



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

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

RESUMO:

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 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.

INTRODUÇÃO:

Onicomicose é uma infecção fúngica que atinge a lâmina ungueal, causada por dermatófitos, sendo o *Trichophyton rubrum* identificado como um dos patógenos mais frequentes.

Por sua grande incidência e prevalência, é classificada como um problema de saúde pública no Brasil. É uma doença multifatorial, fato muitas vezes que passa despercebido e merece atenção em várias frentes sociais e de saúde. Podemos citar como fatores contribuintes para o desenvolvimento da patologia as características do nosso clima, dados demográficos e sociais. Outra problemática, são os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, Diabetes, doenças arteriais periféricas e a população idosa, que são grupos mais propensos para o desenvolvimento da patologia e principalmente, apresentar formas severas da doença. A

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

onicomicose é causadora de consideráveis efeitos físicos e psicológicos ao paciente, resultando em diversas implicações e deficiências.

Seu tratamento é um desafio nas práticas clínicas devido as particularidades da patologia e da região acometida. Os tratamentos convencionais consistem no uso de antifúngicos tópicos ou sistêmicos, dependendo da proliferação. O tratamento sistêmico pode resultar em uma série de efeitos adversos, interações medicamentosas e maior propensão a desencadear doenças hepáticas graves devido ao extenso período de tratamento. Além dos efeitos adversos, o longo tempo requerido e alto custo, contribuem para a baixa adesão do paciente e as falhas terapêuticas são muito comuns devido à resistência do fungo frente a droga utilizada. Todas estas problemáticas demonstram que os tratamentos convencionais estão cada vez mais fardados ao insucesso, tornando-se necessário novas modalidades terapêuticas seguras e eficazes, diminuindo as desvantagens e grande taxa de reincidência da doença, observada com os antifúngicos comumente utilizados.

Por sua vez, a terapia fotodinâmica (TFD), emerge como um recurso promissor para o tratamento e diagnóstico de diversas patologias. A TFD ocorre na presença de 3 elementos básicos: droga fotossensibilizadora; fonte de luz e o oxigênio molecular. O tecido infectado é pré tratado com o fotossensibilizador (Fs) e posterior irradiado localmente com luz de comprimento de onda adequado. A interação destes fatores, leva o Fs ao estado excitado tripleto, interagindo com as células do tecido doente, que, na presença do oxigênio celular circulante, produz espécies reativas de oxigênio (ROS). O efeito fotodinâmico está relacionado a características como: a biodistribuição dos fotossensibilizadores, interações com biomoléculas e organelas específicas e com as propriedades fotofísicas dos mesmos. No entanto, este tratamento está limitado por fatores de agregação. Compostos que apresentam índice elevado de agregação, possuem fotofísica desfavorável, com baixos rendimentos quânticos de tripleto e oxigênio singleto. Os fotossensibilizadores convencionais apresentam anéis aromáticos com ampla nuvem π e extensa planalidade, sendo todos eles induzidos a auto agregação. A MCHC-Chlorin é um novo composto, formado por dois macrociclos ortogonais unidos por um carbono sp^3 . Tal conformação, confere impedimento estérico e consequentemente o impedimento do estado agregado. O MCHC-Chlorin apresenta fotofísica maximizada com elevado rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) 0,78 e rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) de 0,16. Estes resultados habilitam MCHC-Chlorin como

1 - Mestranda em Engenharia Biomédica; Universidade Anhembí Morumbi; Centro de Inovação, Tecnologia e Educação (CITE), São José dos Campos, SP, Brasil; mariane.wml@gmail.com;

2 - Mestranda em Engenharia Biomédica; Universidade Anhembí 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

excelente foto fármaco para tratamentos por TFD e diagnóstico como o primeiro fotossensibilizador isento de auto agregação, podendo viabilizar e oferecer um tratamento mais eficaz para onicomicoses.

PALAVRAS-CHAVE:

Terapia Fotodinâmica, onicomicose, fotossensibilizadores não agregativos.

MÉTODO:

Neste trabalho foi sintetizado e caracterizado a MCHC-Chlorin, com o objetivo de determinar sua atividade fotodinâmica em *Trichophyton rubrum*.

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 cicloadição 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 *T. 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 *T. rubrum*;

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

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

A fenilmaleimida obtida com rendimento de 82%. E sua estrutura foi perfeitamente caracterizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massa com alta resolução.

2- Síntese de MCHC-Chlorin

A MCHC-Clorina foi sintetizada por reação de ciclo adição de Diels-Alder entre fenilmaleimida com protoporfirina IX em tolueno com rendimento global de 56%. Foram controladas a temperaturas reduzidas, fornecendo exclusivamente o produto de cicloadição. Obteve-se a formação de dois isômeros A e B, formados nas mesmas proporções 1:1. A figura 1 apresenta a rota sintética esquemática.

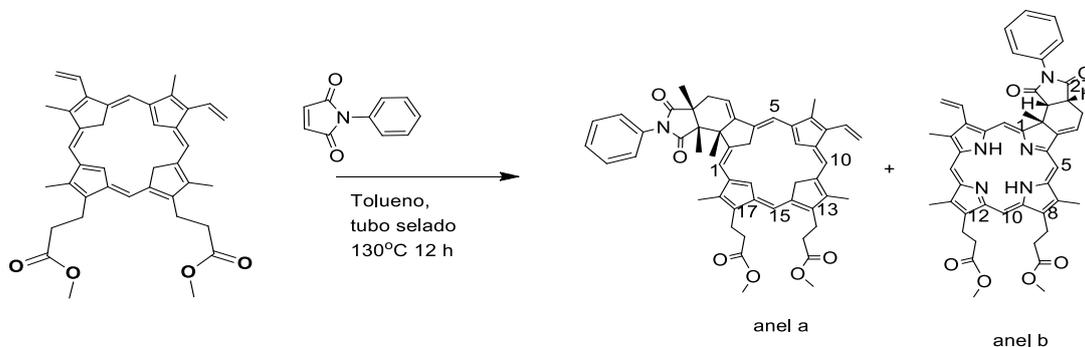


Figura 1: síntese de MCHC-Chlorin

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

Ambos isômeros foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massa com alta resolução. Observou-se fotofísica maximizada, com um rendimento quântico de oxigênio singleto ($\Phi\Delta$) = 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.

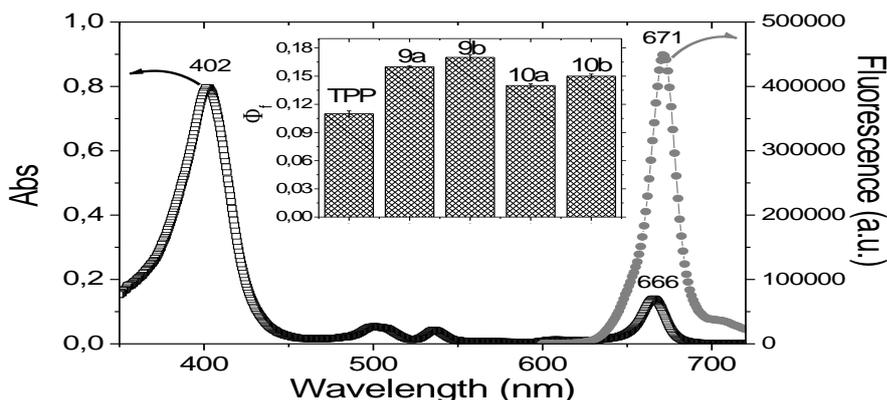


Gráfico 1: pico de absorção e rendimento quântico de fluorescência

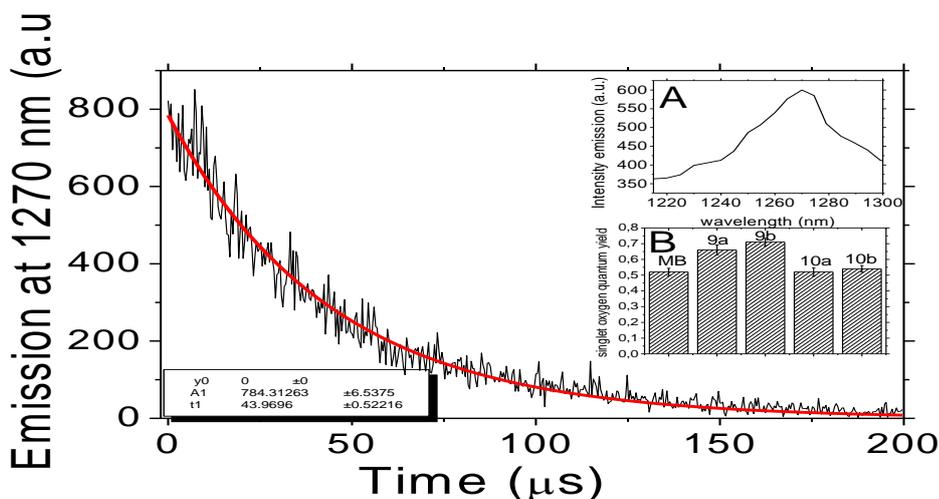


Gráfico 2: rendimento quântico de oxigênio singleto

A incorporação da MCHC-Chlorin em *T. rubrum* foi observada por microscopia de fluorescência. Em vermelho (≈ 670 nm), refere-se- à emissão de Clorina, observada em hifas e conídios, sendo perfeitamente diferenciada da fluorescência natural da espécie, que emite 450

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

nm quando irradiada no ultravioleta. A Figura 2 mostra a fluorescência por emissão de fluoróforos endógenos e MCHC-Clorina incorporados em hifas de *T. rubrum*.

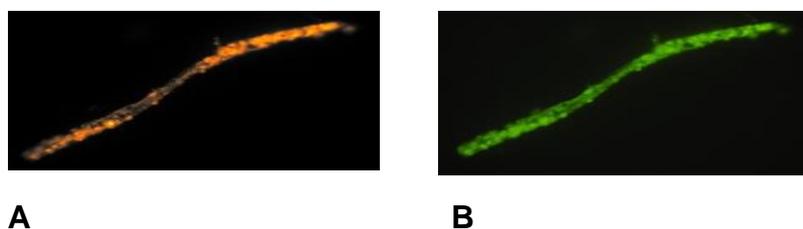


Figura 2: A-fluorescência através da incorporação do fotossensibilizador MCHC-Clorina, excitado a 400 nm, emissão a 670 nm. B - fluorescência do fungo excitado em 340 nm e emissão em 450 nm. Imagens com uma objetiva de 100x.

A fluorescência em 670 nm comprova a incorporação e internalização de MCHC-Chlorin em *T. rubrum*, viabilizando a terapia com este novo composto. Processos semelhantes já foram obtidos com outros fotossensibilizadores, porém, este demonstrou possuir fotofísica maximizada.

CONCLUSÕES:

A obtenção da MCHC-Clorina, nova classe de fotossensibilizadores clorínicos isentos de auto agregação, 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.

REFERÊNCIAS:

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

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



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., Yamamoto, 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 Ânima, pelo apoio financeiro.

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