

SÍNTESE E INTERNALIZAÇÃO DE FOTOSSENSIBILIZADORES MCHC-CHLORIN SOBRE *Trichophyton Rubrum* – UM ESTUDO PRELIMINAR – ENGENHARIA BIOMÉDICA

Mariane Weked Monteiro Lopes¹; Hajar de Cássia Ghazzaoui Veiga²; Prof. Dr. Adjaci Uchoa Fernandes³ (orientador)

¹ Mestranda em Engenharia Biomédica; Universidade Anhembi Morumbi; Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITE), São José dos Campos, SP, Brasil; mariane.wml@gmail.com; ² Mestranda em Engenharia Biomédica; Universidade Anhembi Morumbi; Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITE), São José dos Campos, SP, Brasil; veigahajardecassia@yahoo.com.br; ³ Doutor em química; Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITE), São José dos Campos, SP, Brasil; adjaci@hotmail.com



Introdução

Verifica-se dificuldade generalizada em tratar onicomicoses. Os fungos são difíceis de erradicar, a queratina densa da estrutura da unha, assim como a pouca vascularização local, dificulta a penetração dos medicamentos por via tópica ou sistêmica. Os métodos de tratamento convencionais, além de falhas terapêuticas, ocasionam efeitos colaterais indesejáveis na maioria dos pacientes e o tempo prolongado de uso, reflete na baixa adesão do tratamento e na resistência do fungo ao fármaco. Neste sentido, a Terapia Fotodinâmica (TFD), é uma alternativa promissora por sanar estas problemáticas. No entanto, a técnica é dependente do potencial de fotossensibilização. O arranjo das clorinas sintetizadas evita o empilhamento π nas interações entre macro ciclos, indicando que é um fotossensibilizador (Fs.) não agregador com alto rendimento quântico de oxigênio singlete e fluorescência. Os resultados preliminares demonstram que este tipo de estratégia pode fornecer liderança para uma nova geração de fotossensibilizadores clorínicos não agregativos (MCHC-Chlorin) para TFD.

Objetivos

O objetivo do presente projeto é avaliar a eficiência da terapia fotodinâmica em inativação de microrganismos causadores de onicomicose, otimizar e viabilizar a técnica com esta nova classe de Fs., assim como padronizar protocolos clínicos, indicando a TFD como nova modalidade terapêutica para o tratamento de onicomicose, além de sugerir novas ferramentas para auxiliar no diagnóstico da doença.

Metodologia

1- Síntese de 1-fenil-1H-pirrol-2,5-diona (fenilmaleimida)

A fenilmaleimida foi obtida por reação de anilina com anidrido maleico, em éter etílico para a formação do ácido âmico correspondente. Em uma segunda etapa o ácido âmico foi aquecido a 70°C por um período de 6 horas, para a obtenção da fenilmaleimida, a qual foi purificada por cromatografia em coluna, usando sílica gel como fase estacionária e diclorometano com 1% de metanol como fase móvel.

2 - Síntese de MCHC-Chlorin

A MCHC-Chlorina foi sintetizada por reação de ciclo adição entre fenilmaleimida com protoporfirina IX em tolueno.

3 - Linhagem do fungo e meios de cultura.

Para determinação da atividade antifúngica dos fotossensibilizadores será empregada a cepa da espécie *Trichophyton rubrum* ATCC (American Type Culture Collection).

O cultivo será realizado em meios Agar Sabouraud-Dextrose (ASD) e meio líquido Triptecaseína de Soja (TSB). A cepa de *Trichophyton rubrum* será cultivada em meio ASD, incubado a 28°C por sete dias, para o crescimento das colônias. Deste cultivo será retirado o micélio e cultivado em placas em meio líquido TSB.

4 - Ensaios in vitro: Após a separação e cultivo da cepa de *Trichophyton rubrum* serão realizados ensaios in vitro.

5 - Fonte de irradiação: Será construída uma placa de irradiação adequada para cada placa de cultivo que emitam laser vermelho 666 nm na região desejada.

Resultados

A reação levou a formação de dois isômeros A e B, que são formados nas mesmas proporções 1:1. A figura 1 apresenta a rota sintética de forma esquemática

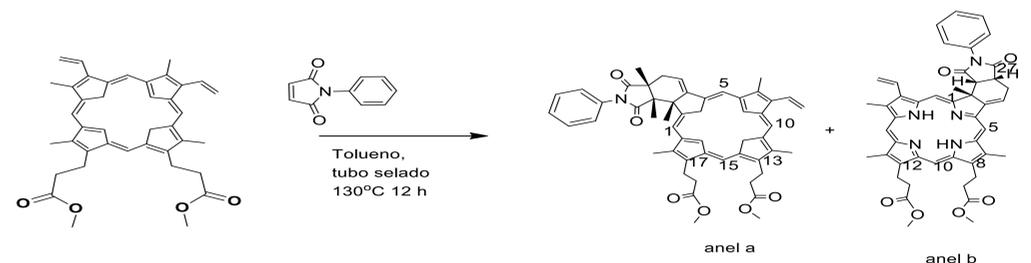


Figura 1 -Sínteses de MCHC-Chlorin

Ambos isômeros foram caracterizados por espectroscopia (RMN) de ¹H e ¹³C e espectrometria de massa com alta resolução. Observou-se fotofísica maximizada, com um rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) = 0,71, e um rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) = 0,16, superiores aos valores de referência, assim como o pico de absorção em 666 nm, idealmente onde a ação é necessária no tecido biológico, conforme demonstram os gráficos 1 e 2.

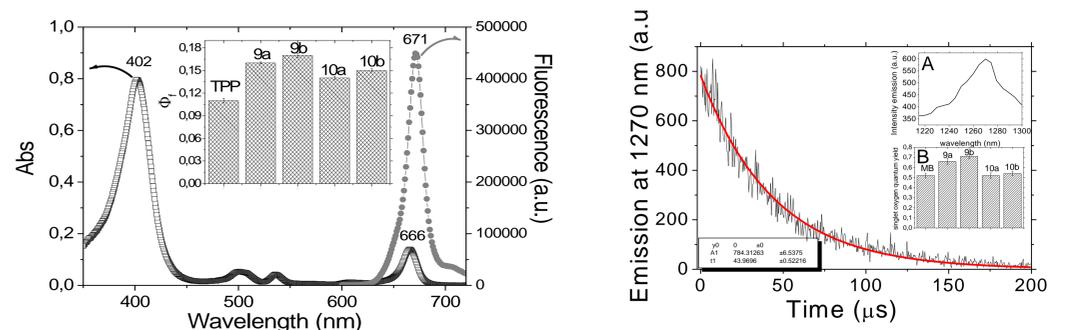


Gráfico 1: pico de absorção e rendimento quântico de fluorescência

Gráfico 2: rendimento quântico de oxigênio singlete

A incorporação da MCHC-Chlorin em *T. rubrum* foi observada por microscopia de fluorescência.. A Figura 2 mostra a fluorescência por emissão de fluoróforos endógenos e MCHC-Chlorina incorporados em hifas de *T. rubrum*.

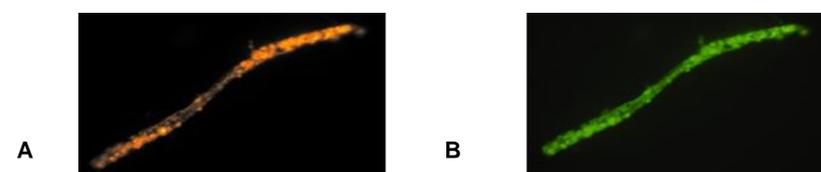


Figura 2: A-fluorescência através da incorporação do fotossensibilizador MCHC-Chlorina, excitado a 400 nm, emissão a 670 nm. B - fluorescência do fungo excitado em 340 nm e emissão em 450 nm. Imagens com uma objetiva de 100x.

Conclusões

A obtenção da MCHC-Chlorina, nova classe de Fs.clorínicos, abre uma nova janela para o desenvolvimento da TFD e foto diagnóstico. A ausência de auto agregação, apresenta vários ganhos, tais como, melhor solubilidade por maximização da interação solvente/soluto, fotofísica maximizada, com excelente Φ_{Δ} e Φ_f , e excelente permeabilidade nas hifas de *Trichophyton rubrum* o qual foi comprovado por microscopia de fluorescência.

Bibliografia

- Alberdi, E., & Gómez, C. (2018). Efficiency of methylene blue mediated photodynamic therapy versus intense pulsed light in the treatment of onychomycosis in the toenails. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. doi:10.1111/phpp.12420
- Irwin A.P. Linares, Leticia P. Martinelli, Milene N.O. Moritz, Heloisa S. Selistre de Araujo, Kleber T. de Oliveira, Janice Rodrigues Perussi.(2022). Cytotoxicity of structurally-modified chlorins aimed for photodynamic therapy applications, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Volume 425, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2021.113647>
- Ruiz B, R, L; Chiacchio N. (2015). Manual de conduta nas onicomicoses. Diagnóstico e tratamento. Sociedade Brasileira de Dermatologia | Departamento de Cabelos e Unhas.
- Uchoa, A. F., de Oliveira, K. T., Baptista, M. S., Bortoluzzi, A.J., Iamamoto, Y., & Serra, O. A. (2011). Chlorin Photosensitizers Sterically Designed To Prevent Self-Aggregation. *The Journal of Organic Chemistry*, 76(21), 8824–8832. doi:10.1021/jo201568

FOMENTO

Os autores agradecem ao Centro de Pesquisa em Processos Redox em Biomedicina. REDOXOMA – CEPID-FAPESP (Processo 2013/07937-8) e ao instituto anima, pelo apoio financeiro.