que exibem simetria molecular. Os espectros obtidos caracterizaram os produtos desejados.

4.1.6 Caracterização dos compostos quaternizados por RMN de H^1

Os sinais obtidos em ppm para os espectros de RMN de ^1H dos compostos cationizados, empregando $DMSO_{d6}$ como solvente estão listados na tabela 7.

TABELA 7 – SINAIS OBTIDOS NOS ESPECTROS DE RMN DE H^1 PARA OS DERIVADOS CATIONIZADOS RELACIONANDO AOS RESPECTIVOS ÁTOMOS DE HIDROGÊNIO.

Porfirina	Pirrólicos	3,4,5-fenil	2,6 – fenil	3,5 – piridil	2,6-piridil	N-pirrólico	Metila ligada ao N quaternizado
Mono-Py^+	9.00 d, 8.86 m, (4, 4)	7.86 m (9)	8.22 m (6)	9.43 d (2)	9.00 d (2)	-2.90 s (2)	4.69s (3)
Di-*trans*-Py^+	9.0 m (8)	7.89 m (6)	8.23m(4)	9.45 d (4)	9.00 d (4)	-2.96 s(2)	4.71 s(6)
Di-*cis*-Py^+	9.11 d, 9.00 m, 8.90 s (2, 4, 2)	7.89 m (6)	8.23 d(4)	9.49 d (4)	9.00 d (4)	-2.93 s(2)	4.71s (6)
Tri-Py^+	9.17 d, 9.00 d, (4, 4)	7.91 m (3)	8.23 m (2)	9.49 m (6)	9.07 d (6)	-2.99 s (2)	4.73s (9)
Tetra-Py^+	9.22 s (8)	---	---	9.49 d (8)	9.00 d (8)	-3.08 s (2)	4.74s (12)

FONTE: O autor (2012)
NOTA: Os valores entre parênteses indicam o número de hidrogênios correspondentes.

Os sinais com sinal negativo (TABELA 7, COLUNA 7) são correspondentes aos dois hidrogênios presentes no interior do macrociclo e aqueles descritos para os hidrogênios beta-pirrólicos (TABELA 7, COLUNA 2) caracterizam as porfirinas. Os sinais localizados em 2,50 e 3,33 ppm representam os sinais do solvente e da umidade presente nesse, respectivamente.

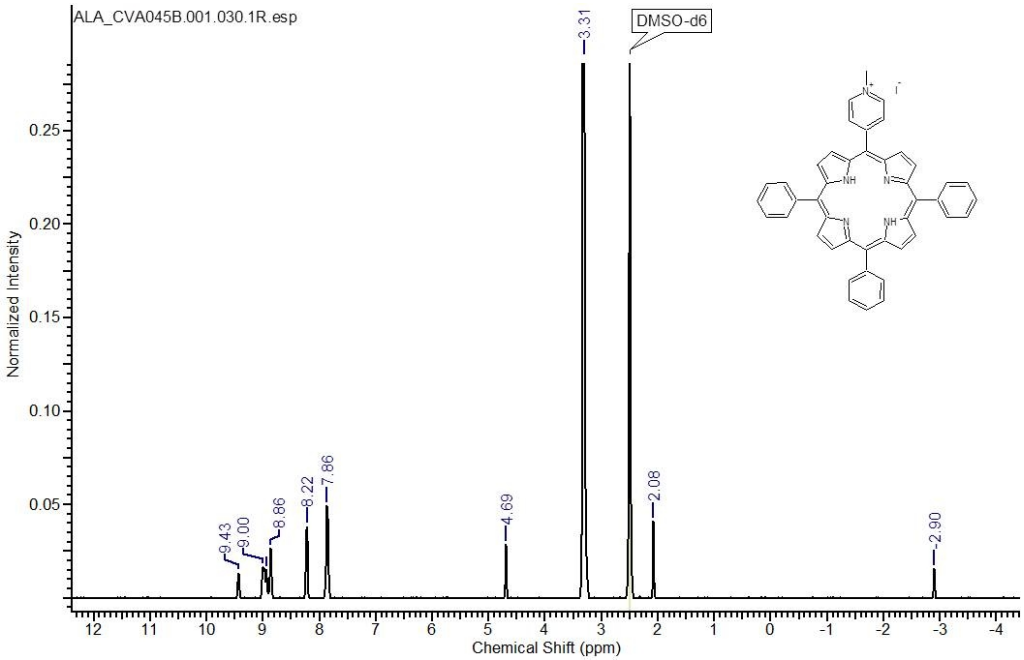


Figura 23 – Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Mono-Py^{+}
FONTE: O autor (2012)

O sinal presente na região de 2,08 ppm do espectro de RMN de H^{1} do derivado Mono-Py^{+} (FIGURA 23) corresponde à presença de acetona possivelmente presente no tubo no momento do preparo da amostra para análise, uma vez que esse solvente foi utilizado para lavagem do tubo.

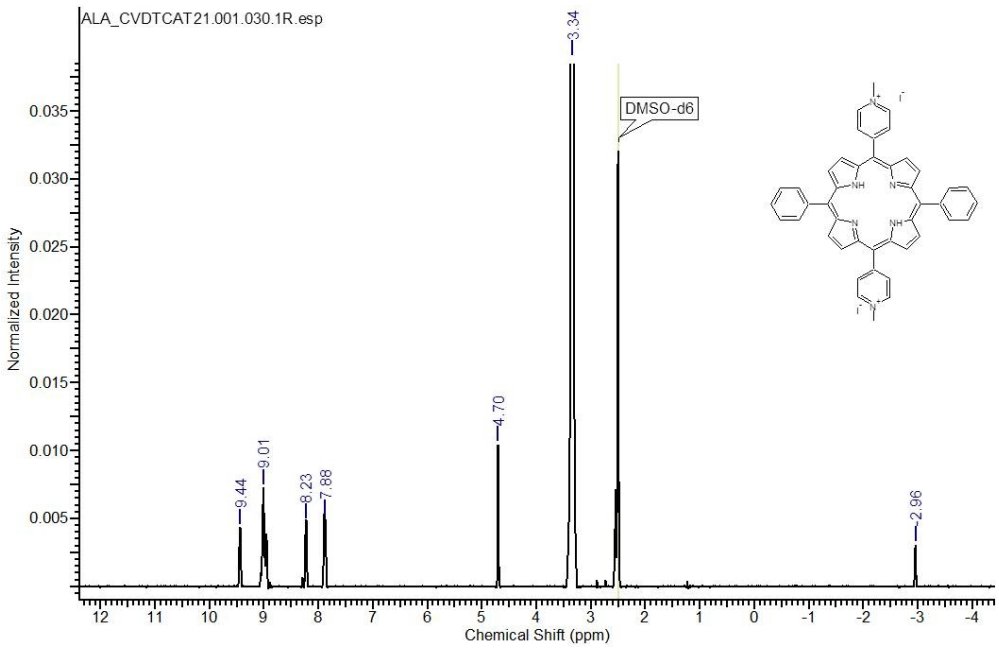


Figura 24 – Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Di-*trans*-Py^{+}
FONTE: O Autor (2012)

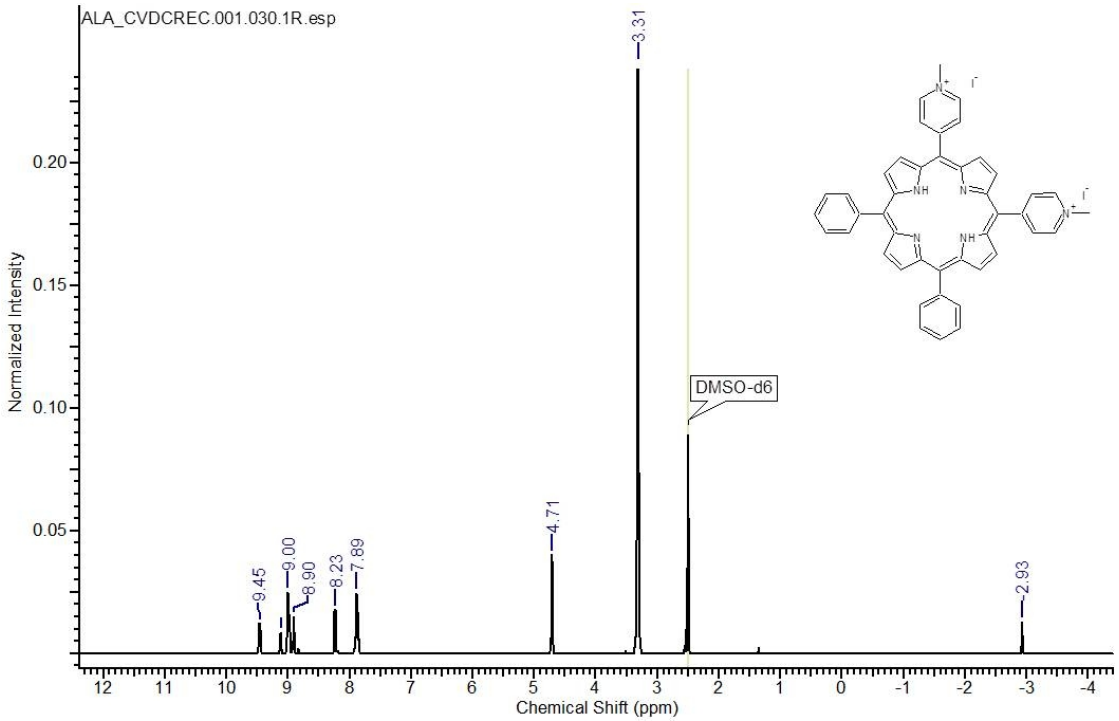


Figura 25 – Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Di-*cis*-Py^{+}
FONTE: O autor (2012)

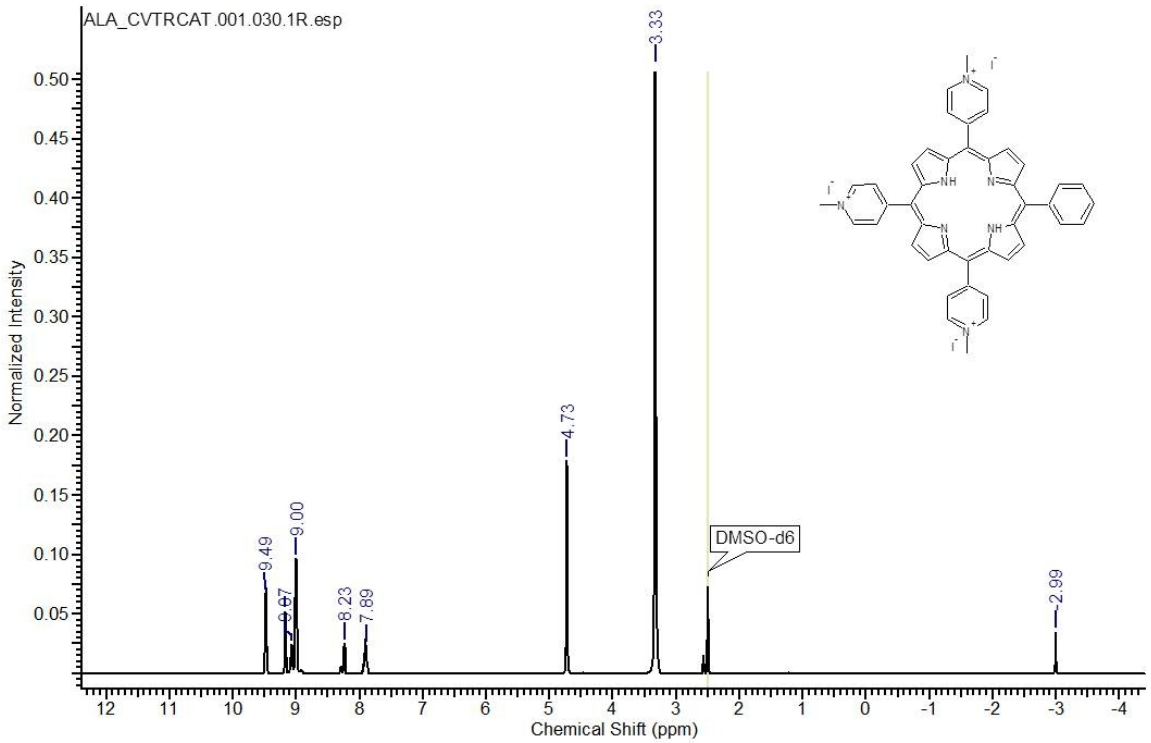


Figura 26 – Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Tri-Py^{+}
FONTE: O Autor (2012)

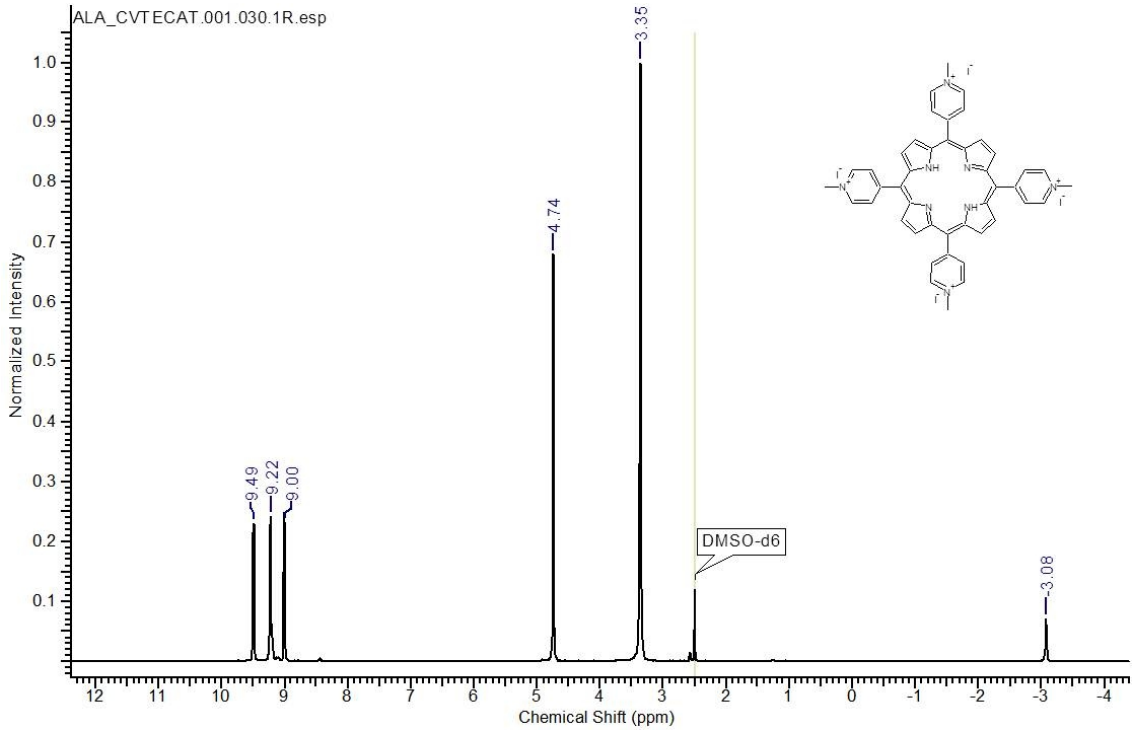


Figura 27 – Espectro de RMN de ^{1}H do derivado Tetra-Py^{+}
FONTE: O Autor (2012)

Os espectros de MALDI-TOF (modo positivo) dos derivados cationizados, aliados aos sinais característicos observados nos espectros de RMN de H^{1} confirmam as estruturas químicas e a identidade dos derivados, assim como demonstram a sua pureza, os tornando adequados para as avaliações biológicas.

4.2 ENSAIOS FOTOFÍSICOS

As propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores interferem diretamente nos procedimentos de PDI e estão intimamente relacionados à concentração do fotossensibilizador e no tempo de irradiação necessário para que a inativação dos micro-organismos seja significativa. Dentre essas, foram investigadas a fotoestabilidade e a capacidade de geração de oxigênio singlete.

4.2.1 Fotoestabilidade das *meso*-tetra-arilporfirinas catiônicas

Os valores de absorbância dos derivados porfirínicos cationizados foram obtidos inicialmente e periodicamente até o período máximo de irradiação de vinte minutos, como na PDI. Embora a localização exata das bandas dependa dos grupos substituintes e das posições do macrociclo nas quais esses se encontram (MILGROM, 1997), para um mesmo derivado, a avaliação do espectro de absorção inicialmente e após determinados períodos de irradiação permite avaliar a degradação fotoquímica das porfirinas.

Os espectros de absorção do período inicial e final, incluindo toda a faixa espectral avaliada se encontram na figura 28.

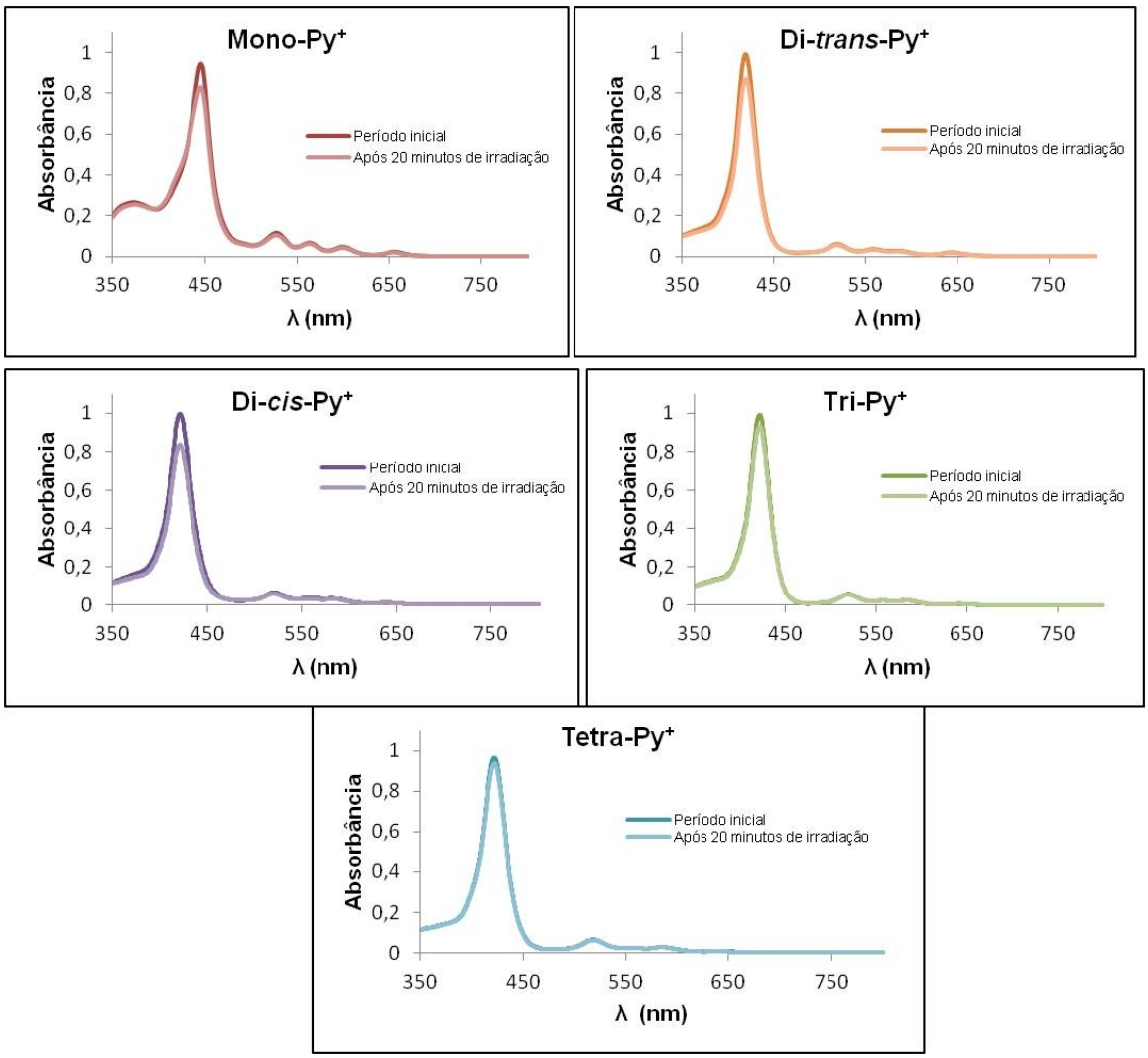


Figura 28 – Espectros de absorção dos derivados cationizados na região entre 350-800 nm no tempo inicial e após 20 minutos de irradiação a 100 mW/cm².
FONTE: O autor (2012)

A absorbância relacionada à banda Soret observada em todos os períodos está descrita em duplicata no anexo 5 e os espectros completos obtidos através do programa UVProbe 2.3, demonstrando todas as avaliações intermediárias se encontram no anexo 6.

As porfirinas podem sofrer modificações quando expostas à radiação ultravioleta. Estas modificações acarretam alterações das propriedades fotoquímicas desses compostos, interferindo em sua capacidade fotossensibilizante. Esse processo pode ser denominado como degradação fotoquímica e, em fotoquímica e fotobiologia, é definido por como a perda da intensidade de absorção ou emissão do composto ocasionada pela luz (BRASLAVSKY, 2007).

Para interpretação dos resultados e comparação da degradação fotoquímica das porfirinas, os valores do decaimento da absorbância da banda Soret de cada composto foram expressos em porcentagem (TABELA 8). A exclusividade da análise da absorbância da banda Soret se relaciona ao fato dessa ser a principal banda de absorção das porfirinas além da mais intensa, o que facilita a visualização dos resultados.

TABELA 8 – VALORES EM DUPLICATA EM PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS APÓS IRRADIAÇÃO DE 100 mW/cm²

Tempo	**Mono-Py$^+$ (446 nm)**		**Di-*trans*-Py$^+$ (419 nm)**		**Di-*cis*-Py$^+$ (421nm)**		**Tri-Py$^+$ (422 nm)**		**Tetra-Py$^+$ (422 nm)**	
0	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000
1	99,260	98,877	97,852	98,293	97,119	97,492	99,194	98,501	99,047	99,184
2	98,202	97,959	96,625	97,188	95,473	95,586	98,489	97,644	98,690	98,717
3	97,251	97,040	95,807	96,285	94,135	94,383	97,985	97,109	98,333	98,484
4	96,088	96,122	94,785	95,481	93,209	93,279	97,583	96,680	98,214	98,251
6	94,503	94,591	93,456	94,277	91,460	91,675	96,978	96,038	97,976	98,018
8	93,023	93,367	92,126	93,172	89,917	90,170	96,374	95,503	97,738	97,785
10	91,649	92,142	91,104	92,068	88,271	88,465	95,871	94,967	97,500	97,552
15	89,746	89,795	88,445	89,357	85,390	86,158	94,864	93,897	97,142	97,086
20	87,315	87,653	86,094	87,0481	82,8189	83,9518	93,9577	92,933	96,904	96,503

FONTE: O autor (2012)
NOTA: Entre parênteses está indicada a localização exata da banda Soret para cada derivado. O tempo é dado em minutos.

Os resultados indicam maior estabilidade relacionada à exposição à luz crescente na seguinte ordem: Tetra-Py$^+$ > Tri-Py$^+$ > Di-*trans*-Py$^+$ > Mono-Py$^+$ > Di-*cis*-Py$^+$. Para facilitar a variação entre os derivados, os dados obtidos foram plotados em um único gráfico (GRÁFICO 1).

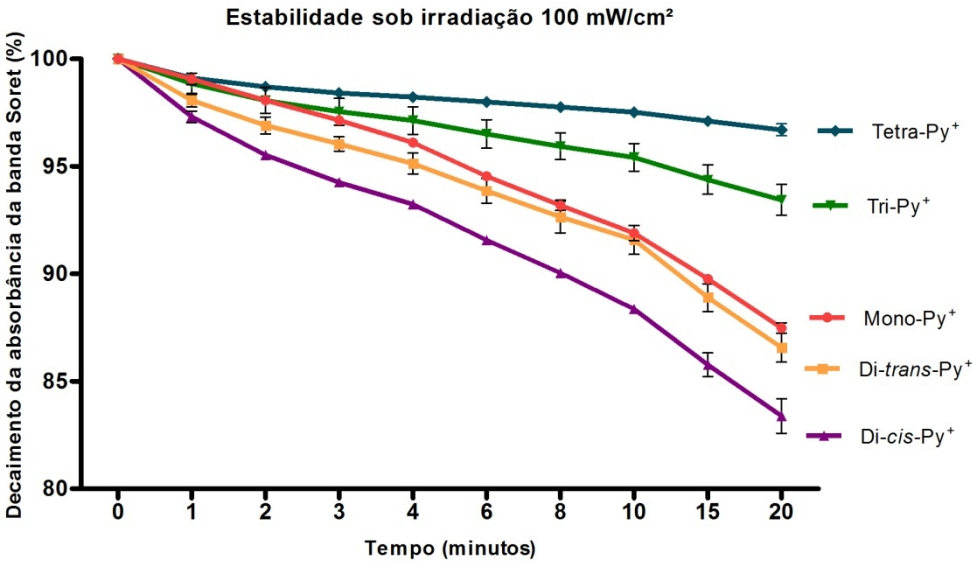


GRÁFICO 1 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS APÓS IRRADIAÇÃO DE 100 mW/cm²
FONTE: O autor (2012)

O espectro de absorção das porfirinas é caracterizado por dois tipos de bandas, localizadas nas regiões 400-450 nm (banda Soret) e 500-650 nm (bandas Q) (GOUTERMAN, 1961; GOUTERMAN; WAGNIÈRE; SNYDER, 1963; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Tais bandas características se relacionam à transições eletrônicas dos compostos do estado fundamental para estados excitados. A banda Soret é proveniente da transição eletrônica permitida $S_0 \rightarrow S_2$ e apresenta intensidade consideravelmente superior àquelas observadas para as bandas Q. Já as últimas são provenientes de transições eletrônicas proibidas $S_0 \rightarrow S_1$ e o seu número e intensidade variam de acordo com a presença ou ausência de substituições no macrociclo e se há metal no interior desse (GOUTERMAN, 1961). Segundo Makarska e Radzki (2002), a variação entre as intensidades da banda Soret e das bandas Q pode alcançar a proporção de 50:1.

No procedimento de PDI as transições eletrônicas para os estados excitados das porfirinas são fundamentais para a geração das espécies reativas que resultam no dano celular (FIGURA 2, p. 24). Por isso, a redução nesses processos, refletida na diminuição da intensidade das bandas de absorção resultam em queda na eficiência da inativação dos micro-organismos.

Outro fator importante a ser considerado consiste na agregação molecular. As porfirinas são compostos que apresentam tendência a formar agregados moleculares (ČEKLOVSKÝ, 2009). Tais agregados ocasionam redução da absorção

do derivado e são independentes da irradiação, estando relacionados diretamente à interação dos derivados com o solvente. Por isso, foi necessária uma avaliação - empregando procedimento idêntico - dos derivados na ausência de irradiação, para ser estimada a proporção da queda da absorbância devida a essas interações.

Os valores de absorbância dos derivados porfirínicos cationizados foram obtidos inicialmente e periodicamente na ausência de qualquer luminosidade. A tabela 9 demonstra os valores percentuais do decaimento da banda Soret no escuro e o gráfico 2 demonstra a relação existente entre esses decaimentos para todos os derivados.

TABELA 9 – VALORES EM DUPLICATA EM PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO

Tempo(min)	**Mono-Py$^+$**		**Di-*trans*-Py$^+$**		**Di-*cis*-Py$^+$**		**Tri-Py$^+$**		**Tetra-Py$^+$**	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	98,5	98,99	98,2	97,5	96,8	97,2	99,3	98,5	99,3	99,5
2	96,7	96,98	97,4	96,3	95,9	96,3	98,8	98,3	99,0	99,1
3	95,4	95,53	96,2	95,6	95,4	95,2	98,8	98,1	98,8	98,8
4	93,7	94,19	95,6	94,8	94,9	94,7	98,3	98,0	98,7	98,6
6	92,10	92,29	94,7	94,2	94,4	94,1	97,8	97,8	98,5	98,4
8	90,13	90,62	94,0	93,7	94,0	93,5	97,6	97,8	98,3	98,1
10	88,57	89,39	92,9	93,1	93,8	93,1	97,4	97,6	98,2	98,0
15	84,94	86,49	91,8	92,6	93,3	92,5	97,2	97,5	98,1	97,8
20	82,86	84,37	91,0	92,0	92,9	92,0	97,1	97,7	97,9	97,6

FONTE: O autor (2012)

A absorbância relacionada à banda Soret observada em todos os períodos para essas condições está descrita em duplicata no anexo 5 e os respectivos espectros de absorção do período inicial e final, incluindo toda a faixa espectral avaliada, se encontram na figura 29. Os espectros obtidos com o auxílio do programa UV Probe 2.3 constam no anexo 7.

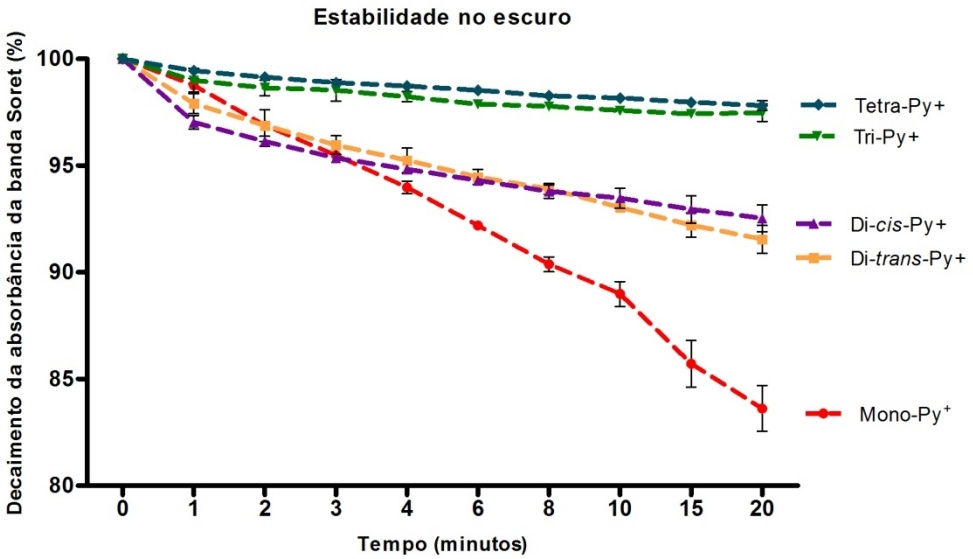


GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO
FONTE: O autor (2012)

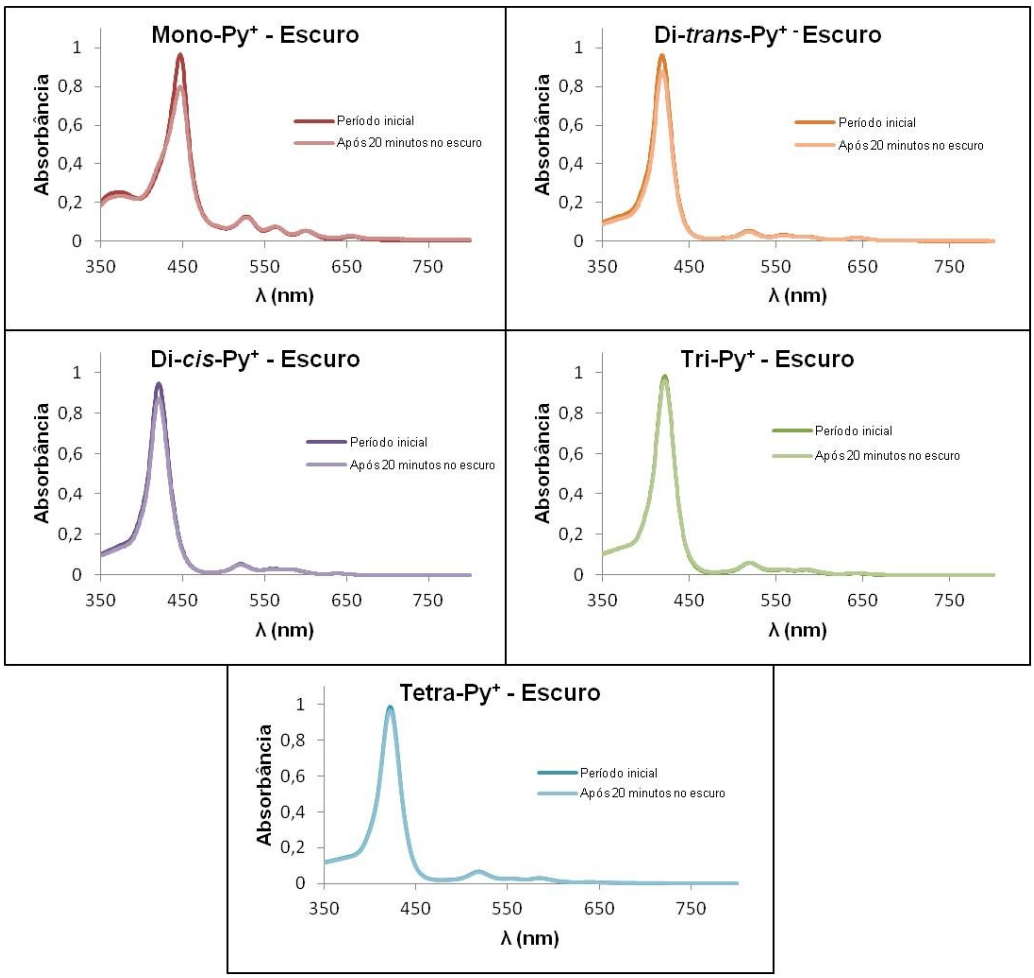


Figura 29 – Espectros de absorção dos derivados cationizados na região entre 350-800 nm no tempo inicial e após 20 minutos no escuro
FONTE: O autor (2012)

Os resultados evidenciaram um decaimento na absorbância da banda Soret dos derivados independentemente da incidência da luz, demonstrando o processo de agregação desses compostos. Diversas porfirinas catiônicas são reconhecidas por levarem à formação de dímeros, os quais se aglomeram em solução aquosa (DARGIEWICZ; MAKARSKA; RADZKI, 2002). De acordo com Speirs, Ebenezer e Jones (2002) esse processo ocorre devido à inclinação dos planos coplanares das porfirinas.

O processo de agregação das cinco *meso*-tetra-arilporfirinas catiônicas apresentou uma ordem diretamente relacionada à estrutura química desses compostos e sua relação com o solvente polar. As porfirinas *meso* substituídas por anéis benzênicos ou piridínicos em sua forma neutra são descritas por Makarska, Radzki e Legendziewicz (2002) como sendo hidrofóbicas e a inserção de grupos carregados está relacionada a um aumento na solubilidade em água dos derivados.

Por isso, considerando que a agregação é um fenômeno comum relacionado às porfirinas, a ordem de decaimento apresentada pelos derivados se relacionou diretamente com a hidrossolubilidade de cada um, ou seja, o número de cargas inserido na estrutura ou, para os derivados diquaternizados, as posições dessas cargas, se vicinais ou opostas. Portanto, quanto menor o número de substituições das posições *meso* por anéis benzênicos, menor o decaimento da absorbância da banda Soret observado no escuro. O decaimento obedeceu a ordem crescente: Tetra-Py^+ < Tri-Py^+ < Di-*cis*-Py^+ < Di-*trans*-Py^+ < Mono-Py^+.

Nesse contexto, para avaliar a influência real da luminosidade, desconsiderando os processos de agregação e redução na solubilidade, foi descontada a porcentagem de decaimento no escuro em relação ao valor obtido na presença de irradiação (TABELA 10).

Apesar da obtenção de valores reduzidos para o decaimento da banda Soret considerando apenas a irradiação para os quatro derivados, através desses resultados foi possível visualizar a manutenção da ordem da degradação fotoquímica obtida para as porfirinas inicialmente, onde foram considerados os processos de agregação e interações com o solvente, sendo o derivado Di-*cis*-Py^+ o menos estável (GRÁFICO 3).

TABELA 10 – VALORES PERCENTUAIS EM DUPLICATA DO DECAIMENTO DA BANDA SORET NA PRESENÇA DE IRRADIAÇÃO DESCONTANDO O PROCESSO DE AGREGAÇÃO.

Tempo (min)	Di-*trans*-Py$^+$		Di-*cis*-Py$^+$		Tri-Py$^+$		Tetra-Py$^+$	
0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1	99,9	99,9	99,6	99,7	99,8	99,9	99,6	99,7
2	99,8	99,8	98,6	99,2	99,5	99,2	99,6	99,6
3	99,7	99,8	99,4	99,1	99,2	98,9	99,4	99,6
4	99,7	99,8	98,2	98,6	99,1	98,6	99,4	99,6
6	99,2	99,6	97,0	97,5	99,1	98,1	99,3	99,5
8	98,4	99,1	95,9	96,6	98,6	97,6	99,3	99,5
10	97,9	99,1	94,4	95,3	98,3	97,3	99,2	99,5
15	95,8	97,5	91,9	93,6	97,6	96,3	99,1	99,2
20	94,1	95,9	89,8	91,8	96,8	95,2	98,9	98,8

FONTE: O autor (2012)

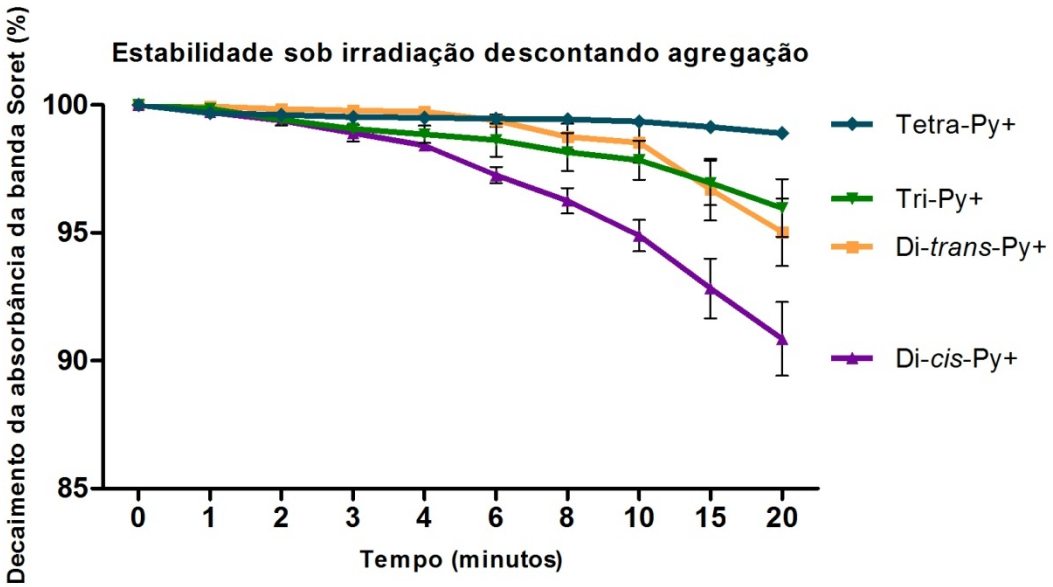


GRÁFICO 3 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS APÓS IRRADIAÇÃO DE 100 mW/cm² DESCONTANDO A AGREGAÇÃO
FONTE: O autor (2012)

O grau de fotoestabilidade se relaciona à variações estruturais e eletrônicas dos derivados. O processo de sensibilização – interação com a luz – ocasiona alterações nos estados eletrônicos das porfirinas (FIGURA 2, p. 24) (BONNET; MARTÍNEZ, 2001), sendo a disposição eletrônica fator de influência direta nessas modificações. As diferenças exibidas pelos derivados Tetra-Py$^+$ e Di-*cis*-Py$^+$ - porfirinas mais e menos fotoestáveis, respectivamente - podem ser atribuídas à

variável distribuição da nuvem eletrônica nesses compostos. O derivado Tetra-Py^+ mostra deslocalização da nuvem, o que resulta em um momento dipolar igual a zero. Por sua vez, o derivado diquaternizado na forma *cis* demonstra a carga negativa localizada na região próxima aos dois anéis piridínicos metilados presentes nas posições *meso* vizinhas, ocasionando um momento dipolar diferente de zero. A desigualdade na disposição eletrônica na molécula de Di-*cis*-Py^+ contribui para a redução na fotoestabilidade, uma vez que a distribuição eletrônica uniforme demonstrada por Tetra-Py^+ proporcionou um aumento na estabilidade do composto durante a interação com a luz.

A ausência do derivado monoquaternizado está relacionada à impossibilidade do cálculo devido a um decaimento superior no escuro quando comparado àquele obtido com irradiação (GRÁFICO 4)

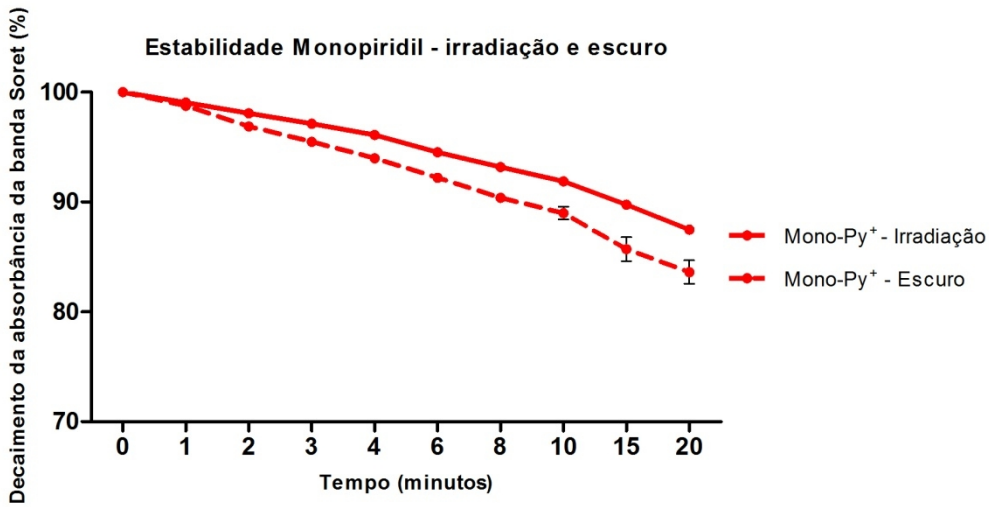


GRÁFICO 4 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA BANDA SORET DO DERIVADO MONO-PY^+ SOB IRRADIAÇÃO E NO ESCURO
FONTE: O autor (2012)

A porcentagem de decaimento superior em ambas as condições pode ser atribuída à polaridade do derivado, o qual, dentre todos os avaliados, se apresenta como o mais apolar. A reduzida porcentagem de decaimento observada na condição de irradiação pode ser devida à temperatura, uma vez que a fonte luminosa fornece calor para o sistema, elevando as interações entre as moléculas de porfirina e o solvente.

4.2.2 Estudos de geração de oxigênio singlete

A magnitude da geração de oxigênio singlete em um processo fotodinâmico apresenta elevada importância, visto que se acredita que esse seja o principal fator responsável pela ação fotodinâmica (WAINWRIGHT, 1998; MAISCH *et al.*, 2005). Donnelly, Mccarron, e Tunney (2008) evidenciaram que o oxigênio em seu estado singlete representa um agente oxidante inespecífico, o que não suscita defesas celulares, por isso seu efeito danoso se apresenta pronunciado. Além disso, Matsumoto e colaboradores (2011) relacionam o dano celular diretamente através do oxigênio singlete formado no interior das células.

O método empregado para detecção da produção dessa espécie reativa representa um método indireto e qualitativo, no qual é empregado um aceptor denominado 1,3-difenilisobenzofurano (DFiBF) (DETTY; MERKEL, 1990). Esse composto apresenta máxima absorção em comprimento de onda 415 nm e, ao interagir com o $^1O_2$ forma produtos transparentes nesse mesmo comprimento de onda (DETTY; MERKEL, 1990; AMAT-GUERRI *et al.*, 1996; BEVERINA *et al.*, 2005; ARUNKUMAR *et al.*, 2007) (FIGURA 30).

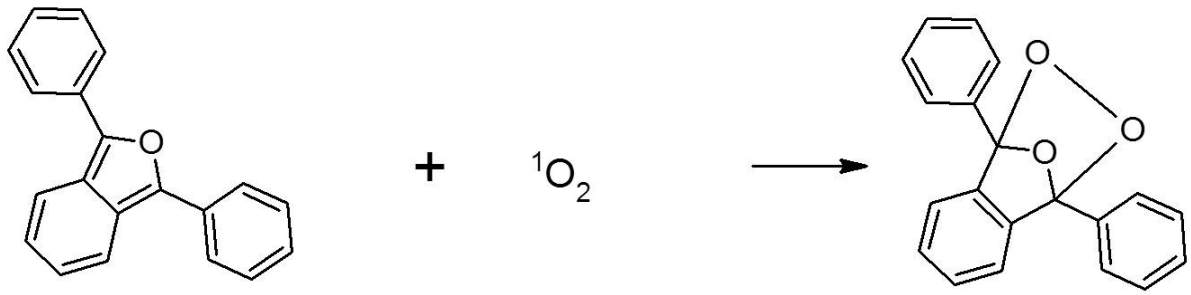


Figura 30 – Reação entre o DFiBF e oxigênio singlete demonstrando a formação do endoperóxido transparente no comprimento de onda da análise (415 nm).
FONTE: Silva (2008)

Nesse contexto, a proporção de oxigênio singlete gerada por cada porfirina é diretamente proporcional ao decaimento da absorbância a 415 nm após irradiação na região entre 550-800 nm em solvente DMF:água (9/1). A filtração dos comprimentos de onda de irradiação se faz necessária para evitar degradação do reagente (415 nm) e a proporção maior de solvente orgânico é justificada pela

insolubilidade do DFiBF em soluções com elevada porcentagem de água (LINDIG; RODGERS; SCHAAP, 1980).

Os valores da absorbância observados para o DFiBF na ausência e na presença dos cinco derivados nos diferentes períodos de irradiação constam no anexo 8. Esses valores expressos em porcentagem se encontram na tabela 11.

TABELA 11 – VALORES EM DUPLICATA RELATIVOS AO PERCENTUAL DE QUEDA DA ABSORBÂNCIA DO DFiBF NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE PORFIRINAS EM λ DE 415 nm APÓS IRRADIAÇÃO A 9,0 mW/cm² E COMPRIMENTOS DE ONDA SUPERIORES A 540 nm.

Tempo	**DFiBF**		**Mono-Py$^+$**		**Di-*trans*-Py$^+$**		**Di-*cis*-Py$^+$**		**Tri-Py$^+$**		**Tetra-Py$^+$**	
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1	99,5	99,3	94,9	94,6	96,5	96,3	96,5	96,6	95,4	95,2	95,3	95,1
2	99,2	98,8	89,8	89,7	93,2	92,9	93,2	93,2	91,3	91,2	91,1	91,2
3	98,9	98,4	84,8	84,8	90,0	89,6	89,7	90,0	87,2	87,3	87,5	88,0
4	98,5	97,7	80,3	80,2	86,8	86,2	86,6	86,7	83,3	83,5	84,0	85,4
5	98,1	97,3	75,7	75,6	83,6	83,0	83,4	83,5	79,7	79,7	80,6	82,2
6	97,8	96,8	70,9	71,0	80,4	79,7	80,2	80,4	75,8	75,8	77,2	79,6
7	97,5	96,2	66,4	66,7	77,2	76,5	76,8	77,2	72,1	72,1	73,9	76,8
8	97,1	95,8	62,0	62,4	74,1	73,3	73,2	74,1	68,5	68,5	70,9	74,3
9	96,7	95,3	57,9	58,2	71,1	70,1	70,0	71,0	65,0	65,0	67,8	71,8
10	96,4	94,8	53,8	54,2	68,0	66,9	66,8	67,9	61,5	61,5	64,8	69,4
11	96,0	94,4	49,9	50,4	64,9	63,7	63,7	64,8	58,0	58,0	61,8	67,0
12	95,6	93,9	46,3	46,8	61,9	60,6	60,7	61,7	54,7	54,7	59,0	64,6
13	95,3	93,5	42,9	43,4	58,6	57,6	57,4	58,7	51,4	51,3	56,1	62,2
14	94,9	93,0	39,7	40,1	55,7	54,6	54,3	55,8	48,2	48,1	53,0	59,8
15	94,6	92,6	36,6	37,1	52,8	51,6	51,3	52,9	45,1	44,9	50,4	57,4
20	93,1	90,3	22,7	22,5	39,2	36,8	38,4	40,3	29,6	31,1	38,7	45,4

FONTE: O autor (2012)

Comparativamente ao DFiBF, as porfirinas expressaram decaimento da absorbância acentuadamente superior (GRÁFICO 5). A observação comprova a produção de oxigênio singlete por todos os derivados e não alterações do padrão, uma vez que esse apresentou isoladamente decaimento médio inferior a 10%. Qualitativamente, segundo os resultados obtidos através da metodologia empregada, a geração dessa espécie reativa foi crescente para as porfirinas na seguinte ordem: Tetra-Py$^+$ < Di-*cis*-Py$^+$ < Di-*trans*-Py$^+$ < Tri-Py$^+$ < Mono-Py$^+$.

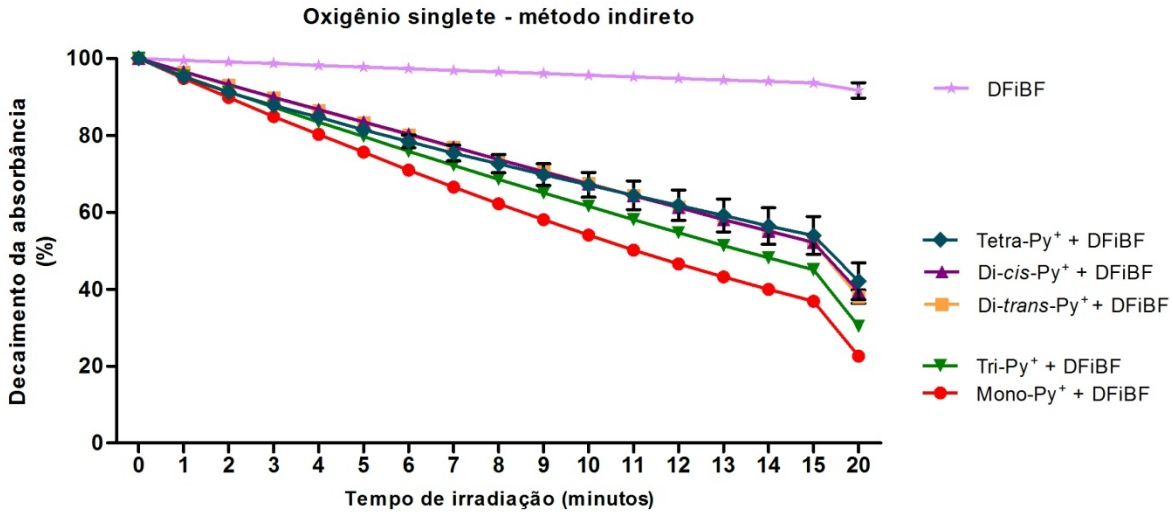


GRÁFICO 5 – PORCENTAGEM DE DECAIMENTO DA ABSORBÂNCIA EM λ DE 415 nm DE DFiBF NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DOS DERIVADOS APÓS IRRADIAÇÃO A 9,0 mW/cm² E COMPRIMENTOS DE ONDA SUPERIORES A 540 nm.
FONTE: O autor (2012)

Em relação a esses compostos não está descrita na literatura a capacidade de geração dessa espécie reativa, à exceção de Tetra-Py$^+$, a qual foi anteriormente avaliada nesse aspecto associada a outros derivados porfirínicos catiônicos *meso* substituídos (GOMES *et al*., 2011). Em relação à porfirina tetraquaternizada, a magnitude de geração de oxigênio singlete obtida no presente estudo mostrou semelhança à obtida pelos autores.

Similarmente aos ensaios de fotoestabilidade, há o emprego de uma mistura de solventes que apresenta elevada polaridade, por essa razão, os fenômenos de agregação das porfirinas devem ser considerados. Tendo em vista que o derivado Mono-Py$^+$ apresentou um processo de agregação considerável em meio aquoso, possivelmente, a queda acentuada na absorbância nos ensaios de oxigênio singlete está relacionada não somente à geração da espécie reativa em si, mas também à agregação. Para as demais porfirinas, esses fenômenos foram observados com menor intensidade.

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos, devem ser realizados novos estudos empregando métodos quantitativos comparativos, envolvendo as porfirinas avaliadas e azul de metileno, um corante com rendimentos de oxigênio singlete descritos na literatura.

4.3 INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE CONÍDIOS DE C*. graminicola*

4.3.1 Definição da intensidade luminosa utilizada

Inicialmente, o processo de fotoinativação foi baseado no estudo realizado por Gomes e colaboradores (2011), o qual empregou irradiação com intensidade de 200 mW/cm² para avaliação da inativação de conídios de *Penicillium chrysogenum*. A fonte luminosa utilizada foi idêntica à empregada pelos autores: luz branca obtida através de uma fibra óptica (400-800 nm), acoplada a uma lâmpada de halogênio/quartzo de 250 W (Lumacare LC 122).

Devido ao desconhecimento da influência da intensidade luminosa isoladamente na viabilidade conidial de *C. graminicola*, foram avaliadas duas intensidades distintas, as quais foram definidas em 100 (CC 100) e 200 (CC 200) mW/cm² durante um período de trinta minutos. A tabela 12 relaciona os valores em log UFC/mL obtidos em triplicata para as duas condições aliadas ao branco e ao controle escuro (Tetra-Py^+ na concentração de 100 μM). Por sua vez, os resultados estão expressos gráfica e estatisticamente no gráfico 6.

TABELA 12 – VALORES (log UFC/mL) EM TRIPLICATA APÓS APLICAÇÃO DE DUAS INTENSIDADES DE IRRADIAÇÃO POR TRINTA MINUTOS EM CONÍDIOS DE *C. graminicola*

Branco			**CC 100**			**CC 200**			**CE**		
4,93	4,90	4,96	4,70	4,62	4,95	0,05	0,05	0,05	4,90	4,76	4,84
4,11	4,26	4,02	3,74	3,95	4,00	0,05	0,05	0,05	3,90	3,84	3,78

FONTE: O autor (2011)

NOTA: CC 100: Intensidade luminosa de 100 mW/cm²; CC 200: Intensidade luminosa de 200 mW/cm²; CE: Controle Escuro (concentração de Tetra-Py^+ de 100 μM).
Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.

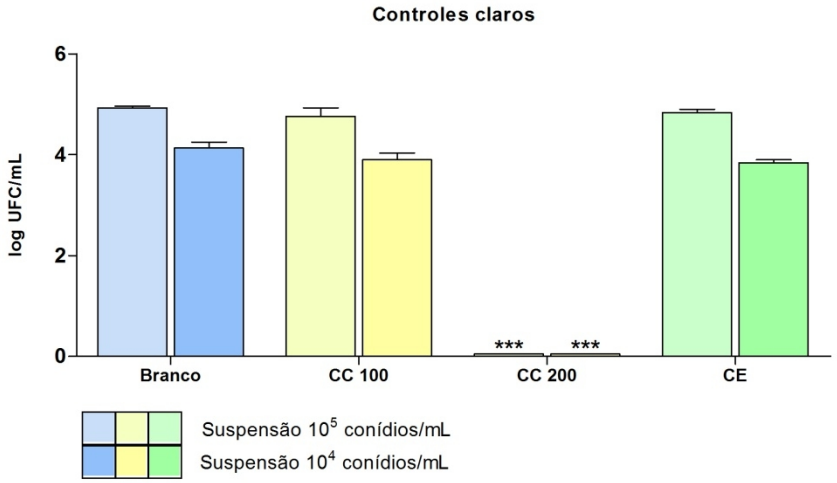


GRÁFICO 6 – RESULTADOS (log UFC/mL) APÓS APLICAÇÃO DE DUAS INTENSIDADES DE IRRADIAÇÃO POR TRINTA MINUTOS EM CONÍDIOS DE *C. graminicola*
FONTE: O autor (2011)
NOTA: CC 100: Intensidade luminosa de 100 mW/cm²; CC 200: Intensidade luminosa de 200 mW/cm²; CE: Controle Escuro (concentração de Tetra-Py^+ de 100 μM).

Os resultados estatísticos não evidenciaram diferenças significativas entre o branco, CC 100 e CE para ambas as concentrações de suspensão conidial. A intensidade luminosa empregada em estudo de Gomes e colaboradores (2011) (CC 200) ocasionou inativação total do fungo (na ausência de fotossensibilizador).

De acordo com o princípio da PDI (BONNET; MARTÍNEZ, 2001), a luz isoladamente não deve ocasionar inativação celular e, por isso, a intensidade luminosa adotada para a avaliação da fotoinativação de *meso*-tetra-arilporfirinas em conídios de *C. graminicola* foi 100 mW/cm² (CC 100).

4.3.2 Definição da concentração de fotossensibilizador empregando Tetra-Py+

Com a definição da intensidade luminosa a ser utilizada, foram estabelecidas as quatro concentrações dos fotossensibilizadores a serem avaliadas. Dentre os derivados porfirínicos sintetizados, o escolhido para testes iniciais bem como referência para comparação com os demais – estruturalmente relacionados – foi Tetra-Py^+. A razão da escolha desse composto consiste no fato de esse ser um fotossensibilizador altamente conhecido (REDDI *et al*., 2002) e por ter sido empregado em inativação de inúmeros micro-organismos, dentre esses, bactérias

Gram-positivas e Gram-negativas (REDDI *et al.*, 2002), conídios de *P. chrysogenum* (GOMES *et al.*, 2011) e leveduras como *Candida albicans* (QUIROGA *et al.*, 2012).

Inicialmente foram testadas algumas das concentrações empregadas pelos autores (GOMES *et al.*, 2011) sendo substituída apenas a de 10 μM por uma concentração inferior, 5 μM. As demais, foram 25, 50, 75 μM para PDI e, 100 μM para o controle escuro. O período total de irradiação consistiu em trinta minutos. A tabela 13 expressa os resultados obtidos relacionando os controles e as concentrações de Tetra-Py^+ empregadas com os respectivos períodos de irradiação nos quais foram avaliados os valores (log UFC/mL).

TABELA 13 – VALORES (log UFC/mL) EM TRIPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO TETRA-PY^+ NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 25, 50 E 75 μM. E IRRADIAÇÃO POR UIM PERÍODO MÁXIMO DE TRINTA MINUTOS, COMO DESCRITO POR GOMES E COLABORADORES (2011)

Tempo	**0 min**			**5 min**			**10 min**			**20 min**			**30 min**		
BR	4,90	4,92	4,95	--	--	--	--	--	--	-	-	-	--	--	--
	3,95	4,02	3,98	--	--	--	--	--	--	-	-	-	--	--	--
CC	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	4,89	4,92	4,94
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	4,00	3,78	3,99
CE*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	4,90	4,88	4,90
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-	-	-	3,99	3,68	3,65
5μM	4,63	5,02	5,04	4,52	4,93	4,91	4,20	3,62	4,27	0	0,	0	0	0	0
	4,13	4,00	4,17	4,12	3,93	4,15	3,94	3,17	3,51	0	0	0	0	0	0
25 μM	4,63	5,07	4,98	3,09	2,69	3,90	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
	4,09	3,74	4,11	2,39	3,00	2,39	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
50 μM	4,60	5,02	4,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
	4,17	3,81	4,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
75 μM	4,96	4,98	4,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
	4,05	3,87	4,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0

FONTE: O autor (2012)

NOTA:Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.
BR: branco; CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE* Controle escuro realizado com concentração de Tetra-Py^+ de 100 μM.

A figura 31 expressa gráfica – colunas – e estatisticamente os resultados obtidos para as concentrações 5, 25 e 50 juntamente com 75 μM de Tetra-Py^+.

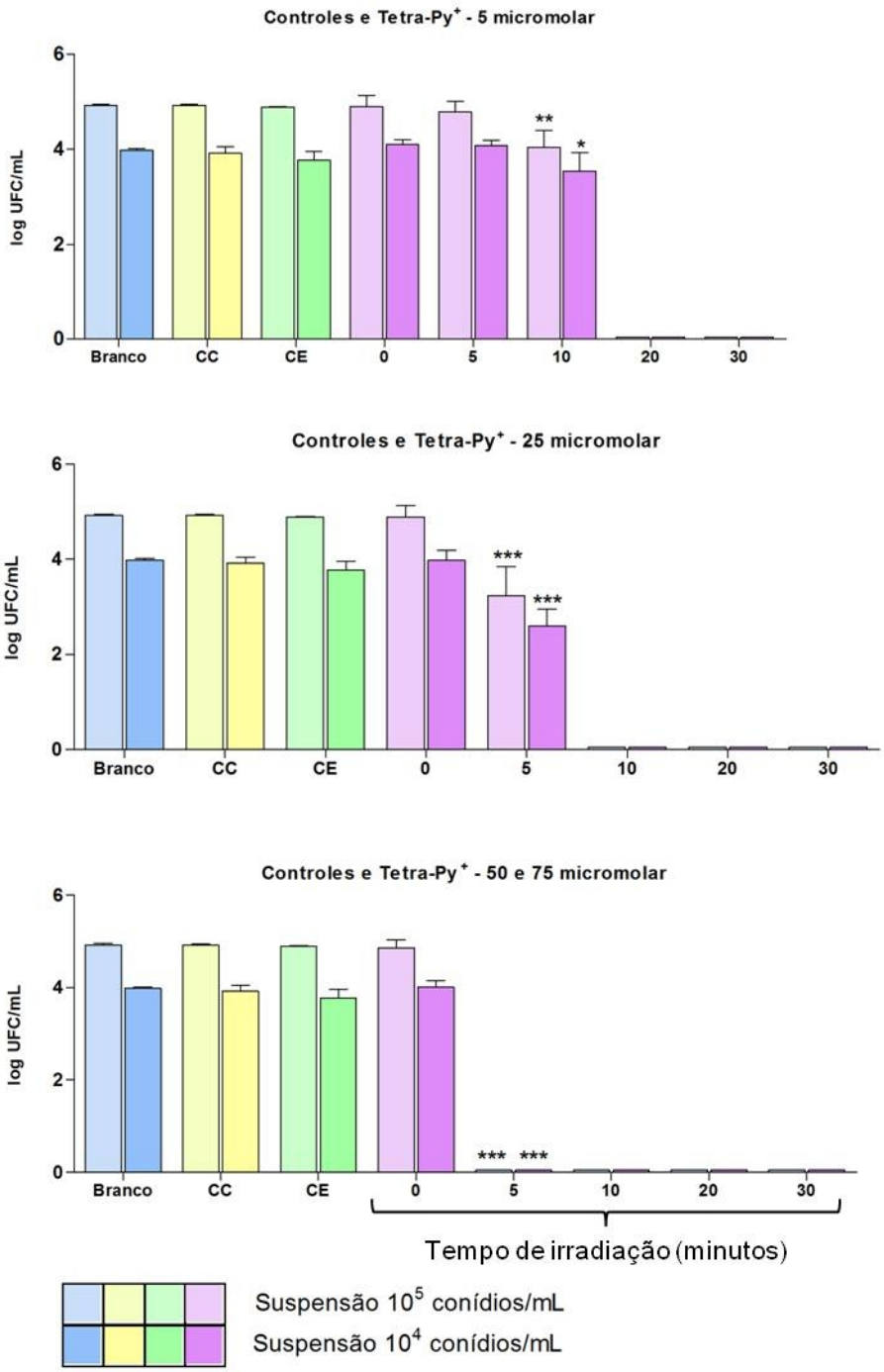


Figura 31 – Gráficos em colunas (log UFC/mL) da PDI empregando Tetra-Py$^+$ como fotossensibilizador nas concentrações 5, 25, 50 e 75 μM e período máximo de irradiação de trinta minutos.
FONTE: O autor (2011)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Tetra-Py$^+$ de 100 μM).
Níveis de significância: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

Desde a menor concentração empregada nos ensaios de PDI foi observada redução significativa no desenvolvimento de conídios de *C. graminicola* no período de dez minutos de irradiação (100 mW/cm²), dados concordantes com a eficiente

inativação demonstrada por esse fotossensibilizador em estudo de Gomes e colaboradores (2011) em relação a conídios de *P. chrysogenum* . Com o aumento da concentração de fotossensibilizador de 5 para 25 μM, essa redução foi observada com menor período de irradiação (cinco minutos). No caso das mais elevadas concentrações, os resultados foram semelhantes e foi ocasionada inativação total do micro-organismo com um período inferior a cinco minutos de irradiação.

Para uma avaliação do decaimento na viabilidade do fungo e, por se tratar do fotossensibilizador referência, os mesmos resultados foram plotados em gráficos de linhas (FIGURA 32).

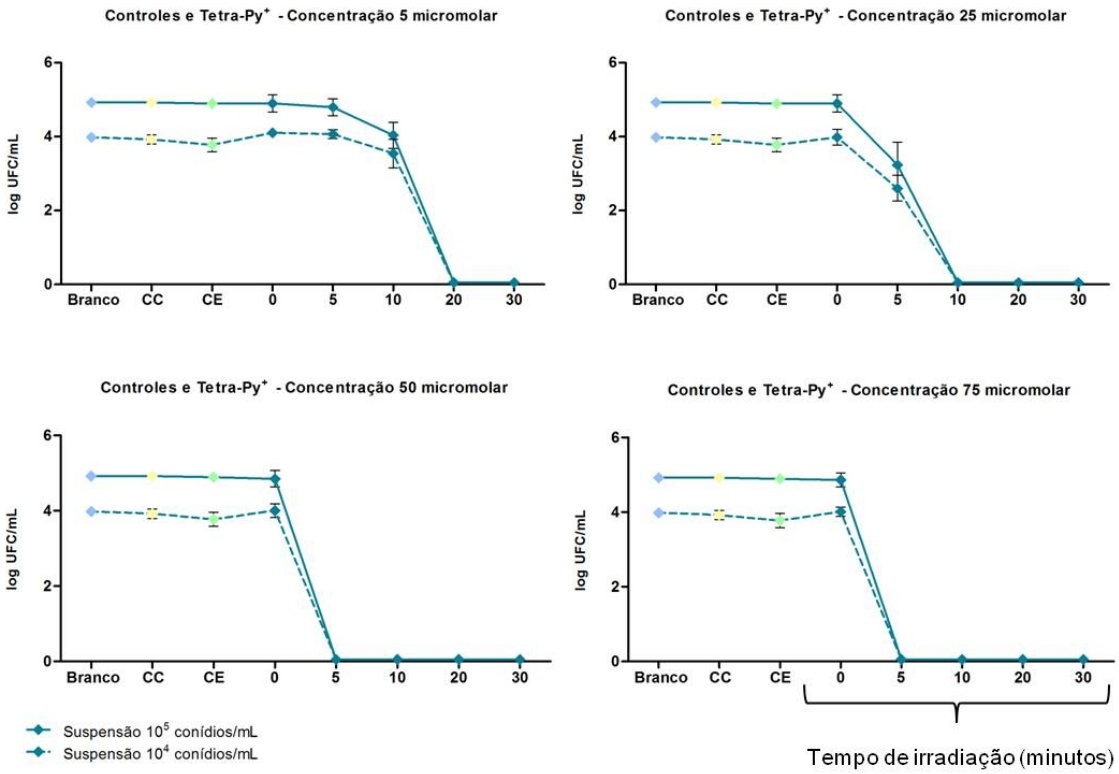


Figura 32 – Resultados gráficos em linhas (log UFC/mL) da PDI empregando Tetra-Py$^+$ como fotossensibilizador nas concentrações 5, 25, 50 e 75 μm e período máximo de irradiação de trinta minutos.
FONTE: O autor (2011)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: Controle escuro (concentração de Tetra-Py$^+$ de 100 μM).

Através dos resultados, é possível visualizar um decaimento brusco na viabilidade celular para as concentrações mais elevadas de fotossensibilizador, o que comprova a influência do aumento da concentração desse composto químico na inativação realizada empregando condições de intensidade luminosa e aeração

idênticas. Além disso, pode ser observada ausência de desenvolvimento no período de vinte minutos para todas as concentrações de Tetra-Py^+ empregadas. Pelas razões de avaliação mais aprofundada do processo de inativação fotodinâmica aliada à economia de fotossensibilizador e energia, foram adotadas concentrações intermediárias de Tetra-Py^+ entre 5 e 25 μM, inclusive ambas. Assim, as concentrações avaliadas para todos os derivados *meso*-tetra-arilporfirínicos foram 5, 10, 15 e 25 μM em períodos de irradiação de 0, 5, 10, 15 e 20 minutos.

4.3.3 PDI empregando Tetra-Py^+ como fotossensibilizador

As concentrações reduzidas foram avaliadas primeiramente empregando Tetra-Py^+. Os resultados da triplicata (log UFC/mL) constam na tabela 14 e são mostrados em gráficos (colunas) na figura 33 e linhas (FIGURA 34).

TABELA 14 – VALORES (log UFC/mL) EM TRIPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO TETRA-PY^+ NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS.

Tempo	0 min			5 min			10 min			15 min			20 min		
BR	4,87	4,82	4,95	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	3,81	3,97	3,97	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
CC	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4,96	4,78	4,89
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3,78	3,83	3,83
CE*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4,82	4,95	4,97
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3,68	4,15	3,65
5μM	4,91	4,77	4,94	4,83	4,77	4,89	3,63	3,63	3,90	2,40	3,18	3,10	0	0	0
	3,99	3,89	4,00	3,89	3,60	3,93	2,88	3,44	3,18	0	0	0	0	0	0
10μM	4,94	4,84	4,83	4,67	4,61	4,23	3,72	3,57	3,88	0	0	0	0	0	0
	3,88	4,05	3,92	3,54	3,43	3,70	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
15 μM	4,88	4,72	4,92	4,28	4,40	4,38	2,40	2,70	3,00	0	0	0	0	0	0
	3,78	3,84	4,06	3,24	2,70	2,70	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
25 μM	4,92	4,72	4,91	3,07	3,74	3,65	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
	3,63	3,94	3,88	2,70	2,40	2,70	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.
BR: branco; CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE* Controle escuro realizado com concentração de Tetra-Py^+ de 25 μM.

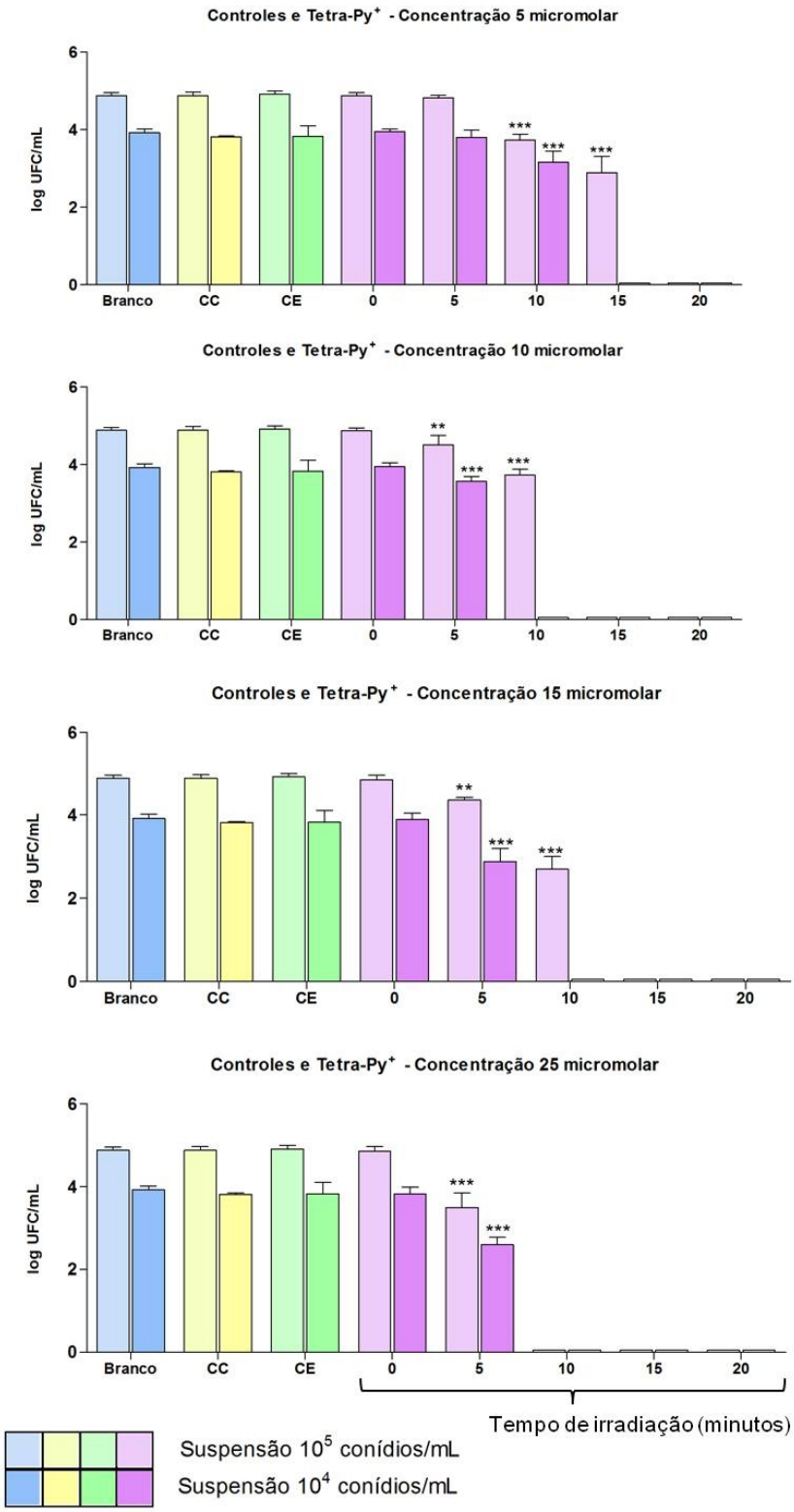


Figura 33 – Gráficos em colunas (log UFC/mL) da PDI empregando Tetra-Py^+ como fotossensibilizador nas concentrações 5, 10, 15 e 25 μM e período máximo de irradiação de vinte minutos.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Tetra-Py^+ de 25 μM).
Níveis de significância: **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

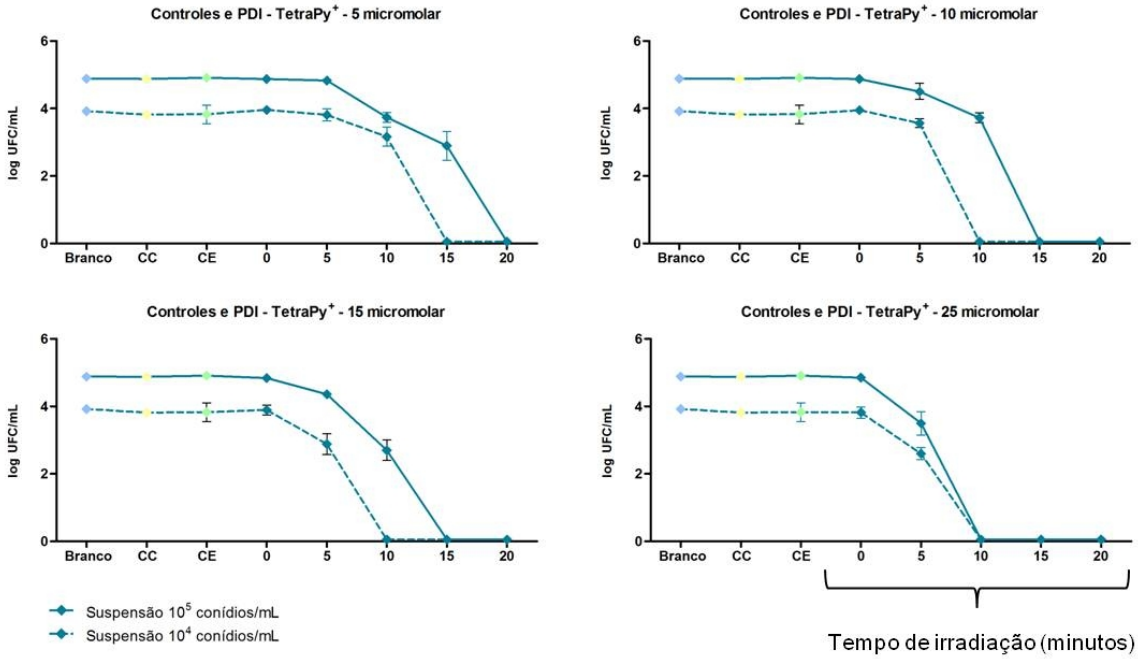


Figura 34 – Gráficos em linhas (log UFC/mL) da PDI empregando Tetra-Py$^+$ como fotossensibilizador nas concentrações 5, 10, 15 e 25 μM e período máximo de irradiação de vinte minutos.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Tetra-Py$^+$ de 25 μM).

A efetividade de Tetra-Py$^+$ como fotossensibilizador na inativação de conídios de *C. graminicola* foi comprovada com a redução das concentrações do derivado. Nesse caso, reduções significativas ocorreram de maneira gradual, sendo mantidos os resultados obtidos para as concentrações avaliadas anteriormente (5 e 25 μM).

As concentrações intermediárias (10 e 15 μM) demonstraram inativação significativa dos conídios em um período curto de cinco minutos de irradiação, mas de forma reduzida quando comparada ao derivado em sua maior concentração, o que é visualizado pelos tamanhos das respectivas barras. O crescimento evidenciado após dez minutos apenas em uma das suspensões conidiais para essas concentrações de fotossensibilizador se relaciona ao fato da proporção de conídios ser dez vezes maior na primeira suspensão (10^5 conídios/ mL) em relação à segunda (10^4 conídios/ mL).

A efetividade demonstrada por Tetra-Py$^+$ para inativação de conídios de *C. graminicola* está atrelada à sua elevada fotoestabilidade, o que indica manutenção das transições eletrônicas e consequente formação das espécies reativas em todo o

período de ensaio e, mesmo não sendo a porfirina com maior geração de oxigênio singlete de acordo com os resultados evidenciados, a estabilidade do composto remete à produção constante desse oxidante. Além disso, sua adequada interação com o solvente aquoso resulta em baixa formação de agregados e a presença das quatro cargas positivas facilita a interação com as estruturas do micro-organismo e sua internalização (PERUSSI, 2007).

Os ensaios para o derivado tetraquaternizado foram realizados em triplicata com o intuito de confirmar os valores médios e os desvios–padrão obtidos.

Após realização da PDI empregando Tetra-Py^+, as demais porfirinas foram avaliadas seguindo a ordem de semelhança estrutural com o primeiro em relação ao número de cargas, Tri-Py^+, Di-*cis*-Py^+, Di-*trans*-Py^+ e Mono-Py^+.

Para os quatro compostos citados, não constam na literatura estudos de inativação fotodinâmica de micro-organismos que utilizem essas porfirinas como fotossensibilizadores. Apenas o derivado Mono-Py^+ foi incluído na avaliação da atividade antiproliferativa de queratinócitos da linhagem HaCat em estudo realizado por Slomp (2012).

4.3.4 PDI empregando Tri-Py^+ como fotossensibilizador

Inicialmente, o derivado triquaternizado foi avaliado nas mesmas concentrações descritas para Tetra-Py^+ (TABELA 15).

Os resultados para as quatro concentrações avaliadas estão indicados em apenas um gráfico contendo o valor médio (log UFC/mL) e o respectivo desvio padrão (FIGURA 35), visto que o comportamento do fotossensibilizador foi idêntico para todas, sendo evidenciada a inativação total do micro-organismo em um período de irradiação de apenas cinco minutos.

TABELA 15 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO TRI-PY$^+$ NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS.

Tempo	0 min		5 min		10 min		15 min		20 min	
BR	4,98	5,03	--	--	--	--	--	--	--	--
	4,15	4,18	--	--	--	--	--	--	--	--
CC	--	--	--	--	--	--	--	--	4,93	5,06
	--	--	--	--	--	--	--	--	4,10	4,14
CE	--	--	--	--	--	--	--	--	4,73	4,32
	--	--	--	--	--	--	--	--	3,97	3,76
5μM	4,99	4,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,11	4,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10μM	5,05	4,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,18	4,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15μM	4,98	5,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,27	4,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25μM	4,98	4,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,90	3,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

FONTE: O autor (2012)
NOTA: Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.
BR: branco; CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE * Controle escuro realizado com concentração de Tri-Py$^+$ de 25 μM.

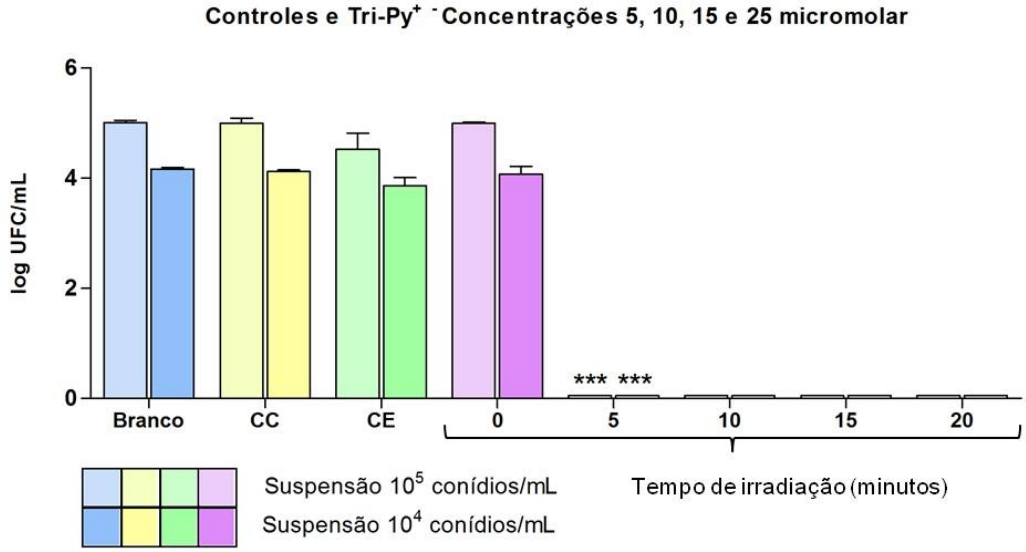


Figura 35 – Gráfico em colunas (log UFC/mL) da PDI empregando Tri-Py$^+$ como fotossensibilizador nas concentrações 5, 10, 15 e 25 μM e período máximo de irradiação de vinte minutos.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Tri-Py$^+$ de 25 μM).Nível de significância: ***: $p \leq 0{,}001$.

Por essa razão, foram avaliadas duas concentrações inferiores, correspondentes a 1,0 e 2,5 μM de Tri-Py$^+$ (TABELA 16 e FIGURA 36).

TABELA 16 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO TRI-PY$^+$ NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,0 E 2,5 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS.

Tempo	**0 min**		**5 min**		**10 min**		**15 min**		**20 min**	
1,0 μM	5,02	5,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,20	4,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,5 μM	5,06	5,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	4,20	4,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

FONTE: O autor (2012)
NOTA: Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.

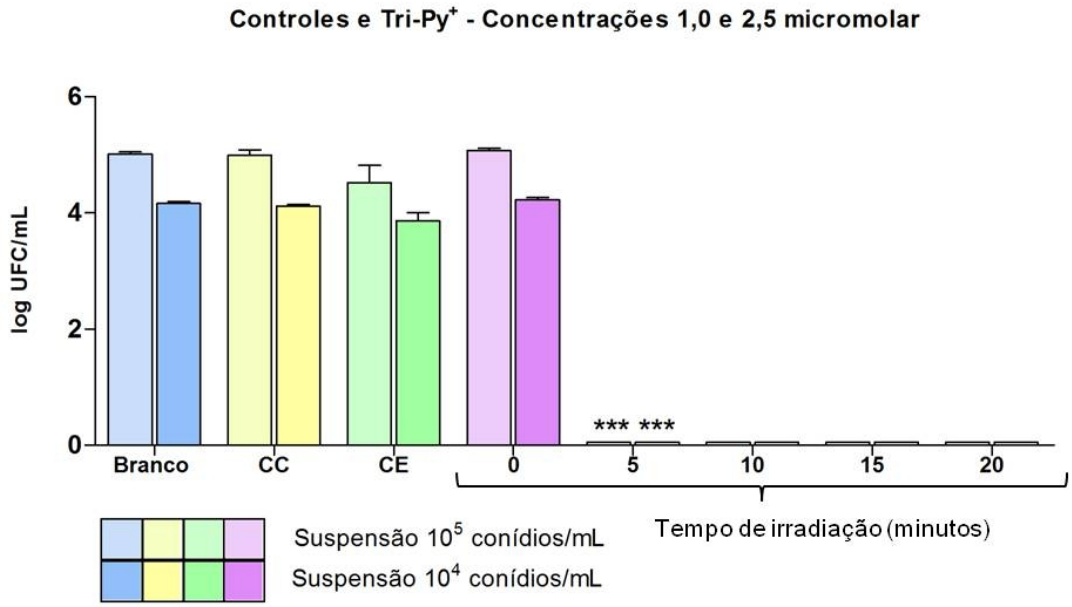


Figura 36 -Gráfico em colunas (log UFC/mL) da PDI empregando Tri-Py$^+$ como fotossensibilizador nas concentrações 1,0 e 2,5 μM e período máximo de irradiação de vinte minutos.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Tri-Py$^+$ de 25 μM).
Nível de significância: ***: $p \leq 0{,}001$.

O emprego de concentrações reduzidas de Tri-Py$^+$ demonstraram a mesma efetividade evidenciada para as concentrações superiores avaliadas anteriormente. Mesmo na concentração de 1,0 μM, o período necessário para inativação total de *C. graminicola* foi inferior a cinco minutos.

A potência do derivado triquaternizado pode ser relacionada à sua fotoestabilidade, a qual é semelhante àquela observada para Tetra-Py$^+$, aliada à mais elevada produção de oxigênio singlete. A produção constante e superior dessa espécie reativa remete a uma inativação mais eficiente, como demonstrado pelos resultados obtidos. Em relação à formação de agregados, o derivado apresenta capacidade inferior, sendo evidenciada uma solubilidade adequada no meio aquoso

através da ausência de precipitação evidente no meio sem agitação. A presença de três cargas positivas favorece ainda a captação pelos micro-organismos.

No caso desse derivado, os ensaios foram realizados em duplicata, pois os resultados foram confirmados e, pela elevada propriedade de inativação fotodinâmica apresentada por essa porfirina, a realização dos experimentos em triplicata constituiriam gastos desnecessários.

4.3.5 PDI empregando Di-*cis*-Py+ como fotossensibilizador

Dentre os derivados diquaternizados, o que apresenta anéis piridínicos em posições *meso* vizinhas (FIGURA 19, p.60), exibe densidade eletrônica concentrada na região próxima a esses anéis, o que resulta em um composto com maior polaridade. Os resultados obtidos na PDI constam na tabela 17 e figura 37.

TABELA 17 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO DI-*CIS*-PY^+ NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS

Tempo	**0 min**		**5 min**		**10 min**		**15 min**		**20 min**	
BR	4,67	4,87	--	--	--	--	--	--	--	--
	3,48	4,11	--	--	--	--	--	--	--	--
CC	--	--	--	--	--	--	--	--	4,62	4,93
	--	--	--	--	--	--	--	--	3,57	3,72
CE	--	--	--	--	--	--	--	--	0,00	0,00
	--	--	--	--	--	--	--	--	0,00	0,00
5 μM	3,00	3,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10 μM	4,20	3,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15 μM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25 μM	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.
BR: branco; CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE* Controle escuro realizado com concentração de Di-*cis*-Py^+ de 25 μM.

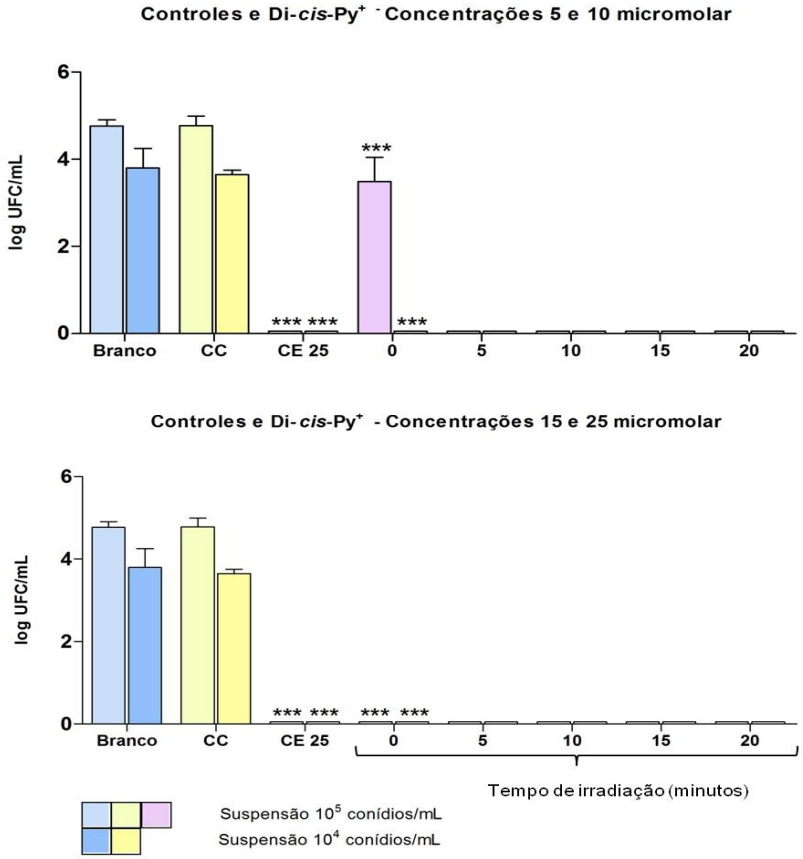


Figura 37 –Gráfico em colunas (log UFC/mL) empregando Di-*cis*--Py^+ como fotossensibilizador nas concentrações 5, 10, 15 e 25 μM e período máximo de irradiação de vinte minutos.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Di-*cis*--Py^+de 25 μM).
Nível de significância: ***: $p \leq 0{,}001$.

Os resultados evidenciaram toxicidade no escuro desse derivado para conídios de *C. graminicola*, representada pela ausência de desenvolvimento do micro-organismo. O procedimento de PDI foi realizado em duplicata para fins de comparação.

Em relação aos períodos de irradiação, as duas concentrações inferiores (5 e 10 μM) demonstraram crescimento no período inicial apenas no caso da suspensão conidial mais concentrada (10^5 conídios/ mL). Por sua vez, o crescimento não foi observado nem mesmo nessa suspensão ao serem avaliadas as concentrações mais elevadas de porfirina (15 e 25 μM). O desenvolvimento fúngico presente apenas nos períodos iniciais de irradiação para as menores concentrações do composto aliado à toxicidade no escuro demonstrada remetem a um processo de

toxicidade de contato, na qual apenas o contato com o composto leva a alterações que resultam na inibição do desenvolvimento.

Por essa razão, foi realizado um *screening* de concentrações no escuro para confirmação e estabelecimento de uma concentração a qual pudesse ser empregada em ensaios de PDI. Foram avaliadas quatro concentrações (1,0; 2,5; 4,0 e 25,0 μM) e os resultados obtidos se mostraram idênticos quanto à inativação total do micro-organismo, mesmo na menor concentração testada (1,0 μM) (FIGURA 38).

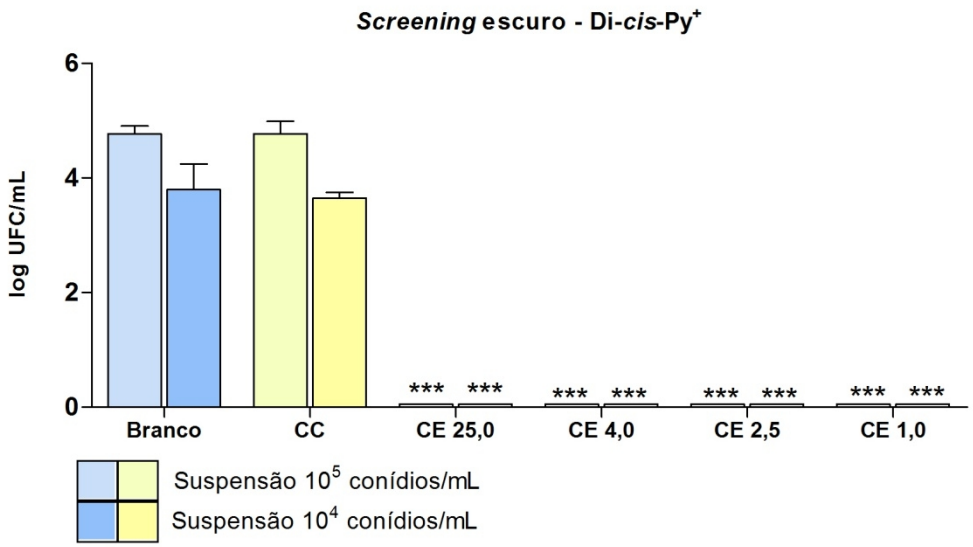


Figura 38 – Gráfico em colunas (log UFC/mL) do *screening* escuro empregando Di-*cis*-Py^+
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²).
CE 25,0: Controle escuro realizado com concentração de Di-*cis*-Py^+ de 25 μM.
CE 4,0: Controle escuro realizado com concentração de Di-*cis*-Py^+ de 4 μM.
CE 2,5: Controle escuro realizado com concentração de Di-*cis*-Py^+ de 2,5 μM.
CE 1,0: Controle escuro realizado com concentração de Di-*cis*-Py^+ de 1,0 μM.
Nível de significância: ***: $p \leq 0,001$.

A redução da concentração para até 1,0 μM demonstrou os mesmos resultados em relação aos obtidos anteriormente. O derivado apresentou toxicidade no escuro, sendo observada pela ausência total de crescimento em todas as concentrações avaliadas após vinte minutos de contato entre o composto e o micro-organismo.

Em relação às propriedades fotofísicas, o derivado se apresenta semelhante à Tetra-Py^+ na geração de oxigênio singlete, mas se apresenta como o menos fotoestável dentre todas as porfirinas avaliadas, o que remete a uma potência

possivelmente reduzida. Porém, através dos ensaios de suposta PDI, a toxicidade evidenciada determinou que o composto não foi adequado para emprego dessa técnica em relação a conídios de *C. graminicola*, mesmo sendo estruturalmente semelhante à Tetra e Tri-Py^+.

4.3.6 PDI empregando Di-*trans*-Py^+ como fotossensibilizador

O segundo derivado dipiridilado avaliado consistiu naquele onde os grupos piridínicos quaternizados se encontram em posições *meso* opostas (FIGURA 19, p.60). Os resultados da PDI realizada empregando Di-*trans*-Py^+ se encontram na tabela 18.

TABELA 18 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO DI-*TRANS*-PY^+ NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS

	0		**5**		**10**		**15**		**20**	
BR	4,93	4,87	--	--	--	--	--	--	--	--
	4,11	4,07	--	--	--	--	--	--	--	--
CC	--	--	--	--	--	--	--	--	4,93	4,93
	--	--	--	--	--	--	--	--	3,72	3,76
CE	--	--	--	--	--	--	--	--	4,59	4,89
	--	--	--	--	--	--	--	--	3,68	3,18
5 μM	4,97	4,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,86	3,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10 μM	4,85	4,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,72	3,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15 μM	4,92	4,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,84	3,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25 μM	4,67	4,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,24	3,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.
BR: branco; CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE* Controle escuro realizado com concentração de Di-*trans*-Py^+ de 25 μM.

Ao contrário dos resultados observados para o derivado na forma *cis*, a porfirina na forma *trans* não demonstrou toxicidade no escuro e, para as concentrações avaliadas inicialmente, apresentou um comportamento semelhante ao observado para o derivado triquaternizado (FIGURA 39).

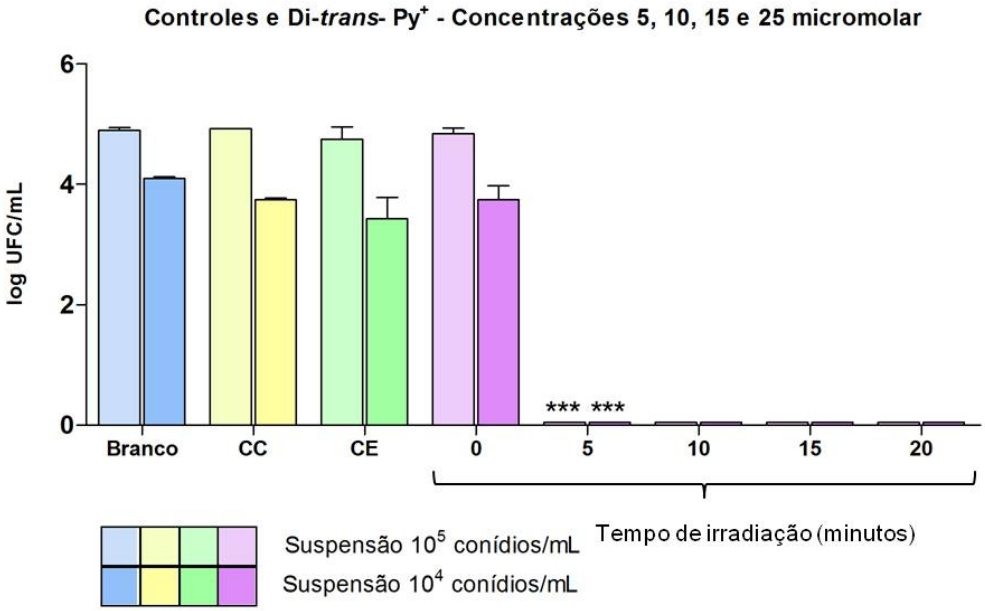


Figura 39 – Gráfico em colunas (log UFC/mL) da PDI empregando Di-*trans*-Py$^+$ como fotossensibilizador nas concentrações 5, 10, 15 e 25 μM e período máximo de irradiação de vinte minutos.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Di-*trans*-Py$^+$ de 25 μM).
Nível de significância: ***: $p \leq 0{,}001$.

Sendo assim, da mesma forma que para avaliação adicional de Tri-Py$^+$, as concentrações foram reduzidas para 1,0 e 2,5 μM (TABELA 19).

TABELA 19 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO DI-*TRANS*-PY$^+$ NAS CONCENTRAÇÕES DE 1,0 E 2,5 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE 20 MINUTOS.

Tempo	**0 min**			**5 min**			**10 min**			**15 min**			**20 min**		
1,0 μM	5,01	5,10	5,17	4,70	4,85	4,95	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
	4,13	4,20	4,32	3,24	3,72	3,89	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
2,5 μM	4,95	5,02	5,08	3,81	3,18	3,93	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
	4,24	4,11	4,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0

FONTE: O autor (2012)
NOTA: Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.

A avaliação das concentrações menores evidenciou diferença de efetividade em relação ao derivado Tri-Py$^+$, para o qual foi observado um comportamento semelhante às concentrações mais elevadas testadas anteriormente (FIGURA 36, p.91).

A figura 40 demonstra os resultados para Di-*trans*-Py$^+$.

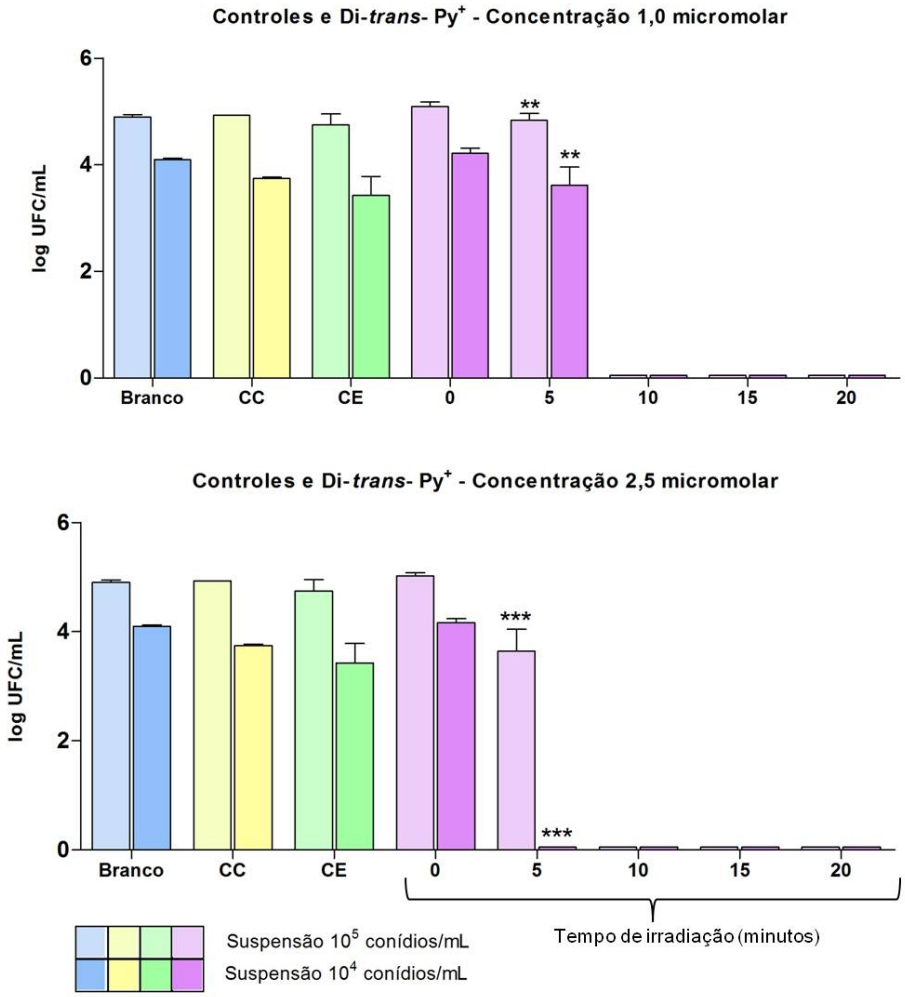


Figura 40 – Gráfico em colunas (log UFC/mL) da PDI empregando Di-*trans*-Py^+ como fotossensibilizador nas concentrações 1,0 e, 2,5 μM e período máximo de irradiação de vinte minutos.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Di-*trans*-Py^+ de 25 μM).
Níveis de significância: **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$

O derivado Di-*trans*-Py^+, quando em concentrações reduzidas apresentou uma potência inativadora inferior. Esse fato foi visualizado pela presença do desenvolvimento fúngico no período de cinco minutos, embora a diferença apresentada tenha se mostrado significativa. Além disso, pode ser verificada uma relação dose-resposta, uma vez que o desenvolvimento após cinco minutos de irradiação empregando concentração mais elevada (2,5 μM) foi inferior ao observado quando foi utilizada concentração de 1,0 μM.

A estabilidade do derivado Di-*trans*-Py^+ frente à irradiação e a geração de oxigênio singlete se mostraram inferiores àquelas observadas para o derivado Tri-

Py^+. Devido a essas razões, embora com atividades semelhantes, o derivado diquaternizado na forma *trans* apresentou potência inferior quando foram testadas concentrações inferiores de fotossensibilizador em relação à Tri-Py^+. Já quando comparada com Tetra-Py^+, a porfirina exibiu maior atividade fotoinativadora de conídios de *C. graminicola*, devido à inativação total observada no período de cinco minutos de irradiação para a concentração de 5 μM enquanto para a mesma concentração de Tetra-Py^+, inativação significativa foi visualizada após dez minutos de irradiação.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata pelas mesmas razões descritas para Tri-Py^+.

Embora sem prejuízos da PDI, é importante ressaltar que a redução da polaridade do composto proporcionou pequena agregação visível na ausência de agitação para as maiores concentrações.

4.3.7 PDI empregando Mono-Py^+ como fotossensibilizador

O último derivado avaliado foi Mono-Py^+, uma porfirina monoquaternizada, com maiores características apolares (TABELA 20 e FIGURA 41).

TABELA 20 – VALORES (log UFC/mL) EM DUPLICATA APÓS PDI EMPREGANDO MONO-PY^+ NAS CONCENTRAÇÕES DE 5, 10, 15 E 25 μM E PERÍODO MÁXIMO DE IRRADIAÇÃO DE VINTE MINUTOS

Tempo	0 min			5 min			10 min			15 min			20 min		
BR	4,60	4,78	5,09	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	4,07	4,14	4,25	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
CC	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4,56	4,79	5,06
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3,76	4,10	3,72
CE*	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4,39	4,55	4,97
	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4,09	3,86	4,18
5μM	4,92	4,77	4,90	4,79	4,62	4,88	4,66	4,53	4,87	4,30	4,52	4,80	4,14	4,34	4,71
	4,04	4,29	4,09	4,14	4,27	4,05	3,95	4,06	4,11	3,74	4,09	3,83	3,89	3,88	3,30
10μM	4,86	4,91	5,10	4,83	4,87	4,96	4,63	4,80	4,89	4,59	4,62	4,73	4,51	4,19	4,55
	4,09	4,03	4,13	3,81	3,74	3,95	3,54	4,10	3,51	3,40	3,40	3,30	2,40	2,88	2,40
15 μM	4,90	4,92	4,84	4,63	4,71	4,81	4,50	4,59	4,82	4,09	4,28	4,35	3,57	3,40	3,51
	4,16	4,06	3,97	3,89	3,84	3,78	3,78	3,91	3,35	3,51	3,78	3,72	0	0	0
25 μM	4,76	4,91	4,96	4,55	4,76	4,88	4,43	4,56	4,60	4,06	4,15	4,50	3,68	3,51	3,76
	4,27	4,11	4,31	4,16	4,19	4,18	3,72	3,60	3,93	3,65	3,54	3,00	0	0	0

FONTE: O autor (2012)

NOTA: Os valores sublinhados correspondem aos obtidos para a suspensão 10^4 conídios/mL.
BR: branco; CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE* Controle escuro realizado com concentração de Mono-Py^+ de 25 μM.

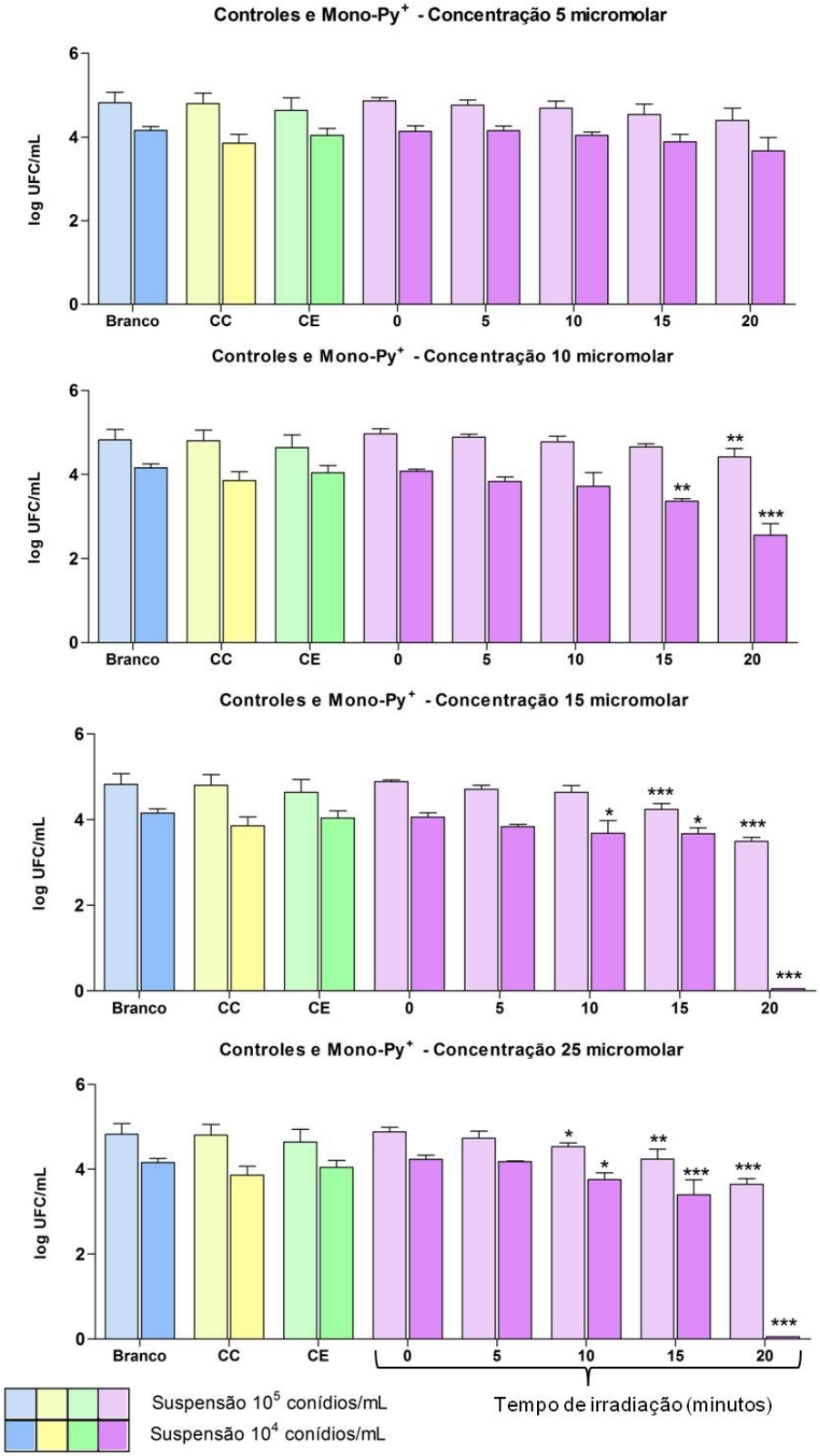


Figura 41 – Gráfico em colunas (log UFC/mL) da PDI empregando Mono-Py$^+$ como fotossensibilizador nas concentrações 5, 10, 15 e, 25 μM e período máximo de irradiação de vinte minutos.
FONTE: O autor (2012)
NOTA: CC: Controle claro (Intensidade luminosa de 100 mW/cm²); CE: controle escuro (concentração de Mono-Py$^+$ de 25 μM).
Nível de significância: *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

A efetividade demonstrada pelo derivado foi a menor dentre aqueles com possibilidade de avaliação na PDI (Tetra-Py^+, Tri-Py^+ e Di-*trans*-Py^+). Inativação significativa do micro-organismo foi observada apenas para as concentrações de 10 μM após quinze minutos de irradiação; concentração de 15 μM após 10 minutos de irradiação apenas para a suspensão conidial menos concentrada e para a concentração de 25 μM após dez minutos de irradiação para ambas as suspensões conidiais. A inativação total do fungo foi observada apenas após vinte minutos de irradiação para as concentrações de 15 μM e 25 μM e somente para a suspensão conidial menos concentrada. Tais resultados inferem uma potência inferior àquela demonstrada por Tetra-Py^+ e, em maior proporção àquela visualizada por Tri-Py^+ e Di-*trans*-Py^+.

A atividade fotoinativadora inferior está diretamente relacionada às características químicas e fotofísicas do composto. Inicialmente, a presença de apenas uma carga positiva na molécula remete a uma menor interação com as estruturas conidiais e a presença de três anéis benzênicos nas posições *meso* indicam uma polaridade consideravelmente reduzida, a qual foi comprovada por uma agregação predominante visível nos poços de PDI na ausência de agitação. Corroborando com essa observação, os ensaios de fotoestabilidade e geração de oxigênio singlete – realizados em solventes polares – evidenciaram queda em maior proporção dessa porfirina quando comparada com as demais. Por isso, tanto a estabilidade frente à irradiação quanto à capacidade de geração de oxigênio singlete não foram totalmente definidas.

Devido a esses fatores, as propriedades fotoinativadoras do derivado Mono-Py^+ demonstraram ser reduzidas, porém, essa atividade foi observada e estudos mais detalhados podem sugerir exatamente o nível de fotoestabilidade e a produção de oxigênio singlete que possam ser associadas aos resultados obtidos.

4.4 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E ATIVIDADE FUNGICIDA

A concentração inibitória mínima (CIM) pode ser definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um

micro-organismo em um teste de sensibilidade por diluição em Agar ou caldo. No teste realizado foi empregado meio de cultura de tecido animal desidratado na forma líquida, desenvolvido pelo Roswell Park Memorial Institute (RPMI – 1640), o qual apresenta composição química definida (ANEXO 9) e considerado satisfatório para utilização em testes de sensibilidade para fungos filamentosos e leveduras (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2002).

A avaliação da concentração fungicida mínima (CFM) consiste em uma continuação do teste de CIM e é realizada para compostos dos quais se desconhece o tipo de atividade sobre o micro-organismo, se fungistática – que representa apenas a inibição da multiplicação – ou fungicida, que ocasiona destruição das estruturas do fungo.

A tabela 21 mostra os resultados obtidos no ensaio de CIM, assim como a CFM obtida para cada porfirina avaliada. As imagens das microplacas demonstrando os resultados da CIM estão demonstradas na figura 42.

TABELA 21 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA OBTIDAS PARA AS CINCO PORFIRINAS AVALIADAS EM CONÍDIOS DE *C. graminicola*.

Porfirina	**CIM (μM)**	**CFM (μM)**
Mono-Py$^+$	> 5000,00	> 5000,00
Di-*trans*-Py$^+$	1,95	1,95
Di-*cis*--Py$^+$	0,97	0,97
Tri-Py$^+$	15,00	15,00
Tetra-Py$^+$	31,00	31,00

FONTE: O autor (2013)
NOTA: CIM: Concentração inibitória mínima
CFM: Concentração fungicida mínima

Figura 42 – Imagens das microplacas obtidas após incubação no ensaio de CIM, com ampliação de um poço evidenciando o crescimento fúngico.
FONTE: O autor (2013)
NOTA: CIM: Concentração inibitória mínima.

Em relação à CFM, após incubação da placa molde de Agar Sabouraud Dextrosado (FIGURA 14, p.52), essa foi analisada quanto ao crescimento do micro-organismo. A coincidência com os valores obtidos para CIM confirma que essas concentrações consistem nas CFM para os diferentes derivados. A atividade é relatada como fungicida, pois em caso de atividade fungistática a multiplicação do fungo seria reativada após a transferência para meio de cultura adequado, resultando em crescimento na região correspondente à CIM e concentrações superiores.

Essas avaliações foram realizadas com o intuito de complementar os ensaios de PDI e analisar o tipo e a amplitude dos efeitos das porfirinas sobre o micro-organismo de acordo com metodologia oficial para agentes de atividade desconhecida.

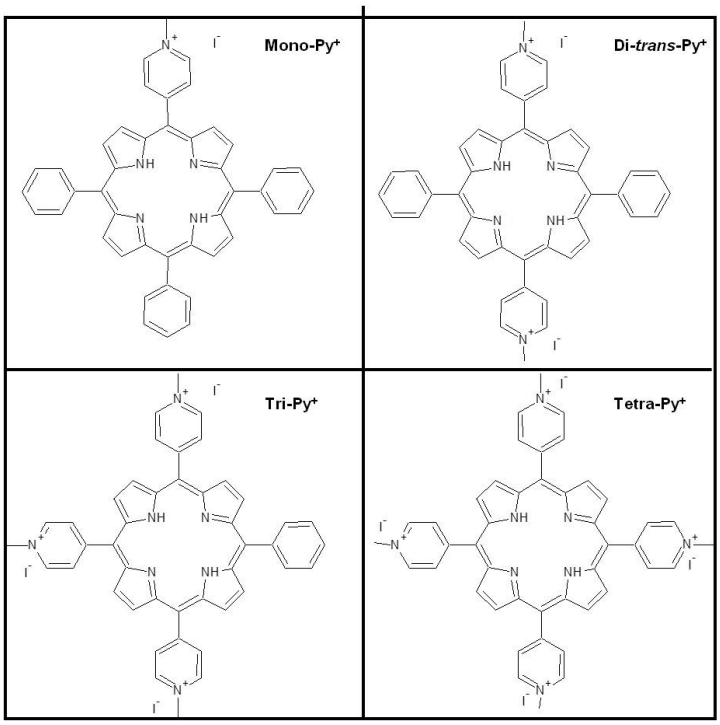
Dentre as porfirinas avaliadas, apenas uma (Di-*cis*-Py^+) pode ser considerada como um candidato a agente antifúngico, uma vez que demonstrou toxicidade ao micro-organismo em concentrações baixas, na ausência de qualquer luminosidade e em períodos curtos de tempo (vinte minutos). Porém, a atividade inibidora deve ser comprovada com estudos que contenham uma amostra maior do que a avaliada no presente estudo.

Por sua vez, as demais porfirinas não mostraram atuar como agentes antifúngicos (Mono-Py^+, Di-*trans*-Py^+, Tri-Py^+ e Tetra- Py^+), sendo eficientes como fotossensibilizadores a serem empregados na PDI. Mesmo em níveis variáveis, todos os derivados exibiram inativação significativa do fungo em concentrações inferiores aos valores obtidos para a CIM aliados a exposição à luz em períodos curtos de irradiação (inferior a vinte minutos).

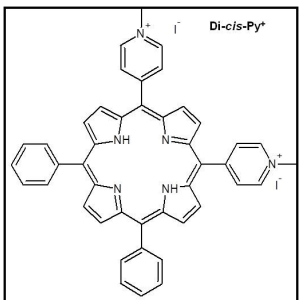
Sendo assim, a maioria dos derivados avaliados em associação com a luz visível e oxigênio atmosférico promoveram inativação significativa de conídios de *C. graminicola*, comprovando a eficiência do processo fotodinâmico em detrimento do emprego de compostos químicos isoladamente.

4.5 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE E AVALIAÇÃO EM ENSAIOS *IN VIVO*

As porfirinas avaliadas são pertencentes a uma mesma “família”, sendo *meso*-substituídas por grupos aromáticos com variações no número de cargas e a posição dessas para o caso dos derivados diquaternizados. Dentre os cinco derivados, quatro foram caracterizados como adequados fotossensibilizadores (QUADRO 11) e apenas um demonstrou toxicidade no escuro e, por essa razão, não pode ser empregado em ensaios de PDI (QUADRO 12)..



QUADRO 11 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS DERIVADOS PORFIRINICOS ADEQUADOS COMO FOTOSSENSIBILIZADORES
FONTE: O Autor (2012)



QUADRO 12 – ESTRUTURA QUÍMICA DO DERIVADO PORFIRINICO NÃO ADEQUADO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR POR TER DEMONSTRADO TOXICIDADE NO ESCURO.
FONTE: O Autor (2012)

A eficiência dos compostos fotossensibilizadores demonstrou ser variável e foi mensurada em relação a dois parâmetros: concentração do composto necessária para inativação significativa de conídios de *C. graminicola* para as duas suspensões conidiais avaliadas e período de irradiação necessário para a inativação (TABELA 22).

TABELA 22 – CONCENTRAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADOR E TEMPO DE IRRADIAÇÃO NECESSÁRIOS PARA INATIVAÇÃO SIGNIFICATIVA DE CONÍDIOS DE *C. graminicola*.

Porfirina	Concentração (μM)	Tempo de irradiação (minutos)
Mono-Py$^+$	10,0	20
Di-*trans*-Py$^+$	1,0	5
Tri-Py$^+$	< 1,0	< 5
Tetra-Py$^+$	5,0	10

FONTE: O autor (2013)

A ordem de eficiência fotoinativadora dos derivados consistiu em Tri-Py$^+$ > Di-*trans*-Py$^+$ > Tetra-Py$^+$ > Mono-Py$^+$. Esses resultados indicam que o número de cargas consiste em um importante aspecto a ser considerado, porém, não isoladamente, pois o derivado tetraquaternizado se apresentou como o terceiro mais eficiente. Por isso, a eficiência de um fotossensibilizador na inativação de micro-organismos é devida a uma série de fatores, dentre esses fotoestabilidade e capacidade de geração de oxigênio singlete.

Devido à elevada descrição e caracterização na literatura do emprego do derivado Tetra-Py$^+$, esse foi utilizado como referência para os experimentos, porém não mostrou ser o mais eficiente e, apesar da elevada fotoestabilidade, a capacidade de geração de oxigênio singlete se mostrou inferior àquela observada para Tri-Py$^+$ e Di-*trans*-Py$^+$ de acordo com o método utilizado. Nesse contexto, o presente estudo identificou dois fotossensibilizadores com excelente atividade na fotinativação de conídios de *C. graminicola*, os quais não estão relacionados na literatura.

A transposição para ensaios *in vivo* exige uma avaliação profunda de diversos critérios, especialmente a relação custo-benefício. A geração de compostos eficientes com menor custo é necessária para implementação do processo na agricultura. Assim, embora Tetra-Py$^+$ tenha mostrado eficiência inferior a duas porfirinas relacionadas, em termos sintéticos esse composto demonstra vantagens:

a presença de quatro substituintes iguais em posições *meso* possibilita o emprego apenas do reagente piridina-4-carboxaldeído para condensação com pirrol e a presença isolada dessa porfirina no meio reacional permite que a precipitação auxiliada por solvente resulte na obtenção direta do composto, não sendo necessária separação posterior empregando cromatografia em coluna (FIGURA 20, p.61). Nesse aspecto, há intensa economia em relação a solventes orgânicos – clorofórmio, metanol – assim como da fase estacionária sílica gel. Ainda, a eliminação da etapa de separação auxilia na obtenção de maiores quantidades do composto. Além do aspecto material, o tempo para obtenção do composto e consequente aplicação se torna consideravelmente reduzido.

Por essas razões, ainda que Tri-Py$^+$ e Di-*trans*-Py$^+$ tenham mostrado maior eficiência na inativação de conídios de *C. graminicola*, em termos sintéticos, essas porfirinas desprendem maiores custos, pois necessitam na etapa adicional de separação e por isso, os rendimentos se apresentam inferiores.

Apesar da eficiência inferior demonstrada por Tetra-Py$^+$, a porfirina é que apresenta maior viabilidade para a transposição para ensaios *in vivo* em relação a custos e, a eficiência mostrada, embora inferior, é adequada para a inativação de conídios de *C. graminicola*.

5 CONCLUSÃO

O procedimento de PDI tem demonstrado efetividade frente a diversos tipos de micro-organismos, porém, tais estudos são escassos quando relacionados à fitopatologia.

No presente estudo, foram avaliadas as propriedades fotodinâmicas inativadoras de cinco *meso*-tetra-arilporfirinas estruturalmente relacionadas em relação a conídios em forma de foice de *Colletotrichum graminicola*, fitopatógeno causador da antracnose foliar e do colmo em milho.

Foram sintetizados, identificados e purificados quatro derivados porfirínicos *meso* substituídos relacionados ao iodeto de tetraquis-5,10,15,20 (*N*-metilpiridino-4-il)porfirina (Tetra-Py^+) - inclusive essa -, um fotossensibilizabor altamente utilizado. Variações estruturais consistiram na quantidade e posições dos anéis piridínicos com nitrogênio quaternizado.

Propriedades fotofísicas de fotoestabilidade e produção de oxigênio singlete foram avaliadas para todas as porfirinas. Dentre a primeira característica, os derivados com maior número de cargas exibiram maior estabilidade frente à radiação ultravioleta, sendo o derivado diquaternizado na forma *cis* o que exibiu menor estabilidade. Por sua vez, a produção de oxigênio singlete foi superior para o derivado triquaternizado, sendo semelhante para ambos os diquaternizados e Tetra-Py^+. Para ambas as avaliações, o fenômeno da agregação dificultou a visualização das propriedades do derivado monoquaternizado.

No caso da PDI, o derivado Tetra-Py^+ foi utilizado como referência para definição de concentrações de fotossensibilizador e comparação com a atividade fotoinativadora exibida pelos demais derivados. Dentre todas as porfirinas avaliadas, a triquaternizada e diquaternizada na forma *trans* exibiram maior potência frente à fotoinativação de conídios de *C. graminicola*, traduzida por inativação total do micro-organismo empregando concentrações reduzidas de fotossensibilizador e períodos curtos de irradiação. O derivado de referência apresentou atividade fotoinativadora de acordo com dados da literatura, porém com menor potência quando comparada aos anteriores. A porfirina monoquaternizada foi a que demonstrou menor potência dentre as quatro avaliadas. Por sua vez, o derivado diquaternizado na forma *cis*

apresentou elevada toxicidade no escuro, não sendo passível de emprego nos ensaios de PDI.

As propriedades fotoinativadoras dos derivados se relacionam diretamente às características fotofísicas e químicas dos compostos. Aliada à fotoestabilidade e capacidade geradora de oxigênio singlete, o número de cargas e a disposição dessas refletem diretamente na interação dos fotossensibilizadores com o solvente aquoso utilizado nos experimentos, além de influenciar na proporção do fenômeno de agregação. Para a série de *meso*-tetra-arilporfirinas avaliadas o aumento no número de cargas positivas foi um facilitador da interação entre os compostos e as estruturas do micro-organismo refletindo em inativação superior. Entretanto, mesmo na presença de apenas duas cargas positivas, o derivado diquaternizado na forma *trans* demonstrou elevadas propriedades fotoinativadoras. Por sua vez, o derivado monoquaternizado demonstrou reduzida potência dentre todas as porfirinas avaliadas e o fenômeno da agregação se apresentou como o mais pronunciado, devido à polaridade inferior demonstrada por esse composto. Outra observação consistiu em que diferentes comportamentos ocorrem de acordo com a posição das cargas, evidenciada pela toxicidade demonstrada no escuro pela porfirina diquaternizada na forma *cis*.

Tendo em vista a efetividade do procedimento, a transposição para ensaios *in vivo* pode ser realizada. Nesse caso, embora sem demonstrar a maior potência, o derivado referência (Tetra-Py^+) consiste na melhor alternativa, pois demonstrou inativação significativa mesmo em concentrações baixas da ordem de 5 μM e, especialmente, a síntese dessa porfirina pode ser realizada diretamente através da condensação de pirrol com piridina-4-carboxaldeído seguida por cristalização e quaternização. A obtenção de apenas um composto e a não necessidade do emprego de separações por colunas cromatográficas aumenta o rendimento do derivado, ocasionando aumento considerável na economia do processo.

A efetividade na fotoinativação de conídios de *C. graminicola* empregando *meso*-tetra-arilporfirinas foi demonstrada e pode consistir em uma importante alternativa ao uso de fungicidas e contribuir para os aspectos econômico, social e de saúde pública no Brasil.

REFERÊNCIAS

ADLER, A. D.*, et al.* A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 476-476, 1967.
.

ALVES, E.*, et al.* Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 70, 2009.

AMAT-GUERRI, F.*, et al.* Water-soluble 1,3-diphenylisobenzofuran derivatives. Synthesis and evaluation as singlet molecular oxygen acceptors for biological systems. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 49-56, 1996.

ARNETT, E. M.; REICH, R. Electronic effects on the Menshutkin reaction. A complete kinetic and thermodynamic dissection of alkyl transfer to 3- and 4-substituted pyridines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 18, p. 5892-5902, 1980.

ARUNKUMAR, E.*, et al.* Singlet oxygen generation using iodinated squaraine and squaraine-rotaxane dyes. **New Journal of Chemistry**, v. 31, n. p. 677–683 2007.

AVILA-ADAME, C.; OLAYA, G.; KÖLLER, W. Characterization of *Colletotrichum graminicola* isolates resistant to strobilurin-related QoI Fungicides. **Plant Disease**, v.87, n.12, p.1426-1432, 2003.

BARBOSA, M. P. M. **Variabilidade patogênica de *Colletotrichum graminicola* isolado de milho (*Zea mays* L.)**. 112 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Setor de Ciências Agrárias, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2002.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The Biology of Corn Anthracnose: Knowledge to Exploit for Improved Management. **Plant disease**, v. 83, n. 7, p. 596-608, 1999.

BEVERINA, L.*, et al.* New π-Extended Water-Soluble Squaraines as Singlet Oxygen Generators. **Organic Letters**, v. 7, n. 19, p. 4257-4260, 2005.

BONNETT, R.; MARTÍNEZ, G. Photobleaching of Sensitisers Used in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, London, v. 57, p. 9513-9547, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Cultura do Milho**. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>. Acesso em: 25/01/2013.

BRASLAVSKY, S. E. Glossary of terms used in photochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 293-465, 2007.

CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A Comprehensive Overview of Photodynamic Therapy in the Treatment of Superficial Fungal Infections of the Skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, n. 1, p. 1-6, 2005.

CAMINOS, D. A.; DURANTINI, E. N. Interaction and photodynamic activity of cationic porphyrin derivatives bearing different patterns of charge distribution with GMP and DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 198, n. 2-3, p. 274-281, 2008.

CARDWELL, K. F.; HEPPERLY, P. R.; FREDERIKSEN, R. A. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. **Plant Disease**, 73: 255-257, 1989.

CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J. Photochemistry. In:_____. **Advanced Organic Chemistry**: part A: Structure and Mechanisms. New York: Springer, 2007. p. 1073-1156.

CARRÉ, V.*, et al.* Fungicidal Properties of Meso-Arylglycosylporphyrins: Influence of Sugar Substituents on Photoinduced Damage in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 48, p. 57-62, 1999.

CASAS, C.*, et al.* Synthesis of cationic metalloporphyrin precursors related to the design of DNA cleavers. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 2913-2917, 1993.

CASTANO, A.; DEMIDOVA, T.; HAMBLIN, M. Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part One: Photosensitizers, Photochemistry and Cellular Localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

ČEKLOVSKÝ, A. **Spectral properties of porphyrins in the systems with layered silicates.** 81 p. Tese (Doctoral dissertation) - Department of Hydrosilicates, Slovak Academy of Sciences, 2009.

CHEN, B.*, et al.* Synthesis of some multi-β-substituted cationic porphyrins and studies on their interaction with DNA. **Tetrahedron**, v. 62, n. 23, p. 5487-5497, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Norma M38-A**: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. Wayne, 2002.

COÊLHO, R. M. S, *et al.* Controle monogênico da antracnose foliar em milho. **Fitopatologia Brasileira** 26: 640-643, 2001.

CORMICK, M. P.*, et al.* Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* Sensitized by Tri- and Tetra-Cationic Porphyrin Derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1592-1599, 2009.

COSTA, R. V. D.*, et al.* Incidência de Colletotrichum graminicola em colmos de genótipos de milho. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 122-128, 2010.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B. B.; HILLMAN, B. I. Phylogenetic Relationships and Fungicide Sensitivities of *Colletotrichum graminicola* isolates from turfgrass in North America. **International Turfgrass Society**, v.10, p.183-195, 2005.

DARGIEWICZ, J.; MAKARSKA, M.; RADZKI, S. Spectroscopic characterization of water-soluble cationic porphyrins in sol-gel silica matrices and coatings. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 208, n. 1, p. 159-165, 2002.

DETTY, M. R.; MERKEL, P. B. Chalcogenapyrylium dyes as potential photochemotherapeutic agents. Solution studies of heavy atom effects on triplet yields, quantum efficiencies of singlet oxygen generation, rates of reaction with singlet oxygen, and emission quantum yields. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 10, p. 3845-3855, 1990.

DONNELLY, R.; MCCARRON, P.; TUNNEY, M. Antifungal Photodynamic Therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Empraba). Embrapa Milho e Sorgo. **Antracnose do milho (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: 2001. 6p. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30147/1/circ-13.pdf>. Acesso em: 30/06/2011. Circular técnica n°13.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Empraba). Embrapa Milho e Sorgo. **Efeito da podridão de colmo, causada por *Colletotrichum graminicola*, na produção da cultura do milho**. Sete Lagoas: 2009. 5p. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2009/circular/Circ_120.pdf>. Acesso em: 30/03/2011. Circular técnica n°120.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Empraba). Embrapa Milho e Sorgo. **Métodos de Inoculação de *Colletotrichum graminicola* em Colmo de Milho**. Sete Lagoas: 2010. 7p. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2010/circular/Circ_137.pdf>. Acesso em: 15/08/2011. Circular técnica n°137.

ENGELMANN, F.*, et al.* Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 12-18, 2007.

FELBER, T. D.*, et al.* Photodynamic Inactivation of Herpes Simplex. **The Journal of American Medical Association**, v. 223, n. 3, p. 289-292, 1973.

FLEISCHER, E. B.; SHACHTER, A. M. Linked porphyrin systems. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 28, n. p. 1693-1699, 1991.

FRIEDBERG, J. S.*, et al. In Vitro* Effects of Photodynamic Therapy on *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**, v. 48, p. 105-107, 2001.

GAD, F.*, et al.* Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2173-2178, 2004.

GOMES, M. C.*, et al.* Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 10, n. 11, p. 1735, 2011.

GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 6, n. p. 138-163, 1961.

GOUTERMAN, M.; WAGNIÈRE, G. H.; SNYDER, L. C. Spectra of porphyrins: Part II. Four orbital model. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 11, n. 1-6, p. 108-127, 1963.

GRELLIER, P.*, et al.* Photosensitized inactivation of *Plasmodium falciparum*- and *Babesia divergens*-infected erythrocytes in whole blood by lipophilic pheophorbide derivatives. **Vox Sanguinis**, v. 72, n. 4, p. 211-220, 1997.

HADJUR, C.*, et al.* Spectroscopic Studies of Photobleaching and Photoproduct Formation of Meta(Tetrahydroxyphenyl)Chlorin (M-THPC) Used in Photodynamic Therapy. The Production of Singlet Oxygen by M-THPC. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 45, n. 2-3, p. 170-178, 1998.

HERRERA, T.; ULLOA, M. **El Reino De Los Hongos:** Micologia básica y aplicada. México: Instituto de Biologia, Universidad Nacional Autonoma de México, 1990.

JORI, G.; BROWN, S. B. Photosensitized inactivation of microorganisms. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, n. 5, p. 403-405, 2004.

JORI, G.*, et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 468-481, 2006.

KALDAPA, C.*, et al.* Synthesis of new glycosylated neutral and cationic porphyrins dimers. **Tetrahedron Letters**, v. 41, n. 3, p. 331-335, 2000.

KASSAB, K.*, et al.* Phthalocyanine-photosensitized inactivation of a pathogenic protozoan, *Acanthamoeba palestinensis*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, n. 6, p. 668-672, 2003.

KNOGGE, W. Fungal Infection of Plants. **The Plant Cell**, v.8, p.1711-1722, 1996.

LAMBRECHTS, S. A. G.; AALDERS, M. C. G.; VAN MARLE, J. Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2026-2034, 2005.

LIMA, M. L. F.; MENEZES, M. Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum graminicola* através da análise eletroforética de padrões proteicos e isoenzimáticos. **Fitopatologia Brasileira**, 27:012-016. 2002.

LINDIG, B. A.; RODGERS, M. A. J.; SCHAAP, A. P. Determination of the lifetime of singlet oxygen in water-d2 using 9,10-anthracenedipropionic acid, a water-soluble probe. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 17, p. 5590-5593, 1980.

LUKSIENE, Z.; PECIULYTE, D.; LUGAUSKAS, A. Inactivation of Fungi *in vitro* by Photosensitization: Preliminary Results. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 11, p. 215-220, 2004.

LUMACARE. **LumaCare Products:** LumaCare Model LC 122. Newport Beach,, 2012. Disponível em: < http://lumacare.com/CANSA/products-122a.html>. Acesso em: 17/01/2012.

MAISCH, T.*, et al.* Antibakterielle photodynamische Therapie. **Der Hautarzt**, v. 56, n. 11, p. 1048-1055, 2005.

MAKARSKA, M.; RADZKI, S. Water-soluble porphyrins and their metal complexes. **Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska Lublin - Polonia**, v. 17, Sectio AA, 2002.

MAKARSKA, M.; RADZKI, S.; LEGENDZIEWICZ, J. Spectroscopic characterization of the water-soluble cationic porphyrins and their complexes with Cu(II) in various solvents. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 341, n. p. 233-238, 2002.

MATSUMOTO, J.*, et al.* Water-soluble phosphorus porphyrins with high activity for visible light-assisted inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 218, n. 1, p. 178-184, 2011.

MENG, G. G.; JAMES, B. R.; SKOV, K. A. Porphyrin chemistry pertaining to the design of anti-cancer drugs; part 1, the synthesis of porphyrins containing meso-pyridyl and meso-substituted phenyl functional groups. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 72, n. 9, p. 1894-1909, 1994.

MERCURE, E.W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. 45, p. 407-420, 1994.

MILGROM, L. R. **The Colours of life**: an introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds. Oxford University Press, New York, 1997.

NICHOLSON, R. L.; MORAES, W. B. C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the Spore Matrix. **Phytopathology**, v. 70, p. 255-261, 1980.

NICHOLSON, R. L.; BUTLER, L. G.; ASQUITH, T. N. Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: Implications for survival and Virulence of Phytopathogenic Fungi. **Phytopathology**, v. 76, n. p. 1315-1318, 1986.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiologial Plant Pathology**, v. 27, n. 1, p. 75-98, 1985.

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

PANACCIONE, D. G.; VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**, v. 81, n. 6, p. 876-883, 1989.

PELOI, L. S.*, et al.* Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with Leishmania (*Leishmania amazonensis*). **Experimental Parasitology**, 2011.

PERFECT, S. E.*, et al. Colletotrichum*: A Model Genus for Studies on Pathology and Fungal–Plant Interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 186-198, 1999.

PERFINITY Biosciences. **Solvent Miscibility and Viscosity Chart**. West Lafayette, 2012. Resources. Disponível em: < http://www.perfinity.com/downloads/Solvent%20Miscibility%20and%20Polarity%20Chart.pdf> Acesso em: 15/12/2012.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

REDDI, E. *et al*. Photophysical Properties and Antibacterial Activity of Meso-substituted Cationic Porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 5, p. 462-470, 2002.

SILVA, P. R. D. **Estudo da imobilização de porfirinas em sílica nanoparticulada e da sua interação com oxigênio e ferro: possíveis aplicações biomédicas e analíticas**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46133/tde-15062009-091643/pt-br.php>. Acesso em: 13/09/2012.

SLOMP, A. M. **Síntese e Avaliação das Propriedades Fotodinâmicas de meso-tetra-arilporfirinas em Queratinócitos Humanos (HaCat)**. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SOARES, W. L. **Uso dos agrotóxicos e seus impactos à saúde e ao ambiente: uma avaliação integrada entre a economia, a saúde pública, a ecologia e a agricultura**. 163 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Saúde Pública e Meio Ambiente, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica-parte 1** Tradução de: LIN, W. O. 7 ed. Rio de Janeiro Livros Técnicos e Científicos Editora, 2001. Organic Chemistry - part 1.

SPEIRS, N. M.; EBENEZER, W. J.; JONES, A. C. Observation of a Fluorescent Dimer of a Sulfonated Phthalocyanine¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 3, p. 247-251, 2002.

STIEF, T. The Physiology and Pharmacology of Singlet Oxygen. **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 4, p. 567-572, 2003.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. **Normas** para apresentação de documentos científicos. 3ª edição. Curitiba, 2007.

VAILLANCOURT LAB. Disponível em: <http://www.ca.uky.edu/agcollege/plantpathology/Vaillanc/infpg.htm>. Acesso em: 19/4/2011.

VIZVARY, M. A.; WARREN, H. L. Survival of *Colletotrichum graminicola* in Soil. **Phytopatology**, v. 72, p. 522-525, 1982.

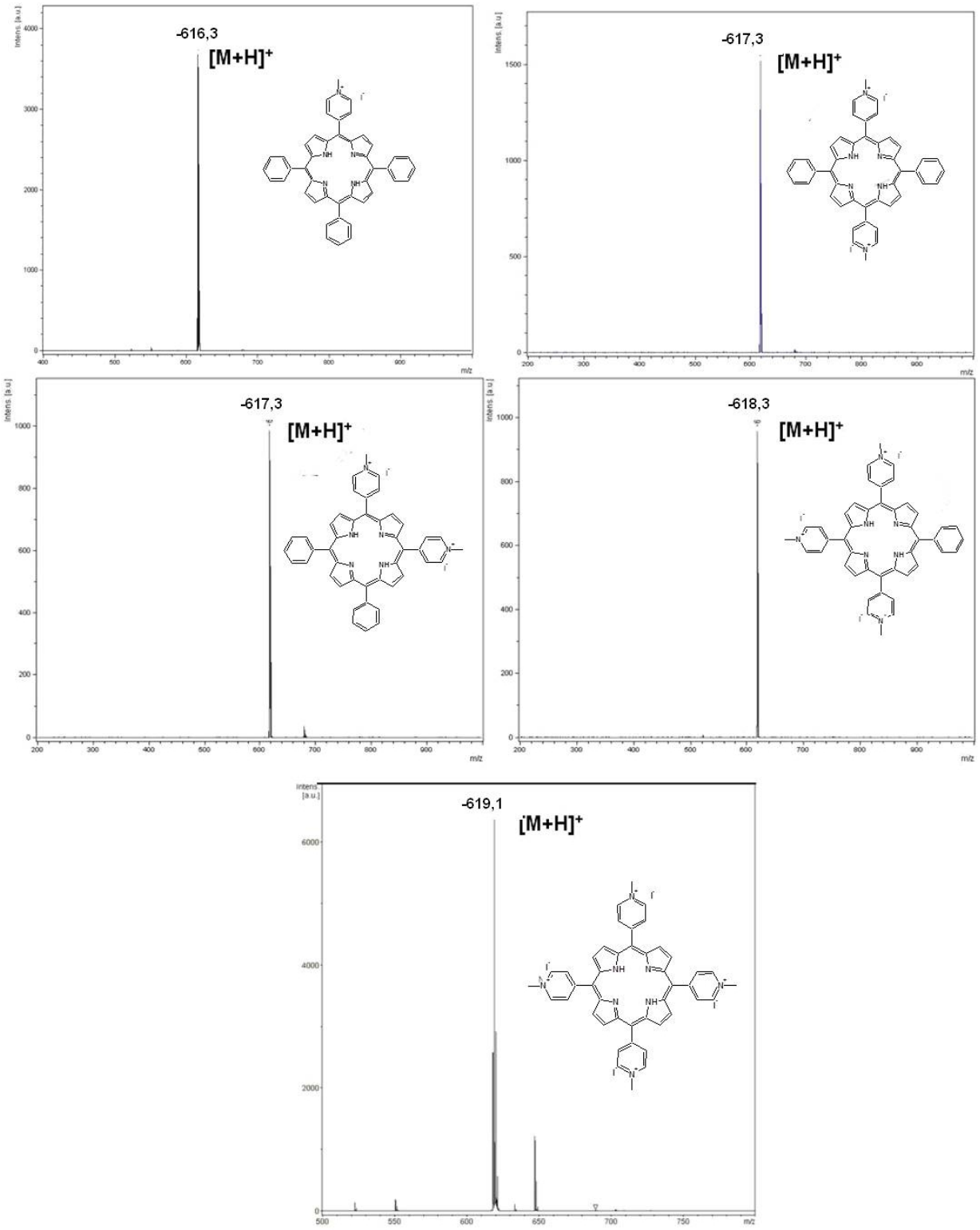
WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, n. p. 13-28, 1998.

WICKLOW, D. T.; JORDAN, A. M.; GLOER, J. B. Antifungal Metabolites (Monorden, Monocillins I, II, III) from *Colletotrichum graminicola*, a Systemic Vascular Pathogen of Maize. **Mycological Research**, v. 113, n. 12, p. 1433-1442, 2009.

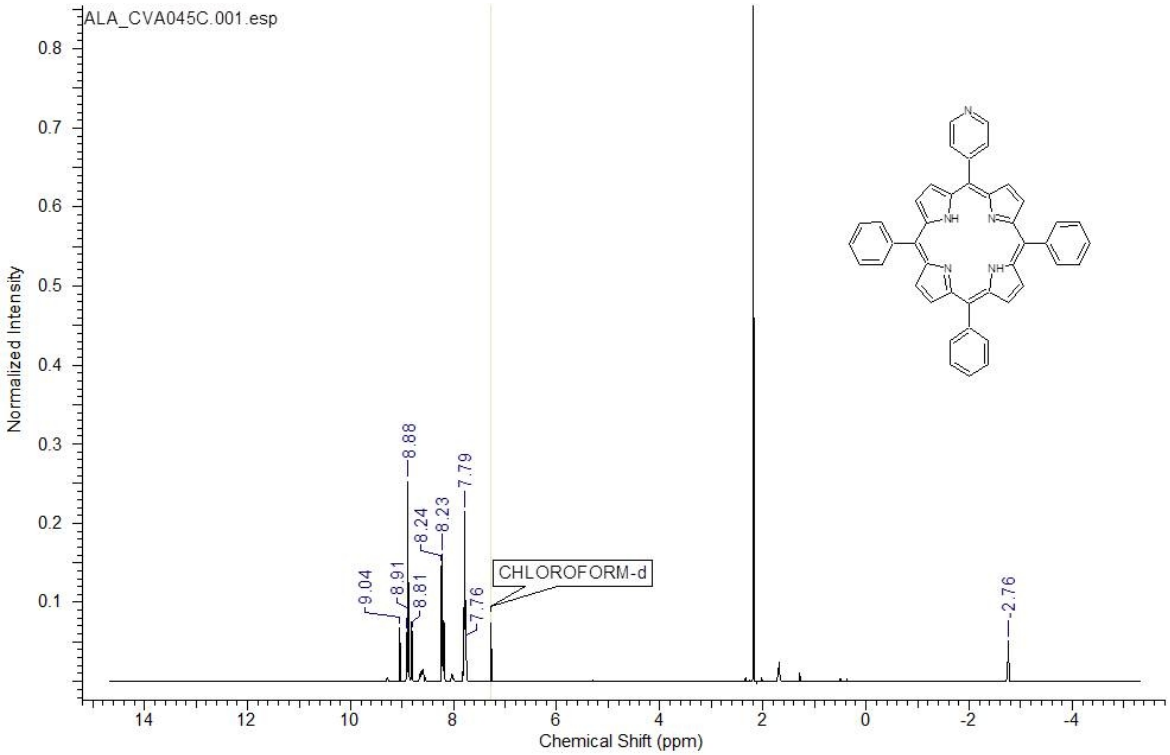
ZIMMERMAN, S. C*., et al.* Molecular Imprinting Inside Dendrimers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 44, p. 13504-13518, 2003.

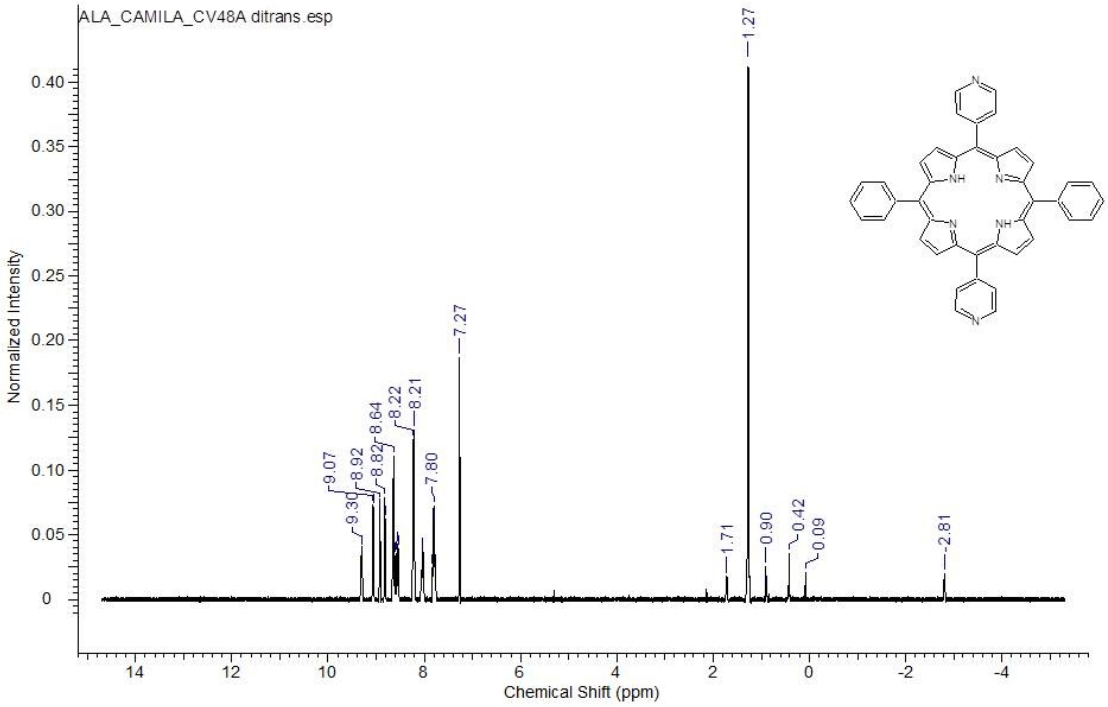
ANEXOS

ANEXO 1 – ESPECTROS DE MALDI-TOF (POSITIVO) DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS NA FORMA NEUTRA 117
ANEXO 2 – ESPECTROS RMN DE ^{1}H DOS DERIVADOS MONO E *TRANS*-DIPIRIDILADO NA FORMA NEUTRA 118
ANEXO 3 – ESPECTROS RMN DE ^{1}H DOS DERIVADOS *CIS*-DI E TRIPIRIDILADO NA FORMA NEUTRA 119
ANEXO 4 – ESPECTRO RMN DE ^{1}H DO DERIVADO TETRAPIRIDILADO NA FORMA NEUTRA 120
ANEXO 5 – VALORES EM DUPLICATA RELATIVOS À ABSORBÂNCIA DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS NA PRESENÇA E NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO 121
ANEXO 6 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS COM O PROGRAMA UV-PROBE APÓS IRRADIAÇÃO DOS DERIVADOS 122
ANEXO 7 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS COM O PROGRAMA UV-PROBE NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO 123
ANEXO 8 – VALORES DE ABSORBÂNCIA DO DFIBF E PORFIRINAS OBTIDOS NO ENSAIO DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE. 124
ANEXO 9 – COMPOSIÇÃO DO MEIO RPMI-1640 125

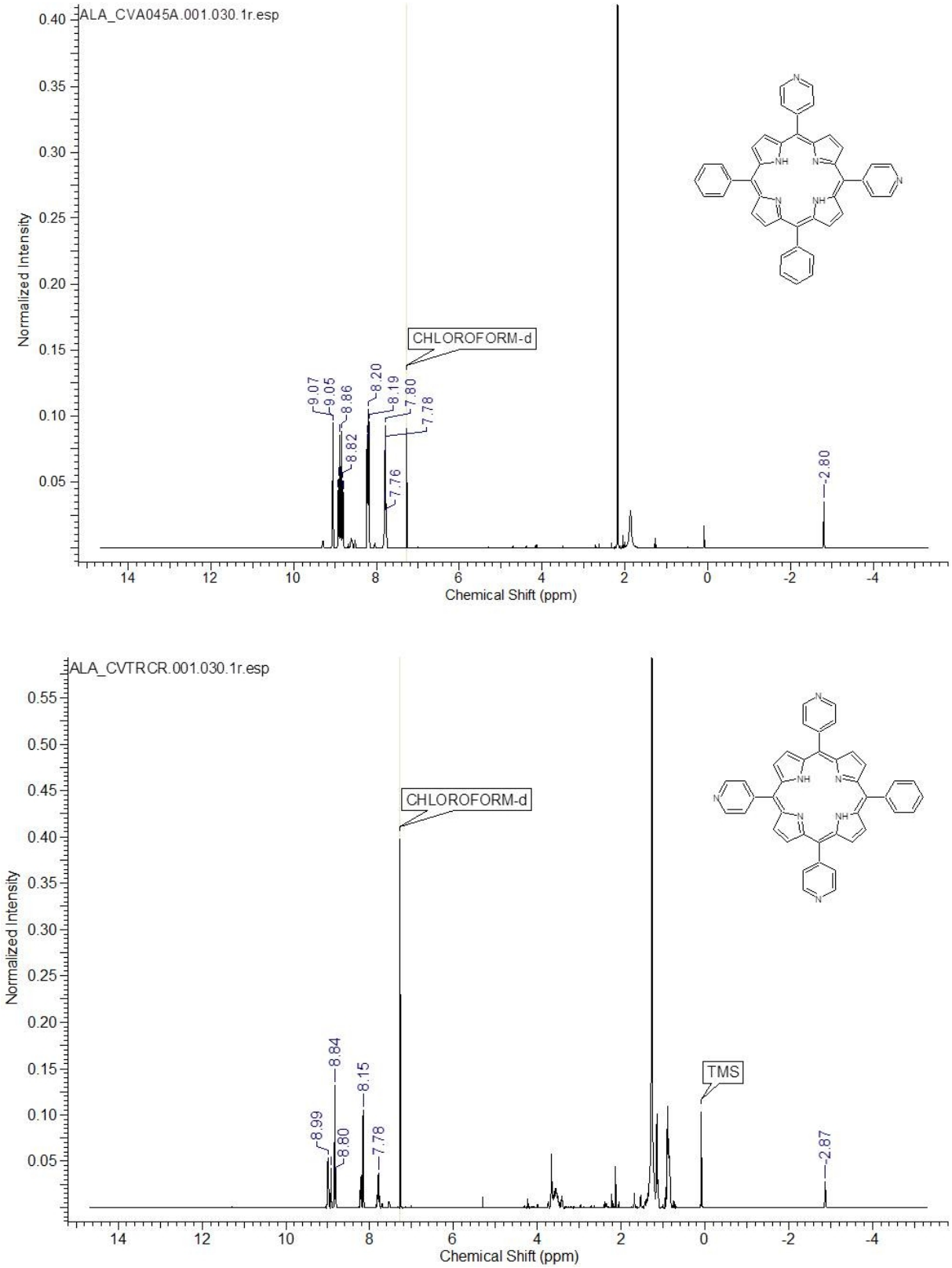


ANEXO 1 – ESPECTROS DE MALDI-TOF (POSITIVO) DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS NA FORMA NEUTRA
FONTE: O autor (2012)

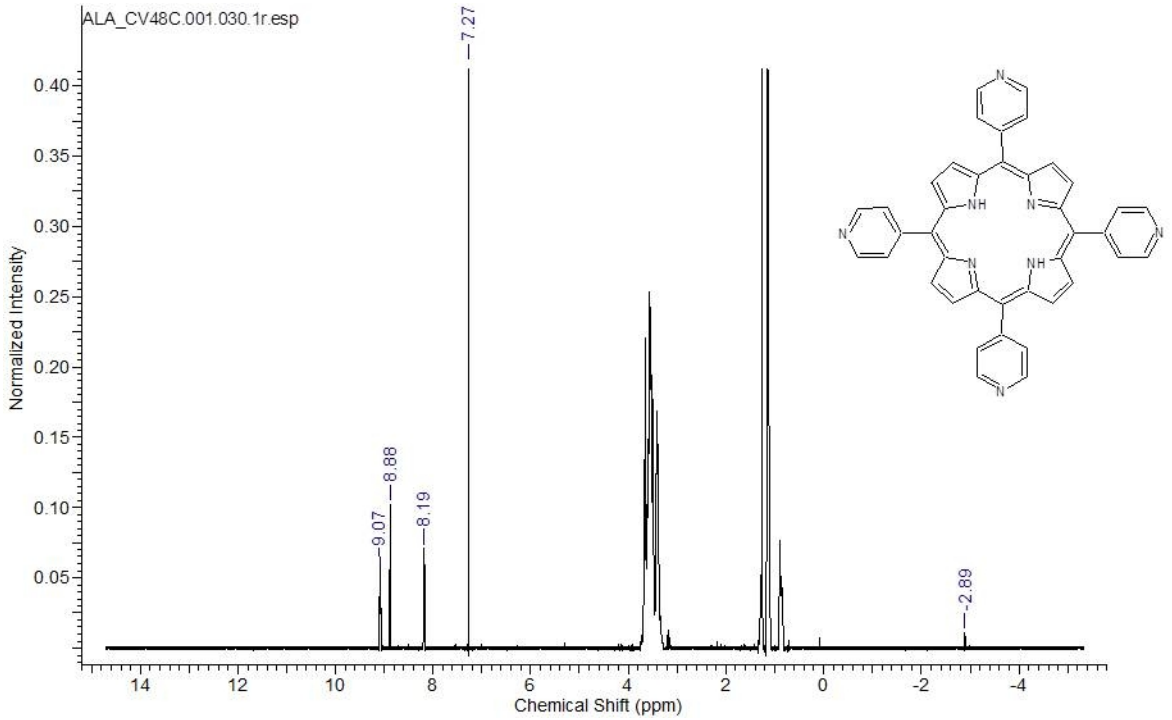




ANEXO 2 – ESPECTROS de RMN DE ^{1}H DOS DERIVADOS MONO E *TRANS*- DIPIRIDILADO NA FORMA NEUTRA
FONTE: O autor (2012)



ANEXO 3 – ESPECTROS DE RMN DE ^{1}H DOS DERIVADOS *CIS*-DI E TRIPIRIDILADO NA FORMA NEUTRA
FONTE: O autor (2012)

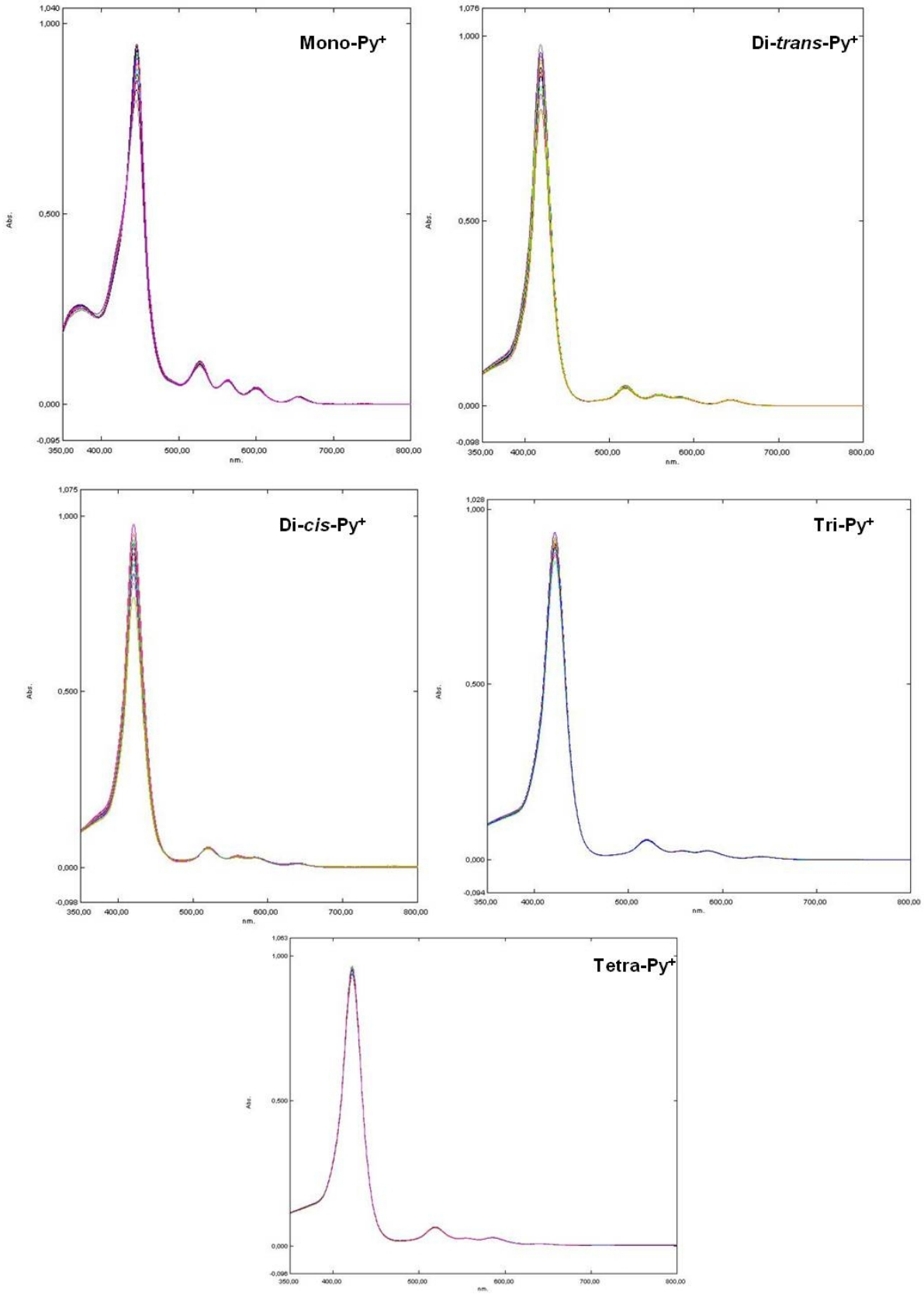


ANEXO 4 – ESPECTRO DE RMN DE ^{1}H DO DERIVADO TETRAPIRIDILADO NA FORMA NEUTRA
FONTE: O autor (2012)

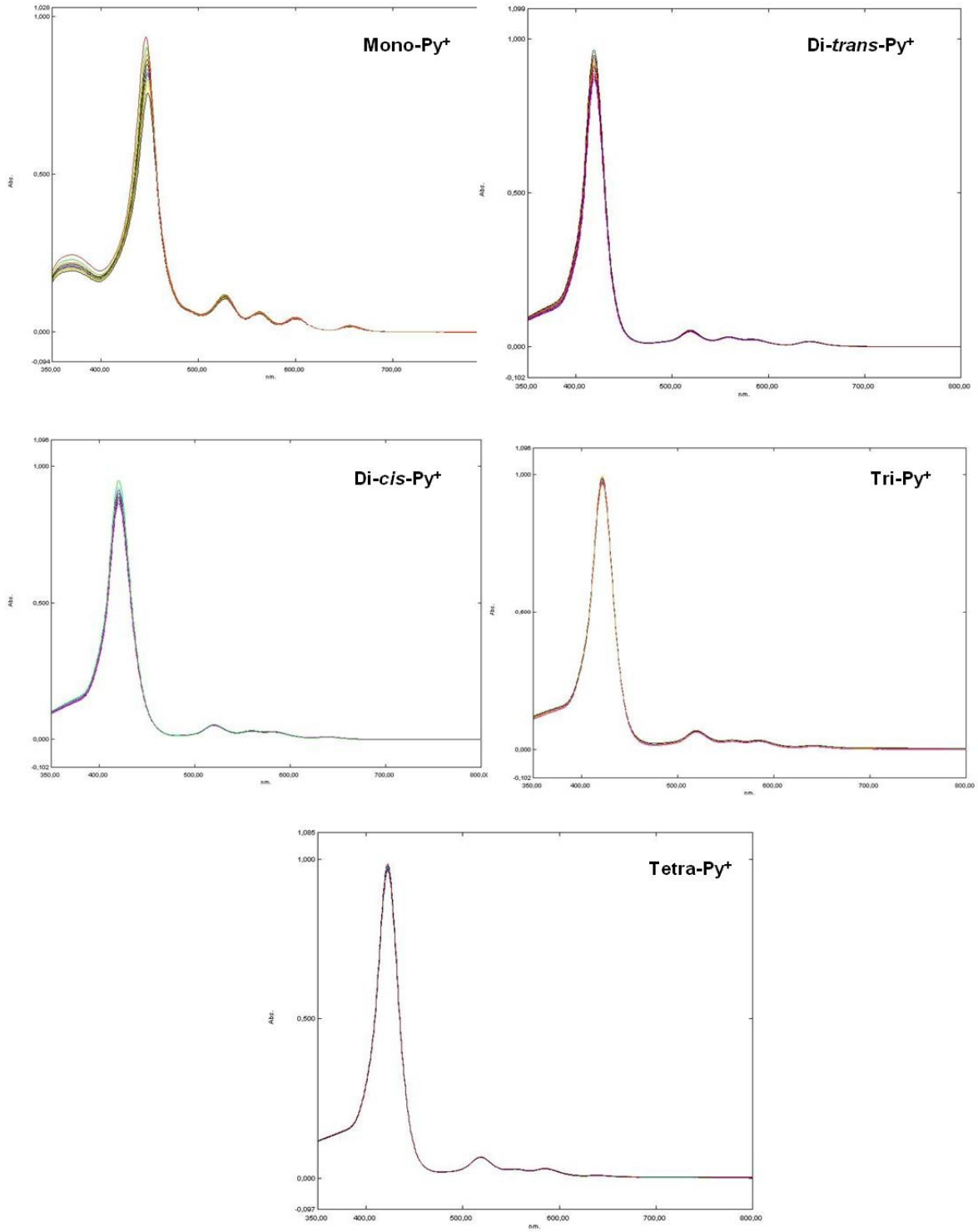
Tempo (min)	Mono-Py$^+$ (446 nm)		Di-*trans*-Py$^+$ (419 nm)		Di-*cis*-Py$^+$ (421nm)		Tri-Py$^+$ (422 nm)		Tetra-Py$^+$ (422 nm)	
0	0,946	0,980	0,978	0,996	0,977	0,997	0,993	0,934	0,840	0,966
1	0,939	0,969	0,957	0,979	0,949	0,972	0,985	0,920	0,832	0,961
2	0,929	0,960	0,945	0,968	0,933	0,953	0,978	0,912	0,829	0,957
3	0,920	0,951	0,937	0,959	0,922	0,941	0,977	0,907	0,826	0,955
4	0,909	0,942	0,927	0,951	0,912	0,930	0,969	0,903	0,825	0,953
6	0,894	0,927	0,914	0,939	0,894	0,914	0,963	0,897	0,823	0,950
8	0,880	0,915	0,901	0,928	0,880	0,899	0,957	0,892	0,821	0,949
10	0,867	0,903	0,891	0,917	0,864	0,882	0,952	0,887	0,819	0,946
15	0,849	0,880	0,865	0,890	0,836	0,859	0,942	0,877	0,816	0,941
20	0,826	0,859	0,842	0,867	0,810	0,837	0,933	0,868	0,814	0,937

Tempo (min)	Mono-Py$^+$ (446 nm)		Di-*trans*-Py$^+$ (419 nm)		Di-*cis*-Py$^+$ (421nm)		Tri-Py$^+$ (422 nm)		Tetra-Py$^+$ (422 nm)	
0	0,967	0,896	0,965	0,988	0,947	0,969	0,996	0,984	0,986	0,980
1	0,954	0,887	0,948	0,964	0,921	0,938	0,990	0,970	0,980	0,975
2	0,939	0,869	0,940	0,952	0,912	0,930	0,985	0,968	0,977	0,972
3	0,926	0,856	0,929	0,945	0,902	0,925	0,985	0,966	0,975	0,969
4	0,910	0,844	0,923	0,937	0,897	0,920	0,980	0,963	0,974	0,967
6	0,894	0,827	0,914	0,931	0,892	0,920	0,975	0,963	0,972	0,965
8	0,974	0,812	0,908	0,926	0,886	0,915	0,973	0,961	0,970	0,962
10	0,859	0,801	0,897	0,920	0,882	0,911	0,971	0,960	0,969	0,961
15	0,823	0,775	0,886	0,915	0,876	0,909	0,969	0,962	0,967	0,959
20	0,801	0,756	0,879	0,909	0,872	0,896	0,968	0,960	0,966	0,957

ANEXO 5 – VALORES EM DUPLICATA RELATIVOS À ABSORBÂNCIA DA BANDA SORET DAS PORFIRINAS NA PRESENÇA (ACIMA) E NA AUSÊNCIA (ABAIXO) DE IRRADIAÇÃO
FONTE: O autor (2012)
NOTA: Entre parênteses está indicada a localização exata da banda Soret para cada derivado.



ANEXO 6 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS COM O PROGRAMA UV PROBE 2.3 APÓS IRRADIAÇÃO DOS DERIVADOS A 100 mW/cm²
FONTE: O autor (2012)



ANEXO 7 – ESPECTROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS COM O PROGRAMA UV PROBE 2.3 NA AUSÊNCIA DE IRRADIAÇÃO
FONTE: O autor (2012)

Tempo	DFiBF		Mono-Py$^+$		Di-*trans*-Py$^+$		Di-*cis*-Py$^+$		Tri-Py$^+$		Tetra-Py$^+$	
0	1,092	1,125	1,277	1,218	1,179	1,157	1,133	1,072	1,212	1,19	1,262	1,147
1	1,087	1,118	1,212	1,153	1,138	1,115	1,094	1,036	1,157	1,134	1,200	1,094
2	1,084	1,112	1,148	1,093	1,100	1,075	1,056	1,000	1,107	1,086	1,152	1,046
3	1,081	1,107	1,084	1,034	1,062	1,037	1,017	0,965	1,058	1,040	1,111	1,004
4	1,076	1,100	1,026	0,977	1,024	0,998	0,982	0,930	1,010	0,994	1,078	0,964
5	1,072	1,095	0,967	0,921	0,986	0,961	0,945	0,896	0,966	0,949	1,038	0,925
6	1,069	1,089	0,906	0,865	0,949	0,923	0,909	0,862	0,919	0,903	1,005	0,886
7	1,065	1,083	0,848	0,813	0,911	0,886	0,871	0,828	0,875	0,859	0,970	0,848
8	1,061	1,078	0,792	0,761	0,874	0,849	0,830	0,795	0,831	0,816	0,938	0,814
9	1,057	1,073	0,740	0,710	0,839	0,812	0,794	0,762	0,788	0,774	0,906	0,778
10	1,053	1,067	0,688	0,661	0,802	0,775	0,757	0,728	0,746	0,733	0,876	0,744
11	1,049	1,062	0,638	0,614	0,766	0,738	0,722	0,695	0,704	0,691	0,846	0,709
12	1,045	1,057	0,592	0,571	0,73	0,702	0,688	0,662	0,663	0,651	0,816	0,677
13	1,041	1,052	0,549	0,529	0,691	0,667	0,651	0,63	0,623	0,611	0,785	0,644
14	1,037	1,047	0,508	0,489	0,657	0,632	0,616	0,599	0,585	0,573	0,755	0,609
15	1,034	1,042	0,468	0,452	0,623	0,598	0,582	0,568	0,547	0,535	0,725	0,579
20	1,017	1,016	0,290	0,275	0,463	0,426	0,436	0,433	0,359	0,371	0,574	0,444

ANEXO 8 – VALORES DE ABSORBÂNCIA DO DFIBF E PORFIRINAS OBTIDOS NO ENSAIO DA PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE.
FONTE: O autor (2012)

Constituinte	g/L de água	Constituinte	g/L de água
L- arginina (base livre)	0,200	Biotina	0,0002
L - aspargina (anidra)	0,050	D pantotênico	0,00025
ácido L-aspártico	0,020	Cloreto de colina	0,003
L-cistina • 2HCl	0,0652	Ácido fólico	0,001
ácido L-glutâmico	0,020	Mio-inositol	0,035
L-glutamina	0,300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	PABA	0,001
L-histidina (base livre)	0,015	Piridoxina HCl	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B12	0,000005
L-lisina • HCl	0,040	Nitrato de cálcio • H2O	0,100
L-metionina	0,015	Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio (anidro)	0,04884
L-prolina	0,020	Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030	Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	0,800
L-treonina	0,020	D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005	Glutationa reduzida	0,001
L-tirosina • 2Na	0,02883	Vermelho de fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		

ANEXO 9 – COMPOSIÇÃO DO MEIO RPMI-1640
FONTE: CLSI (2002)