UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MA HUI LING

**Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da Hipericina e da
Curcumina em células tumorais**

São Carlos
2016

MA HUI LING

**Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da Hipericina e da
Curcumina em células tumorais**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

M111e Ma, Hui Ling
 Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da
Hipericina e da Curcumina em células tumorais / Hui
Ling Ma; orientadora Janice Rodrigues Perussi. São
Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Bioengenharia e Área de Concentração
em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2016.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Fotossensibilizadores.
3. Hipericina. 4. Curcumina. I. Título.

Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

MA HUI LING

Título: "Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da hipericina e da curcumina em células tumorais"

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 15/02/2017

Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi (Orientadora)	Instituto de Química de São Carlos / USP
Assinatura:	Não votante

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura:	Resultado: APROVADA

Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira	Universidade Federal de São Carlos
Assinatura:	Resultado: APROVADA

Prof. Dr. Anderson Orzari Ribeiro (participação por videoconferência)	Universidade Federal do ABC
Assinatura:	Resultado: aprovada

Homologado em: ____/____/____

Dedico este trabalho aos meus pais pelo total apoio e constantes ensinamentos e orientações na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela criação do Universo e por colocar sempre a luz no meu caminho.

Meus imensos agradecimentos à Prof^a. Dra. Janice Rodrigues Perussi por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pela dedicação, orientação e paciência.

À minha família, meus pais e irmãos por todo apoio, incentivo e compreensão.

À Claudia Bernal, pela amizade, carinho e principalmente pela disposição e paciência a ensinar os experimentos.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório Fotossensibilizadores, Alex, Ana Cecília, Joyce, Larissa, Lucas e Thayz pela amizade e convivência.

Às colegas da Bioengenharia Crisiane, Débora, Jaqueline e Livia, pela amizade e convivência agradável na jornada das aulas.

Aos amigos do IQSC, Ana Carolina Urbaczek, Jonatan Catai, Livia Flório e Paulo Leão, pela amizade, compartilhamento dos seus conhecimentos e metodologias e boas inspirações.

À secretaria da Bioengenharia-USP, Marcia, pela paciência e disposição de ajudar nas papeladas.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela bolsa de Mestrado concedida.

Ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CePOF – Fapesp) pelo apoio financeiro da pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

Meus sinceros agradecimentos.

“Estudar sem pensar, isso leva a incertezas.
Pensar sem estudar, isso leva a riscos. ”

Os Analectos - Confúcio

RESUMO

MA, HUI LING. **Estudo comparativo da eficiência fotodinâmica da Hipericina e da Curcumina em células tumorais**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O câncer é uma doença que causa grande número de mortes a cada ano e os tratamentos convencionais normalmente ocasionam efeitos colaterais indesejados além do que nem sempre são eficazes. A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade alternativa de tratamento, que se baseia na combinação de um fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio, e tem mostrado resultados promissores em vários tipos de câncer. No entanto, existem alguns desafios para o desenvolvimento de fotossensibilizadores que cumprem os requisitos para uso clínico. Os compostos, hipericina (HY) e curcumina (CUR), estão presentes em plantas medicinais, possuem altos rendimentos quânticos e podem ser usados como FS em TFD. O objetivo deste trabalho foi comparar a eficiência fotodinâmica da HY e CUR através de suas propriedades físico-químicas e biológicas, tais como coeficiente de absorvidade molar (ϵ), coeficiente de partição (Log P), fotodegradação, atividade fotodinâmica de geração de oxigênio singlete e a resposta biológica usando ensaios citotóxicos e microscopia de fluorescência para avaliar o tipo de morte celular. A HY apresenta propriedade anfifílica, enquanto a CUR, hidrofóbica. A HY é mais fotoestável, enquanto a CUR fotodegrada facilmente sob irradiação em 455 nm levando à formação de fotoprodutos que possuem menor citotoxicidade que a CUR íntegra, o que sugere que a eficiência da TFD diminui conforme este corante é irradiado. Além disso, a alta eficiência de geração de oxigênio singlete de HY corrobora com a sua fototoxicidade mais elevada em comparação com a CUR. A concentração inibitória média (IC_{50}) da HY em células de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2) é 256 vezes menor para CUR sob a mesma dose de luz. A investigação do tipo de morte celular foi realizada por microscopia de fluorescência após TFD utilizando os FSs em concentração equivalente a duas vezes o valor de IC_{50} . HY-TFD promoveu cerca de 1,5 vezes mais apoptose nas células HEp-2 do que a CUR. Além disso, a acumulação intracelular dos FSs analisada por Microscopia Confocal de fluorescência mostrou que a CUR apresenta uma velocidade de acumulação menor que a HY. Em conclusão, os resultados obtidos sugerem que a HY é um FS mais eficiente que a CUR para TFD, porém como a CUR e a HY apresentam baixa toxicidade na ausência de luz, são compostos seguros para serem utilizados clinicamente.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica. Fotossensibilizadores. Hipericina. Curcumina.

ABSTRACT

MA, HUI LING. **A comparative study on the photodynamic efficiency of Curcumin and Hypericin in tumor cells**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Cancer is a disease that causes several deaths each year and the treatment modalities are not quite selective and usually bring about intensive side effect besides not very effective sometimes. Photodynamic therapy (PDT) is an alternative treatment, which is based on the combination of a photosensitive molecule, light activation and oxygen. Many studies have shown promising results with PDT in diverse types of cancer. However, there are some challenges for the development of photosensitizers to comply the requisites for clinical use. The compounds hypericin (HY) and curcumin (CUR), are present in medicinal plants, have high fluorescence quantum yields and can be used as PS in PDT. In this study, we compare HY and CUR through the study of their physic-chemical and biological properties, as well as photo degradation, determination of the partition coefficient (Log P) and the molar absorptivity coefficient (ϵ), the photodynamic activity as an indirect estimation of singlet oxygen generation potential and the biological response using cytotoxicity assays as well as fluorescence microscopy. The results suggested that HY presents amphiphilic property while CUR is hydrophobic. HY is more photostable than CUR, which is easily photodegraded at 455 nm leading to the formation of photoproducts. The cytotoxicity of these photoproducts was investigated being lower than that of CUR, which suggests that the efficiency of CUR-PDT decreases while this dye is irradiated. Furthermore, the elevated oxygen singlet generation of HY corroborates with its higher phototoxicity compared to CUR. The median inhibitory concentration (IC_{50}) of HY in human epidermoid cancer cells (HEp-2) is 256 times lower than the IC_{50} for CUR at equal light irradiance. The investigation on the type of cell death was carried out by fluorescence microscopy after PDT using the photosensitizers at concentration equivalent to $2 \times IC_{50}$ values. HY-PDT induced around more 1.5 times apoptosis cell death than CUR-PDT. Besides, the intracellular accumulation of PS analyzed by fluorescence Confocal Microscopy has demonstrated that the accumulation of CUR is slower than HY. In conclusion, our findings suggest that HY is a more efficient PS than CUR for PDT, however, as CUR and HY present low toxicity in the absence of light, they are safe compounds to be clinically used.

Keywords: Photodynamic therapy. Photosensitizers. Hypericin. Curcumin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática dos mecanismos envolvidos em TFD com diagrama Jablonski. Adaptado ¹¹	19
Figura 2. Procedimento básico da aplicação clínica da TFD. 1) O FS é injetado no paciente. 2) O FS se acumula na região do tumor. 3) O FS é ativado pela aplicação de luz. 4) O tumor é seletivamente destruído. Adaptado ¹⁰	20
Figura 3. As contribuições das três áreas de ciência para TFD: física, química e farmacologia. Fonte: Adaptado ⁹	23
Figura 4. Janela fototerapêutica: as radiações eletromagnéticas entre 600-850nm é a região espectral que apresenta maior poder de penetração no tecido humano, devido à baixa competição de absorção com outras moléculas presentes em meio fisiológico. Fonte: Adaptado ⁹	25
Figura 5. Estrutura química do ácido úrico.	27
Figura 6. Curva de inibição da viabilidade celular. As concentrações de FS são expressas em escala logarítmica em função da porcentagem de viabilidade celular. A curva possui formato típico sigmoide e o IC ₅₀ é definido pelo ponto de inflexão dessa curva. Fonte: Adaptado ⁴⁴	30
Figura 7. As alterações estruturais da morte celular pela necrose (esquerda) e apoptose (direita). Na apoptose, as alterações iniciais consistem de condensação e fragmentação da cromatina nuclear, seguidas de brotamento do citoplasma e fagocitose dos corpos apoptóticos eliminados. Já na necrose ocorre sinais de bolhas citoplasmáticas e de digestão e extravasamento de componentes celulares, Fonte: adaptado ⁵⁰	32
Figura 8. Fórmula estrutural química da hipericina	33
Figura 9. A degradação hidrolítica da CUR gera produto majoritário trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)- 2,4-dioxo-5-hexenal, e os produtos minoritários vanilina, ácido ferúlico e feruloil metano. Adaptado ⁸²	37
Figura 10. As lâmpadas de LED. A) amarelo ($\lambda = 590 \pm 10$ nm) com potência = 8,4 mW cm ⁻² ; B) azul ($\lambda = 455 \pm 10$ nm) com potência = 7,9 mW cm ⁻²	41
Figura 11. Porcentagem dos fotossensibilizadores remanescentes em solução de DMSO em função do tempo de irradiação com LED ($\lambda = 590$ nm para HY e 455 nm para CUR).	51

Figura 12. Ilustração dos grupos hidroxila bay e peri e os seus respectivos pKa. Fonte: Adaptado ¹⁰⁴ .	53
Figura 13. Espectro de absorção ótica antes e após irradiação de uma mistura de AU 10 µg mL ⁻¹ e FS 10 µg mL ⁻¹ em SDS 2%. A) Hipericina B) Curcumina.	54
Figura 14. Espectro de absorção ótica antes e após irradiação com LED de uma mistura de AU 10 µg mL ⁻¹ e FS 10 µg mL ⁻¹ em PBS. A) Hipericina B) Curcumina.	55
Figura 15. Citotoxicidade e fototoxicidade da Curcumina previamente degradada pela luz azul.	59
Figura 16. Imagens da microscopia Confocal de fluorescência mostram a acumulação intracelular dos FSs. A) Hipericina, B) Curcumina.	61
Figura 17. Microscopia de fluorescência das células HEP-2 após a marcação com BE/LA. As células vivas do controle estão com coloração verde. O escuro mostra as células vivas incubadas com os FSs, entretanto sem passar por irradiação. Após TFD, os apoptóticos aparecem com a coloração verde e alaranjado e as necróticas vermelhas.	62
Figura 18. Porcentagens de células apoptóticas e necróticas após a TFD.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomes comerciais dos FSs utilizados na TFD, indicação clínica e país de origem	21
Tabela 2. Intensidade das transições eletrônicas ²⁹	24
Tabela 3. Estudos in vitro da HY-TFD em células tumorais.....	34
Tabela 4. Estudos in vitro da CUR-TFD para em células tumorais.....	36
Tabela 5. Valores de coeficiente de absorvidade molar para os fotossensibilizadores em DMSO.....	50
Tabela 6. Coeficientes de partição obtidos para os fotossensibilizadores	52
Tabela 7. Coeficientes de Atividade Fotodinâmica dos FSs	54
Tabela 8. Valores de IC ₅₀ dos FSs: HY e CUR para a linhagem celular HEp-2 após 2h de incubação e irradiação por 20 min, $\lambda = 590$ nm ($I = 8,4$ mW cm ⁻²) e $\lambda = 455$ nm ($I = 7,9$ mW cm ⁻²), respectivamente.....	56
Tabela 9. Valores de IC ₅₀ dos FS: HY e CUR para a linhagem celular Vero após 2h de incubação e irradiação por 20 min, $\lambda = 590$ nm ($I = 8,4$ mW cm ⁻²) e $\lambda = 455$ nm ($I = 7,9$ mW cm ⁻²), respectivamente.....	57
Tabela 10. Comparação da HY com CUR: Absorvidade molar, fotodegradação, coeficiente de partição em octanol-água (LogP), eficiência fotodinâmica, concentração inibitória média (IC ₅₀) e tipo de morte celular.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU	ácido úrico
AF	atividade Fotodinâmica
BE	brometo de etídio
ϵ	coeficiente de absortividade molar
CUR	curcumina
DMSO	dimetilsulfóxido
EROs	espécies reativas de oxigênios (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
FS	fotossensibilizador
HEp-2	linhagem celular epitelial tumoral de laringe humana
HY	hipericina
IC ₅₀	concentração inibitória média
LA	laranja de acridina
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LED	Light emitter diode (diodos emissores de luz)
Log <i>P</i>	logaritmo do coeficiente de partição
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina
¹ O ₂	oxigênio singlete
³ O ₂	oxigênio triplete
PBS	phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
SDS	dodecil sulfato de sódio
TFD	Terapia Fotodinâmica
VERO	linhagem celular epitelial não tumoral de rim de macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)

Sumário

1. Introdução	17
1.1 Câncer	17
1.2 Terapia fotodinâmica	18
1.3 Fotossensibilizadores ideais	21
1.4 Avaliação da eficiência dos fotossensibilizadores	22
1.4.1 Irradiação	23
1.4.2 Coeficiente de absorvidade molar	24
1.4.3 Fotodegradação e fotoprodutos	25
1.4.4 Coeficiente de partição (P)	26
1.4.5 Fotoxidação do ácido úrico	27
1.4.6 Agregação do fotossensibilizador	28
1.4.7 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores	28
1.4.8 Cultura de células e ensaio citotóxico	29
1.4.9 Tipo de morte celular	31
1.5 Hipericina	32
1.6 Curcumina	34
2. Objetivo	39
3. Materiais e Métodos	41
3.1 Reagentes e sistema de irradiação	41
3.2 Determinação do coeficiente de absorvidade molar	41
3.3 Fotodegradação dos fotossensibilizadores	42
3.4 Determinação dos coeficientes de partição	42
3.5 Fotoxidação do ácido úrico	43
3.6 Influência de agregação na produção de oxigênio singlete	43
3.7 Cultura celular	44
3.8 Ensaios citotóxicos	44
3.9 Citotoxicidade da curcumina degradada	45
3.10 Detecção do tipo de morte celular por microscopia de fluorescência	46
3.11 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores	46
3.12 Análise Estatística	47
4. Resultados e discussões	49

4.1	Coeficiente de absorvidade molar.....	49
4.2	Fotodegradação dos fotossensibilizadores.....	50
4.3	Determinação dos coeficientes de partição	52
4.4	Fotoxidação do ácido úrico	53
4.5	Influência de agregação na formação de oxigênio singlete	54
4.6	Ensaio citotóxico	56
4.7	Citotoxicidade da curcumina degradada.....	58
4.8	Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores.....	59
4.9	Deteção do tipo de morte celular por microscopia de fluorescência	61
4.10	Comparação da eficiência fotodinâmica da Hipericina e Curcumina	63
5.	Conclusões.....	65
6.	Referências.....	67

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é uma neoplasia causada pela proliferação celular descontrolada em consequência de alterações de genes e proteínas que regulam a multiplicação e a diferenciação das células, podendo ocorrer a perda da função total ou parcial do tecido original ¹. Segundo o documento World Cancer Report 2014 da International Agency for Research on Cancer (Iarc), da Organização Mundial da Saúde (OMS), é inquestionável que o câncer foi a principal causa de mortalidade com 8,2 milhões de mortes em 2012. A previsão do crescimento dos casos dessa doença para as duas próximas décadas é de 75%, ou seja, em torno de 25 milhões de doentes ².

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), as principais técnicas frequentemente empregadas no tratamento de câncer são a radioterapia, quimioterapia e cirurgia. A radioterapia utiliza um feixe de radiação ionizante para destruir células tumorais; a resposta do tecido à radiação depende de fatores como a sensibilidade do tumor ao tratamento, sua localização e o tempo de irradiação ³. A quimioterapia é uma técnica que utiliza substâncias químicas que interferem na síntese de enzimas celulares, afetando a função e a proliferação tanto das células normais quanto das cancerígenas ⁴. A cirurgia se baseia na remoção do tecido doente. Esses tratamentos são eficazes contra muitos tipos de tumores e, em muitos casos, proporcionam um considerável aumento no tempo de vida do paciente. Entretanto, apesar desse relativo sucesso, essas terapias apresentam efeitos adversos intensos. Dentre estes, destacam-se: mutilações do paciente, com prejuízos à sua autoestima (cirurgia); queda de cabelo, alterações gastrintestinais (náuseas, vômitos e diarreia) e cansaço físico intenso (quimioterapia e radioterapia) ⁵. Além disso, a perspectiva da cura não é garantida.

Outra técnica como a hipertermia por ablação gerada a partir de radiofrequência tem sido bastante utilizada por se tratar de técnica não invasiva ⁶. A hormonioterapia, imunoterapia e transplante de medula óssea no caso de leucemia são tratamentos que servem apenas para alguns tipos de cânceres ⁷. Mais recentemente, a Terapia Fotodinâmica tem sido empregada como uma alternativa de tratamento que visa a destruição localizada do tecido vivo anormal mediante sua

apoptose ou inviabilização, assim como também a desativação de vírus, destruição de bactérias e fungos ⁸.

1.2 Terapia fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma promissora modalidade de tratamento para diversas patologias de caráter oncológico, cardiovascular, dermatológico, oftálmico e microbiológico que tem mostrado excelentes resultados clínicos ⁹.

A TFD se baseia em três componentes: o fotossensibilizador (FS), a luz com comprimento de onda específico para ativar o FS e oxigênio que está presente nos tecidos ¹⁰. A Figura 1 mostra os principais mecanismos da TFD. O FS no estado fundamental ao absorver a luz visível é excitado para seu estado singlete podendo retornar ao estado fundamental emitindo fluorescência ou sofrer o processo de cruzamento inter-sistema decaindo para o estado triplete. O retorno do FS deste estado para o fundamental é pela emissão de fosforescência. Entretanto, a maioria dos FSs no estado triplete é capaz de transferir energia para o oxigênio resultando em dois tipos de mecanismos, o tipo I forma as espécies reativas de oxigênio (EROs) como os ânions de superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radical hidroxila, os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas provocando morte celular. O tipo II ocorre pela excitação do oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) que gera o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), este mecanismo é geralmente favorecido nas reações de fotoxidação ¹¹. O oxigênio singlete, quando gerado, pode reagir rapidamente com componentes celulares, como a membrana celular, ácido nucleico, peptídeos e moléculas envolvidas na manutenção estrutural da membrana, tais como fosfolipídeos esteróis e peptídeos, as reações fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular, provocando a morte do tecido tumoral via necrose ou apoptose ¹².

Figura 1. Ilustração esquemática dos mecanismos envolvidos em TFD com diagrama Jablonski.
Fonte: Adaptado ¹¹.

A geração de oxigênio singleto pelo mecanismo tipo II é mais relevante nos tratamentos TFD, sendo o agente citotóxico responsável pela desativação de células tumorais via morte celular programada, ou seja, apoptose causada devido à alta reatividade do oxigênio singleto e altas constantes de velocidade de reação com as moléculas biológicas presentes nos tecidos doentes ¹³.

A forma de aplicação da TFD pode ser tópica ou sistêmica ⁹ sendo que a Figura 2 ilustra o procedimento básico dessa aplicação. Primeiramente, o FS é administrado no corpo do paciente por um determinado tempo para que o composto acumule seletivamente na região do tumor, após a irradiação, o tumor é destruído ¹⁰. Dessa forma, a TFD é menos invasiva e apresenta menos efeitos colaterais comparando com os tratamentos convencionais de câncer, devido à baixa toxicidade intrínseca dos FSs na ausência de luz, sendo que alguns desses corantes são compostos terapêuticos já empregados na medicina para várias doenças como a hipericina e curcumina ¹². Além disso, a maioria dos FSs são moléculas relativamente lipofílicas que se difundem rapidamente nas células tumorais ¹⁴. Por essa razão, a TFD tem sido um tema bastante investigada para o tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive existem

FSs como Photofrin, Visudyne e um precursor de Protoporfirina IX, o ácido 5-aminolevulínico (ALA), que são aprovados para o uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA), que é um órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle de medicamentos e alimentos ¹⁵. Paralelamente outros FSs são aprovados em outros países.

Figura 2. Procedimento básico da aplicação clínica da TFD. 1) O FS é injetado no paciente. 2) O FS se acumula na região do tumor. 3) O FS é ativado pela aplicação de luz. 4) O tumor é seletivamente destruído.

Fonte: Adaptado ¹⁰.

Os FSs, em geral, acumulam nas células e nas membranas subcelulares dos tecidos e da vasculatura. Portanto, os principais mecanismos de ação da TDF, além da citotoxicidade, são os efeitos vasculares e respostas imunológicas ¹⁰. As células endoteliais do vaso sanguíneo podem ser destruídas pela TFD ¹⁶, uma vez que os arredores do tumor são altamente vascularizados, devido à grande necessidade dos nutrientes e oxigênio para sustentar o crescimento descontrolado das células ¹⁷, logo, essa destruição da vasculatura auxilia a eficácia anticâncer pela hipóxia e anti-proliferação do tumor, este mecanismo é conhecido como Terapia fotodinâmica antivascular, em inglês, *vascular-targeted photodynamic therapy* ^{10; 16}. Este mecanismo adicional da TFD pode aumentar a eficiência terapêutica nos tratamentos anticâncer, bem como ajudar no tratamento da doença relacionada à vascularização como a degeneração macular ¹⁸.

Originalmente, a TFD é vista como tratamento localizado, entretanto, os estudos recentes indicam que a TFD altera o microambiente do tumor e ativa a resposta imunológica ⁹. Em baixa dose de luz, a irradiação causa a morte celular principalmente por apoptose. Em altas doses de luz, as proteínas imunológicas e citocinas relacionadas à regulação do sistema imune do tumor podem ser ativadas

pela irradiação intensa e provocar rápida necrose. Essa descoberta leva à hipótese de que a TFD possa ser utilizada como a imunoterapia contra formação tumor e, recentemente, vários estudos estão investigando essa possibilidade com bons resultados ^{19; 20}.

Outra aplicação da TFD tem sido a inativação de microrganismos, estudos mostram a eficiência da hipericina e da curcumina na fotoinativação dos fungos *C. albicans* e *C. dubliniensis* que causam infecções de pele, unha e mucosas ^{21; 22}. Além disso, as doenças de pele como queratose actínica e psoríase, bem como a degeneração macular da retina podem ser tratadas com a TFD ^{23; 24; 25}.

1.3 Fotossensibilizadores

Um fotossensibilizador ideal com aplicação para tratamento em geral se define pela combinação de várias propriedades físico-químicas do composto, entretanto, poucos FSs existentes demonstraram total eficiência para aplicação da TFD. Sendo assim, as pesquisas recentes buscam o desenvolvimento de novos FSs e vários estudos focam na encapsulação de FS utilizando a nanotecnologia para melhorar sua liberação no organismo e sua eficiência fotodinâmica ¹⁵.

Basicamente, os pré-requisitos de um FS ideal para uso na TFD incluem a pureza química, seletividade pelas células tumorais, estabilidade química, máxima acumulação em curto tempo após a administração, baixa toxicidade no escuro, irradiação com comprimento de onda que favorece a penetração tecidual e eliminação rápida do organismo a fim de gerar mínima sensibilização à pele ^{15; 26}.

A tabela 1 lista os FSs comerciais utilizados na TFD anticâncer, podendo-se observar que os principais grupos de FSs clinicamente utilizados são porfirinas, clorinas e fitalocianinas. Contudo, há também os corantes sintéticos: azul metileno, azul toluidina e sal de fenotiazinas, são compostos de baixo custo, comumente utilizados na fotoinativação de microrganismos, devido à sua baixa eficiência fotodinâmica no tratamento anticâncer. Por último, os pigmentos descobertos na natureza que agem como FS, tais como hipericina, hipocrelina, riboflavina e curcumina ¹².

Tabela 1. Nomes comerciais dos FSs utilizados na TFD, indicação clínica e país de origem

Estrutura do FS	Substância	Nome comercial	Indicação	País de origem
Hematoporfirina	Derivados de hematoporfirina	Photogem	Pele, cervical, pulmão	Rússia
Hematoporfirina	Derivados de hematoporfirina	Photofrin	Bexiga, cervical, esôfago, pulmão	Estados Unidos
Hematoporfirina	Derivados de hematoporfirina	Photosan	Pâncreas, pele	Alemanha
Precursor Protoporfirina	Ácido 5-aminolevulínico / Metil-aminolevulinato	Levulan, Metvix	Pele, bexiga, cérebro, esôfago	Estados Unidos
Benzoporfirina	Derivados de benzoporfirina	Visudyne	Degeneração macular	Estados Unidos
Clorina	5,10,15,20-tetra(m-hidroxifenil)clorina	Foscan	Cabeça e pescoço, próstata, pâncreas	Irlanda
Ftalocianinas	Ftalocianina de alumínio sulfonada	Photosens	Pele, mama, Degeneração macular	Rússia

1.4 Avaliação da eficiência dos fotossensibilizadores

O sucesso da TFD em oncologia depende da contribuição das diversas áreas da ciência, principalmente física, química e farmacologia ⁹. A Figura 3 ilustra a interação das contribuições mais relevantes das três áreas. Destacam-se a física da luz, síntese química dos FS e mecanismo biológico da TFD. Portanto, através dessa união de conhecimentos, a eficiência dos FSs foi avaliada pelas propriedades físico-químicas e biológicas neste trabalho.

Figura 3. As contribuições das três áreas de ciência para TFD: física, química e farmacologia.
Fonte: Adaptado ⁹.

1.4.1 Irradiação

O procedimento de irradiação na TFD pode ser feito por três diferentes grupos de fontes de luz: lâmpadas de amplo espectro, lâmpadas de diodo e lasers ²⁷. A ação destes aparelhos depende fundamentalmente do espectro de emissão, da dose de irradiação (J cm^{-2}), da distribuição espacial da luz e da potência do aparelho (W cm^{-2}).

A irradiação do presente trabalho foi feita com os diodos emissores de luz, LEDs (do inglês, "*light emitting diodes*"), que são aparelhos compostos por semicondutores sólidos ligados entre si e que geram luz. Os LEDs fornecem uma fonte de luz confiável e de alta potência em faixas estreitas de bandas de luz (entre 20-50 nm) e podem ser distribuídas em painéis para promover a iluminação de uma superfície ampla e homogênea ²⁸. Esta característica é muito importante, pois uma distribuição irregular da luz pode deixar de tratar partes de um tumor superficial mais extenso. O uso dos LEDs na TFD proporciona diversas vantagens em relação aos outros tipos de fonte de luz como laser, tais como facilidade no manuseio, redução de custo, comprimento de onda específico e não aquecimento da superfície irradiada ²⁷.

1.4.2 Coeficiente de absortividade molar

O coeficiente de absortividade molar (ϵ) é a medida que estima a capacidade de uma espécie química para absorver luz num dado comprimento de onda. A determinação do ϵ é feita pela lei de Lambert – Beer (Equação 1), através dos parâmetros experimentais: absorbância, A ; o caminho ótico, b e a concentração, c , sendo que o coeficiente de absortividade molar se refere ao máximo de absorção de uma banda que aparece num espectro de absorção.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad \text{Equação (1)}$$

O valor do ϵ está relacionado às regras de seleção para transições eletrônicas como mostrado na Tabela 2 ²⁹. Em geral, uma transição eletrônica consiste em promover um elétron de um orbital de uma molécula no estado fundamental para um orbital desocupado mais energético por absorção de fóton. Assim, os compostos insaturados têm absorção na faixa do espectro com $\lambda > 220$ nm até o infravermelho próximo. Se não forem proibidas por regras de seleção de spin ou simetria, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ têm altos coeficientes de absortividade molar.

Tabela 2. Intensidade das transições eletrônicas ²⁹.

ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Transição
$10^{-5} - 1$	Transição spin proibida
$1 - 10^3$	Permitida por spin e orbitalmente proibida
$10^3 - 10^5$	Completamente permitida

Por outro lado, o comprimento de onda da absorção máxima do FS é um parâmetro importante para avaliar a aplicabilidade do composto no tecido biológico, uma vez que a absorção entre 600 e 800 nm, chamada “janela fototerapêutica”, onde não ocorre a competição de absorção com maioria dos componentes presentes no organismo humano como, por exemplo, a hemoglobina, proteínas e água (Figura 4) ²⁶. Isso torna a TFD mais eficiente por permitir que a luz penetre mais profundamente no tecido, facilitando a excitação das moléculas de FS.

Figura 4. Janela fototerapêutica: as radiações eletromagnéticas entre 600-850nm é a região espectral que apresenta maior poder de penetração no tecido humano, devido à baixa competição de absorção com outras moléculas presentes em meio fisiológico.

Fonte: Adaptado ⁹

1.4.3 Fotodegradação e fotoprodutos

O termo fotobranqueamento ou fotodegradação, conhecido como *photobleaching* em inglês, significa a destruição fotoquímica dos cromóforos de uma molécula, processo que resulta na perda da cor característica do composto no decorrer da irradiação. Em geral, os FSs utilizados em TFD sofrem degradação pela luz. Existem dois tipos de fotodegradação irreversível que levam a mudanças estruturais dos cromóforos ³⁰:

- Fotomodificação: após a irradiação no comprimento de onda específico de absorção da molécula, ocorre a diminuição da intensidade dos picos de absorção do espectro original e o surgimento de uma nova banda de absorção.
- Fotobranqueamento verdadeiro: a luz promove as mudanças radicais na estrutura química do FS resultando em fragmentos menores que não possuem mais absorção significativa na região visível, a solução dessa amostra torna-se incolor.

Desse modo, o estudo do fotobranqueamento para os fotossensibilizadores é essencial, uma vez que o processo da irradiação pode causar modificações das estruturas dos FSs e transformá-los em fotoprodutos que não irão mais absorver a luz no comprimento de onda de irradiação ou em compostos prejudiciais a organismo humano ³¹. Além disso, o rápido fotobranqueamento de um FS durante o tratamento da TFD pode reduzir a quantidade inicial de FS provocando uma diminuição na produção de EROs, por conseguinte, comprometer a geração das espécies do oxigênio reativas causando a perda da eficiência de destruição do tumor ¹³. Para solucionar tal problema, costuma-se administrar altas dosagens do FS a fim de compensar a sua perda por fotodegradação. Esse procedimento, no entanto, pode ocasionar aumento dos efeitos colaterais provocados pela alta concentração do FS, além de aumentar o custo do tratamento. Uma maneira de medir o fotobranqueamento de um FS é irradiá-lo com luz visível num meio saturado com $^3\text{O}_2$ e monitorar sua fluorescência ou absorbância ³². Caso ocorra fotobranqueamento, o mesmo será detectado através da queda na intensidade de fluorescência ou absorbância do FS.

1.4.4 Coeficiente de partição (P)

O coeficiente de partição (P) avalia a partição de um soluto na forma não-ionizada entre duas fases imiscíveis. Uma fase pode ser sangue ou água e a outra, uma biomembrana, um óleo ou um plástico. Alguns processos biológicos dependem do movimento de moléculas de uma fase para outra, por exemplo, partição do composto entre fase aquosa e biofases lipídicas ³³.

O principal mecanismo para obter o coeficiente de partição se baseia no equilíbrio do soluto entre duas fases imiscíveis: aquosa e oleosa, uma vez que um soluto é adicionado numa das fases, ao entrar em contato com a outra começará a se distribuir de tal forma que, quando o equilíbrio for atingido, não haverá mais transferência total do soluto. A partição ou a distribuição do composto investigado é determinada através da divisão da sua concentração na fase oleosa pela concentração na fase aquosa (Equação 2). Quanto maior o valor de P tanto maior a solubilidade do soluto em lipídios. Assim, P é uma medida das afinidades relativas do soluto em relação às fases aquosa e não-aquosa, ou lipídica ³³.

$$p = \frac{C_o}{C_w} \quad \text{Equação (2)}$$

O interesse em coeficientes de partição deriva do fato de que as medidas sejam relativamente simples e possam fornecer uma predição correta de atividade em um sistema complexo como meio fisiológico e, determinar a característica hidrofóbica do composto ³⁴.

1.4.5 Fotoxidação do ácido úrico

O ácido úrico (AU) com estrutura mostrada na Figura 5 é encontrado no corpo humano sendo produzido a partir da purina e é considerado um antioxidante natural agindo como supressor de ¹O₂. Este é solúvel em água e em meio fisiológico. Em meio aquoso o AU mostra um máximo na banda de absorção na região entre 285 a 295 nm.

Uma escala dosimétrica da produção de ¹O₂ através de método químico cujo termo conhecido como Atividade Fotodinâmica (AF) ³⁵. No qual, o ácido úrico foi utilizado junto com o laser como fonte de iluminação. A fotoxidação do ácido úrico (AU) ocorre através da reação de oxidação pelo oxigênio singlete produzido pelos FSs em solução após irradiação, dessa forma, o ácido úrico foi utilizado como dosímetro químico para calcular o coeficiente de atividade fotodinâmica (AF) dos FSs ³⁵.

Figura 5. Estrutura química do ácido úrico.

1.4.6 Agregação do fotossensibilizador

A agregação intermolecular ocorre em solução, envolvendo associação entre moléculas do soluto (auto agregação), ou entre o soluto e o solvente, formando assim os aglomerados macroscópicos. Os tipos de forças intermoleculares envolvidas entre as moléculas dos agregados são: ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas, incluindo interações entre o sistema π , forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas ³⁶. O tipo de força depende da estrutura do composto, sendo as interações do sistema π as que apresentam maior contribuição para a auto-agregação dos compostos macrocíclicos e planares como porfirinas, ftalocianinas e hipericina ³⁷.

Os fotossensibilizadores hidrofóbicos por apresentar baixa solubilidade em meio aquoso agregam-se facilmente, a formação de agregados entre as moléculas do próprio FS pode alterar os espectros de absorção e emissão e o rendimento quântico e assim prejudicar o processo de geração de EROs, uma vez que ocorrerão decaimentos não radiativos por conversão interna, dificultando a transferência de energia do FS para o $^3\text{O}_2$ ³⁶. Portanto, a agregação dos FSs usados em TFD tem demonstrado um papel importante para o estudo da atividade fotodinâmica. Além disso, essa informação pode ser útil para o futuro desenvolvimento de novas moléculas de FS e formas de encapsulação ou liberação de FS, assim aumentando a eficiência terapêutica da TFD.

1.4.7 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores

O direcionamento e acúmulo de fotossensibilizador em tumores é uma estratégia importante para definir o tempo necessário para a administração clínica do FS ¹³. Dessa forma, algumas propriedades peculiares do FS como lipofilicidade e penetração na bicamada fosfolipídica, podem facilitar a cinética de acumulação do FS nas células tumorais.

Os FSs mais lipofílicos se incorporam mais facilmente nos tecidos tumorais ³⁸, isso deve-se ao fato de que as células neoplásicas possuem maior captação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), a diminuição da LDL plasmática em pacientes com câncer e aumento do número de receptores para LDL em células tumorais ³⁹. O acúmulo preferencial dos fotossensibilizadores neste tecido, aumenta a seletividade

tumoral com o caráter lipofílico do agente fotossensibilizador ³⁸. Entretanto, um composto extremamente lipofílico pode apresentar desvantagem como a dificuldade de aplicação clínica e penetrabilidade na membrana fosfolipídica, uma vez que o transporte do FS dentro do corpo humano é através do meio fisiológico, onde o maior componente é água, dessa forma, o composto lipofílico por possuir baixa solubilidade em meio aquoso pode se agregar facilmente prejudicando a eficiência fotodinâmica ³⁶.

1.4.8 Cultura de células e ensaio citotóxico

A cultura celular está cada vez mais difundida, isso se deve à versatilidade dessa metodologia, sendo que os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*: possibilidade de limitar o número de variáveis experimentais; de obter dados significativos mais facilmente em tempo curto; permitir um maior número de repetições dos ensaios; utilizar menor quantidade da substância a ser testada; existência de inúmeros tipos celulares que possibilitam os testes em praticamente todos os tecidos e diferentes espécies animais ⁴⁰.

As culturas celulares são derivadas de explantes primários ou de suspensão de células dispersas sendo cultivadas em monocamadas aderentes em substrato sólido ou em suspensão em meio de cultura, quando as células não aderem ao substrato ⁴¹. A cultura de células *in vitro* permite estudar o crescimento, diferenciação e morte celular e efetuar manipulações genéticas necessárias ao perfeito conhecimento da estrutura e funções dos genes ⁴².

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células são importantes para a avaliação do potencial citotóxico dos fotossensibilizadores sob as condições controladas, o teste é feito com amostras em concentração conhecida de FS e número necessário de réplicas para determinação da concentração inibitória média (IC₅₀) através da curva de inibição (Figura 6) sendo que ponto de inflexão dessa curva equivale ao valor de IC₅₀. Quanto menor o valor de IC₅₀, maior o potencial citotóxico e eficiência terapêutica, devido ao uso de menor quantidade de FS que leva à vantagem de evitar a intoxicação por *overdose*, fotossensibilização após tratamento e outros efeitos adversos ⁴³

Figura 6. Curva de inibição da viabilidade celular. As concentrações de FS são expressas em escala logarítmica em função da percentagem de viabilidade celular. A curva possui formato típico sigmoide e o IC_{50} é definido pelo ponto de inflexão dessa curva.

Fonte: Adaptado ⁴⁴

O presente trabalho utiliza a técnica de MTT para determinar a viabilidade celular após o tratamento de TFD nas monocamadas de células. Este ensaio quantifica as células viáveis através da redução do sal amarelo de tetrazolium a cristais púrpuros de formazan, usando uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. O ensaio detecta células vivas e o sinal gerado é dependente da diminuição de ativação das células. A absorbância relativa à quantidade de formazan é proporcional à de células vivas e é determinada pelo espectrofotômetro ⁴⁴.

1.4.9 Tipo de morte celular

As células que sofrem lesões irreversíveis apresentam alterações morfológicas que se caracterizam como os tipos de morte celular. Para a TFD, os dois tipos mais relevantes são necrose e apoptose ⁴⁵. A Figura 7 mostra esses dois tipos de morte celular. A necrose ocorre quando o dano às membranas é severo, as enzimas lisossômicas entram no citoplasma e devastam as organelas causando inflamação celular. Outro tipo de morte celular, a apoptose, se caracteriza pela dissolução nuclear sem perda total da integridade das membranas e a liberação dos corpos apoptóticos, é o tipo de morte celular programada ⁴⁶.

Enquanto a necrose é sempre um processo patológico, a apoptose pode ocorrer em várias funções fisiológicas normais para eliminar as células indesejáveis e controlar o número de células de um indivíduo, impedindo um crescimento celular descontrolado como câncer, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células defeituosas ⁴⁷.

Diversos fatores podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, deprivação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio ⁴⁸. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). Em muitos tratamentos com TFD tem-se observado que os agentes fotossensibilizantes acumulam preferencialmente nas mitocôndrias e depois de excitados pela luz, estimulam a apoptose em células cancerígenas ⁴⁹.

Figura 7. As alterações estruturais da morte celular induzida por necrose (esquerda) e apoptose (direita). Na apoptose, as alterações iniciais consistem de condensação e fragmentação da cromatina nuclear, seguidas de brotamento do citoplasma e fagocitose dos corpos apoptóticos eliminados. Já na necrose ocorre sinais de bolhas citoplasmáticas e de digestão e extravasamento de componentes celulares.

Fonte: adaptado ⁵

1.5 Hipericina

A hipericina (HY), com estrutura química mostrada na Figura 8, é um pigmento natural presente na erva de São João e é comumente empregada para o tratamento de depressão branda ⁵¹. HY possui também outras propriedades como anti-inflamatória, antisséptica, anti-infecciosa, antiviral, cicatriza a varicela, estimula a circulação sanguínea e elimina hematomas ⁵². Por ser um composto natural extraído da *Hypericum perforatum* e a baixa toxicidade na ausência de luz, a HY é amplamente utilizada nos tratamentos de vários tipos de doenças ⁵¹.

As propriedades fotofísicas da HY incluem a absorção da luz visível em 560-595 nm e emissão de fluorescência em 600-640 nm em solventes orgânicos. De acordo com análises de espectroscopia a laser, HY é um potente fotossensibilizador, devido ao seu forte potencial de doação de elétrons em solventes polares e, portanto,

possui um rendimento quântico elevado que resulta numa grande produção de $^1\text{O}_2$ após a ativação da luz ⁵³. Outra característica peculiar da HY é a alta seletividade aos tecidos tumorais, um estudo *in vivo* mostrou que a acumulação da HY foi cerca de 16 vezes maior no tecido subcutâneo tumoral do que no tecido normal da pele após a administração intravenosa da HY (5mg kg^{-1}) ⁵⁴. Além disso, segundo Bernal *et al.* que realizaram um estudo comparativo mostrando que a HY apresenta maior potencial fotodinâmico que um derivado de hematoporfirina (Photogem) e uma clorina derivada da clorina e6 (Photoditazine) ⁵⁵. A HY é altamente indicada como FS na TFD devido a sua eficiência fotodinâmica ⁵⁶.

Figura 8. Fórmula estrutural química da hipericina

Em destaque, diversos trabalhos na literatura obtiveram resultados excelentes com a aplicação de HY-TFD no tratamento de câncer. A Tabela 3 mostra os tipos de câncer que foram estudados nos ensaios *in vitro* utilizando HY-TFD.

Tabela 3. Estudos *in vitro* da HY-TFD em células tumorais

Origem da linhagem tumoral	Fonte de Irradiação	Comprimento de onda (λ)	Referências
Bexiga	Laser	595 nm	57
Cabeça e pescoço	Lâmpada fluorescente	450-700 nm	58
Colo-retal	Lâmpada de quartzo-halogênio	591 nm	59
Fígado	Lâmpada halogênio	593 nm	60
Laringe	LED	630 / 590 nm	55; 61
Leucemia	LED	595 nm	62
Mama	Lâmpada fluorescente	530—620 nm	63
Melanoma	Lâmpada de UVA	320—410 nm	64
Nasofaringe	Lâmpada de quartzo-halogênio	590 nm	65

A saber, diversas propriedades da hipericina conferem os múltiplos mecanismos da sua citotoxicidade: 1) A acumulação intracelular nas organelas estratégicas das células, tais como a mitocôndria, retículo endoplasmático – complexo de Golgi e lisossomo ⁶⁶; 2) ligação preferencial às lipoproteínas das células tumorais ⁶⁷; 3) alta geração de oxigênio singlete após a ativação da HY pela luz ⁶⁸; 4) a ativação de enzimas e proteínas de reparação do gene contra a proliferação anormal das células ⁶⁹.

1.5 Curcumina

A curcumina (CUR), com estrutura química apresentada na Figura 3, é um pigmento natural extraído do açafrão-da-terra, conhecido também como cúrcuma,

turmérico ou gengibre amarelo. Essa substância foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1842 e sua estrutura química foi descrita por Lampe e Milobedeska em 1910⁷⁰. CUR é comumente usada como condimento na culinária asiática tradicional, na medicina chinesa e diversas propriedades farmacológicas, tais como ação antiinflamatória, antitumoral, antifúngica, antibacteriana e anticarcinogênica. Outras atividades biológicas são os efeitos antiinflamatório e antioxidante, e em especial a inibição do processo da angiogênese associada ao crescimento do tumor. Essa substância afeta também as proteínas relacionadas à adesão célula-célula e à produção de citocinas relevantes ao crescimento tumoral⁷¹.

Figura 3. Fórmula estrutural química da curcumina

Além disso, como fotossensibilizador, a curcumina absorve luz visível em comprimento de onda entre 420-425 nm e possui bom rendimento quântico, portanto, ao absorver a luz, os seus efeitos terapêuticos sobre o câncer e a fotoinativação de microrganismos são potencializados. Sabe-se que o efeito citotóxico de baixa concentração da CUR pode ser intensificado pela irradiação com os comprimentos de onda próximos à máxima absorbância da CUR. Dujic *et al.* têm mostrado que a combinação de baixas concentrações da CUR ($0,2 - 1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a luz visível ou UVA pode inibir a proliferação celular dos queratinócitos humanos, HaCat, e induz a morte celular via apoptótica⁷². Outros resultados similares foram obtidos com as células HeLa, fibroblastos humanos, melanócitos, melanoma, carcinoma nasofaríngeo e carcinoma pulmonar de Lewis^{73,78,79}.

A tabela 4. lista os estudos *in vitro* da CUR-TFD para tratamento de câncer.

Tabela 4. Estudos *in vitro* da CUR-TFD para em células tumorais

Origem da linhagem tumoral	Fonte de Irradiação	Comprimento de onda (λ)	Referências
Fígado	Laser	480	74
Mama	LED	450 / 670 nm	75; 76
Nasofaringe	Luz de projetor	300-400 nm	77
Pele	Lâmpada de UV/ Laser	315–400/ 400– 550 nm	78; 79; 80; 81
Pulmão	Lâmpada fluorescente	450-700 nm	82
Boca	Lâmpada de halogênio	400–700 nm	83

Não obstante, existem limitações do uso da curcumina, devido a sua rápida fotodegradação com a luz visível ⁸⁴, a insolubilidade em meio aquoso a pH 7,2 ou em meio acidificado e também a instabilidade desse pigmento em soluções com pH acima de 7, nas quais a molécula sofre a rápida degradação hidrolítica transformando-se em produto majoritário trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)- 2,4-dioxo-5-hexenal, enquanto os outros produtos são vanilina, ácido ferúlico e feruloil metano (Figura 9.) ⁸⁵.

Figura 9. A degradação hidrolítica da CUR gera produto majoritário trans-6-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-2,4-dioxo-5-hexenal, e os produtos minoritários vanilina, ácido ferúlico e feruloil metano.

Fonte: Adaptado ⁸².

A saber, é conhecido na literatura que a CUR é uma molécula que sofre degradação facilmente pelos fatores: luz, metabolismo e oxidação ^{84; 86}. Sendo assim, inúmeras pesquisas buscam desenvolver sistemas de liberação de fármacos ou encapsulação para manter a estabilidade desse composto, entre os quais, destacam-se nanopartículas, ciclodextrina, lipossoma, nanogel e emulsões ^{87; 88; 89; 90}. Modificações estruturais na molécula da CUR podem ajudar a retardar a degradação dessa molécula e aumentar a sua eficiência terapêutica. Em geral, a curcumina encapsulada ou com estrutura modificada demonstraram boa fotoestabilidade e aumento do potencial citotóxico. Banerjee *et al.* mostraram que o complexo formado pela CUR e Oxovanádio (IV) foi duas vezes mais fototóxico do que a CUR em células HeLa ⁷⁴. Recentemente, foi descrito que CUR em nanopartículas com superfície modificada por proteína e gelatina apresentaram a estabilidade melhorada em PBS e meio de cultura, além disso, a encapsulação promoveu, também, a maior acumulação intracelular e citotoxicidade ⁹².

Assim, foi realizado um estudo comparativo da eficiência fotodinâmica entre hipericina e curcumina, dois fotossensibilizadores naturais, originalmente extraídos das plantas. Este estudo pode ser essencial para o entendimento das suas aplicações no tratamento anticâncer utilizando Terapia Fotodinâmica, além disso, os dados obtidos nesta comparação podem auxiliar, também, no desenvolvimento de sistemas de liberação adequados ou modificações estruturais necessárias que visam a melhorar a aplicação clínica desses FSs.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar comparativamente a eficiência fotodinâmica da hipericina e da curcumina através dos seguintes parâmetros:

- ✓ Absortividade molar;
- ✓ Estudo de fotodegradação através de medidas de absorbância;
- ✓ Coeficiente de partição em octanol-água (LogP) para determinar a hidrofobicidade dos FSs;
- ✓ Coeficiente da atividade fotodinâmica obtido pelo dosímetro químico, ácido úrico, que captura o oxigênio singlete formado quando os FSs são irradiados;
- ✓ Influência de agregação na produção de oxigênio singlete;
- ✓ Determinação da concentração inibitória média (IC₅₀);
- ✓ Investigação da citotoxicidade da Curcumina degradada pela luz visível;
- ✓ Acumulação intracelular dos FSs através de microscopia Confocal de fluorescência;
- ✓ Identificação do tipo de morte celular induzido por cada um dos FSs utilizando a microscopia de fluorescência e os marcadores celulares (brometo de etídio e laranja de acridina)

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e sistema de irradiação

A Hipericina foi obtida através de síntese realizada pelo Prof. Dr. Anderson O. Ribeiro da UFABC a partir da emodina de acordo com a descrição da literatura sendo que a pureza do produto foi checada por $^1\text{H-RMN}$ ⁹². A Curcumina foi adquirida da PDT Pharma (Cravinhos-SP, Brasil). Para cada fotossensibilizador, foi preparada uma solução estoque 1 mg mL^{-1} em dimetil sulfóxido (DMSO, Labsynth), esterilizada por filtração em membrana com poro de $0,22 \mu\text{m}$ e estocada ao abrigo da luz a 4°C .

O sistema ótico de irradiação empregado consiste de um conjunto de lâmpadas de diodo emissor de luz (LED) montado num dispositivo chamado Biotable (Figura 10.), apropriado para irradiação de culturas celulares em placas e recipientes planos. Os aparelhos foram desenvolvidos pelo Laboratório de Apoio Técnico do Centro de Pesquisas em Ótica e Fotônica (CEPOF) do IFSC-USP.

Figura 10. As lâmpadas de LED. A) amarelo ($\lambda = 590 \pm 10 \text{ nm}$) com potência = $8,4 \text{ mW cm}^{-2}$; B) azul ($\lambda = 455 \pm 10 \text{ nm}$) com potência = $7,9 \text{ mW cm}^{-2}$

3.2 Determinação do coeficiente de absorvidade molar

Preparam-se soluções 3 a $30 \mu\text{M}$ de FS em DMSO e através dos espectros obtidos, o coeficiente de extinção molar (ϵ) foi determinado pela lei de Lambert-Beer utilizando o software OriginPro 8. As medidas de absorção ótica foram realizadas no espectrofotômetro HITACHI U-2800, utilizando-se cubeta de quartzo com caminho

ótico de 1 cm. Os valores de ϵ foram usados para determinar a concentração dos fotossensibilizadores.

3.3 Fotodegradação dos fotossensibilizadores

Soluções dos FSs $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO foram irradiadas por até 90 min sob constante agitação mecânica. Para a HY, utilizou-se LED amarelo com emissão em $590 \pm 10 \text{ nm}$ a uma irradiância de $8,4 \text{ mW cm}^{-2}$. Para curcumina, foi empregado LED azul com emissão em $455 \pm 10 \text{ nm}$ a uma irradiância de $7,9 \text{ mW cm}^{-2}$. Retiraram-se alíquotas da solução em determinados intervalos de tempo para a obtenção dos espectros de absorção. As medidas de absorbância ($\lambda = 590 \text{ nm}$ para HY e 430 nm para CUR) foram empregadas para estimar a porcentagem do FS intacto remanescente.

3.4 Determinação dos coeficientes de partição

O logaritmo do coeficiente de partição (Log P) foi determinado de acordo com o método proposto por Pooler e Valenzano⁹³, utilizando uma suspensão de PBS e 1-octanol sob agitação por 3h e mantida em repouso por uma semana. Após esse período, preparou-se 6 mL da solução de FS $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ com 1-octanol da suspensão, foi retirado 1 mL dessa solução para obter o espectro inicial e os restantes 5 mL foram colocados no béquer com mais 5 mL de PBS da suspensão, a mistura foi agitada vigorosamente por 10 min e depois centrifugada por 10 min no tubo cônico. Este foi mantido em repouso por 2h, retirou-se uma alíquota da fase orgânica para obter o espectro final. O Log P foi calculado de acordo com a equação (3):

$$\text{Log P} = \log \frac{A_{\lambda d}}{(A_{\lambda 0} - A_{\lambda d})} \quad \text{Equação (3)}$$

onde Log P=logaritmo do coeficiente de partição; $A_{\lambda 0}$ = absorção da solução antes da partição e $A_{\lambda d}$ =absorção da solução após a partição, ambas medidas no mesmo comprimento de onda λ .

O caráter hidrofílico se define pela baixa quantidade de FS distribuída em 1-octanol, portanto, $\log P < 0$. O composto lipofílico apresenta $\log P > 1,5$, assim, os valores intermediários $0 < \log P < 1,5$ indicam que o composto possui caráter anfifílico⁹⁴.

3.5 Fotoxidação do ácido úrico

Prepararam-se soluções de FS $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e AU $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%. Os espectros de absorção da mistura foram obtidos antes e depois da irradiação no amarelo e azul para HY e CUR, respectivamente, por 5 min, sob agitação. O decréscimo na intensidade da banda característica do AU em 290 nm devido à reação de fotoxidação de AU foi utilizado para o cálculo do coeficiente de AF, segundo a equação (4).

$$AF = \frac{\Delta A_{AU} \times 10^5}{P \times t \times A(\lambda_{irra})} \quad \text{Equação (4)}$$

Sendo AF = atividade fotodinâmica ($\text{m}^2 \text{J}^{-1}$); ΔA_{AU} = variação da intensidade da absorção do ácido úrico em 290 nm antes e após a irradiação; P = potência da luz (W m^{-2}); t = tempo de irradiação (s); A (λ_{irra}) = absorbância do FS na mistura no comprimento de onda da irradiação do LED.

3.6 Influência de agregação na produção de oxigênio singlete

Prepararam-se soluções de FS $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e AU $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS sem adicionar SDS para auxiliar a solubilização dos FSs em meio aquoso. Os espectros de absorção da mistura foram obtidos antes e depois da irradiação no amarelo e azul para HY e CUR, respectivamente, por 5 min, sob agitação. O decréscimo na intensidade da banda característica do AU em 290 nm devido à reação de fotoxidação de AU foi utilizado para o cálculo do coeficiente de AF, segundo a equação (4).

3.7 Cultura celular

As linhagens celulares de carcinoma epidermóide de laringe humana, HEp-2 (ATCC CCL-23) e de células epiteliais de rim de macaco verde africano, Vero (ATCC CCL-81) foram cultivadas e aderidas ao substrato sólido consistindo da garrafa de polipropileno com área de 25 cm² em 5 mL de meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove's com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos penicilina 10 000 U.I. mL⁻¹ e estreptomicina 10 mg mL⁻¹. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, 95% ar e 5% CO₂.

A subcultura das células foi feita a cada três dias, quando o meio de cultura é retirado e adiciona-se 1 mL da solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH=7,4 para a lavagem. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de 1 mg mL⁻¹ enzima proteolítica tripsina com 0,03% de etilenodiaminotetracético (EDTA) para digerir a proteína extracelular induzindo a remoção das células do substrato de cultura. Após isso, meio de cultura foi adicionado para neutralizar a tripsina, esta solução foi transferida para um tubo cônico e centrifugada a 1000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, as células depositadas no fundo do tubo foram resuspendidas com meio de cultura até a homogeneização.

Para a contagem do número de células utilizando a câmara de Newbauer, adicionou-se 100 µL da suspensão celular em 400 µL de PBS e 500 µL de solução 0,4% Trypan blue através do teste de exclusão do corante Trypan blue, o qual é incorporado seletivamente pelas membranas danificadas das células mortas. O volume de 10 µL dessa solução foi pipetado para preencher os quadrantes da câmara de Newbauer. As células vivas foram identificadas pela morfologia microscópica translúcida, devido a não incorporação do corante. Os números das células vivas em todos os quadrantes foram contados e calculou-se a média, esta foi multiplicada por 10⁴ e o fator de diluição 10 para obter o número de células por mL de suspensão ⁹⁵.

3.8 Ensaios citotóxicos

Os ensaios citotóxicos foram feitos utilizando placas de cultura celular de 96 poços. Nas placas foram semeadas 2 x 10⁴ células por poço incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24h, removeu-se o meio de cultura e lavou-se a monocamada com PBS.

Em seguida, as várias concentrações de FSs em meio de cultura foram adicionadas nos poços e incubadas por 2h, a fim de promover a acumulação intracelular dos fotossensibilizadores. Após, as soluções foram retiradas e cada poço foi lavado com PBS por duas vezes para eliminar os possíveis resíduos de fotossensibilizadores nas células. Por fim, os poços foram preenchidos com o meio de cultura fresco e as placas foram submetidas à irradiação no devido comprimento de onda. Ao término da irradiação, incubaram-se as placas por 48h para a determinação da viabilidade celular após o tratamento fotodinâmico.

A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico do MTT ⁴⁴. Após essas 48h, o meio de cultura foi substituído por uma solução de 1 mg mL⁻¹ de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) solubilizado em meio de cultura. O método se baseia na formação de cristais de Formazan, formados pela redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais ativas nas células vivas. Os cristais apresentam a coloração violeta e absorvem em 570 nm. Após 3h de incubação, a solução com MTT foi removida, adicionou-se 50 µL de etanol para solubilizar os cristais de Formazan e 150 µL de uma mistura de PBS e álcool isopropílico 50% v/v. A seguir, determinou-se a absorbância em 570 nm, utilizando um leitor de placa modelo Multiskan GO (Thermo Scientific).

O valor da concentração inibitória média (IC₅₀), que representa a concentração necessária de fotossensibilizador para inibir a metade da população celular, foi obtido através da curva dose-resposta processada pelo programa GraphPad Prism, a partir de três experimentos independentes ⁴⁴.

3.9 Citotoxicidade da curcumina degradada

Uma vez que observou-se intensa degradação da CUR, tivemos o cuidado de investigar se o(s) fotoproduto(s) apresentam alteração na citotoxicidade durante a TFD. Para isso, diversas concentrações da curcumina (3, 12, 24, 27, 96 e 178 µmol L⁻¹) foram preparadas em meio de cultura Iscove's, e colocadas na placa de cultura celular de 6 poços para proceder a irradiação com LED azul, após isso, avaliou-se a citotoxicidade dessas soluções da CUR previamente degradadas através do ensaio citotóxico.

3.10 Detecção do tipo de morte celular por microscopia de fluorescência

O tipo de morte celular após a TFD foi detectado usando os marcadores celulares: brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA). Sabe-se que o LA é um corante fluorescente que atravessa a membrana integra das células vivas e intercala no DNA originando fluorescência de coloração verde. O BE consegue apenas penetrar nas células mortas e se liga ao DNA apresentando uma fluorescência alaranjada brilhante ⁹⁶.

O plaqueamento celular foi feito em lâminas com 8 câmaras para crescimento celular (Nunc™ Lab-Tek™ II – Thermo Fischer). Em cada câmara foram incubadas 2×10^4 células HEp-2. Após 24h, o meio de cultura foi retirado e os FSs com concentração de duas vezes IC_{50} foram incubados por 2h, a seguir as células foram lavadas com PBS para retirar resíduos de FS. As lâminas foram analisadas após 24h da TFD da seguinte forma: i) controle: contendo apenas células; ii) escuro: contendo FS sem irradiação e iii) luz: contendo FS com irradiação.

As análises do tipo de morte celular foram feitas com 30 μ L da solução de LA ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)/BE ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) adicionados em cada cavidade. Após 1 minuto à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, o corante foi retirado e as lâminas foram lavadas três vezes com PBS. As câmaras foram desmontadas e levadas imediatamente ao microscópio de fluorescência (Olympus BX41) no aumento de 20x, filtro de excitação de 460/90 nm, espelho dicromático de 500 nm e filtro de barreira de 520 nm. Obtiveram-se as imagens de oito campos de cada lâmina pela câmara Olympus DP72.

Para quantificar o tipo de morte ocorrido na TFD, foram selecionadas no mínimo 200 células de cada amostra na seguinte forma de identificação ⁹⁶:

- Células viáveis são coradas em verde;
- Células em apoptose precoce são coradas com núcleo vermelho e o citoplasma verde;
- Células em apoptose tardia são coradas em alaranjado;
- Células necróticas são coradas em vermelho.

$$\% \text{células apoptóticas} = \frac{\text{Número total de células apoptóticas (BE+LA)}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

3.11 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores

O plaqueamento celular foi feito em lâminas com 8 câmaras para crescimento celular (Nunc™ Lab-Tek™ II – Thermo Fischer), em cada câmara foram incubadas 2×10^4 células de HEp-2. Após 24h, o meio de cultura foi retirado, o FS em concentrações duas vezes o valor de IC_{50} foi incubado por 1, 2 e 3h. Após a incubação, cada câmara foi lavada com PBS por três vezes para retirar o resíduo de FS.

No microscópio Confocal de fluorescência, as câmaras foram desmontadas, somente a lâmina foi levada ao microscópio. A HY foi excitada com laser de Hélio-neônio em 598 nm e a CUR foi excitada com laser de argônio em 458 nm. As imagens microscópicas das células foram obtidas junto com a emissão de fluorescência indicando a acumulação intracelular do FS. Além disso, foi feito o controle para cada lâmina, no qual as células não foram incubadas com FS para mostrar que nessas excitações de lasers, as células HEp-2 não possuem autofluorescência.

3.12 Análise Estatística

Os resultados experimentais foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste t de Student para mostrar a significância da diferença entre os pares de médias. A diferença foi considerada significativa quando o valor de $p < 0,05$. Os tratamentos estatísticos foram realizados no programa GraphPad Prism.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Coeficiente de absortividade molar

O coeficiente de absortividade molar da CUR em DMSO foi determinado no comprimento de onda de máxima absorção (430 nm), obtendo-se o valor de $5,89 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo que o logaritmo deste valor é 4,77 que corrobora com o valor obtido por Jasim e Ali, cujo valor de $\log \epsilon$ foi igual a 4,68⁹⁷. A avaliação do ϵ pode ser um parâmetro essencial para checar a especialidade da CUR em termos da absorção de luz. A HY apresentou o coeficiente de absortividade molar igual a $2,34 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, o qual corrobora com os valores descritos na literatura^{61; 98}.

Os valores do ϵ dos dois fotossensibilizadores investigados estão na ordem $10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, dessa forma, de acordo com a Tabela 2, a tanto na HY com na CUR as transições eletrônicas são permitidas. Esta característica realça a importância do FS possuir a alta absortividade molar na faixa do visível, pois através da irradiação de luz, a molécula é excitada ao nível maior de energia favorecendo a transferência de energia para oxigênio e a ocorrência da TFD⁹⁹.

Ao comparar os valores do ϵ da HY e CUR (Tabela 5), pode-se observar que ambos apresentam alta absortividade molar o que é favorável na TFD, entretanto, o comprimento de absorção que promove a maior penetrabilidade no tecido é de 600 a 800 nm, o comprimento acima de 800 nm não possui a energia suficiente para excitar o oxigênio a gerar ERO¹⁰⁰. Embora o comprimento de onda em 430 nm (azul) para CUR possa ser eficiente na ativação da molécula, a luz azul não possui muita penetração no tecido celular sendo mais adequado para tratamentos de tumores ou infecções superficiais. Já a HY apresenta absorção máxima em 590 nm, mais próxima da janela terapêutica (600-750 nm) e com isso mais apropriada para TFD de tumores com profundidade até cerca de alguns milímetros.

Tabela 5. Valores de coeficiente de absorvidade molar para os fotossensibilizadores em DMSO.

Fotossensibilizador	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ ($\times 10^4$ L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Log ϵ (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
Hipericina	590	2,34	4,37
Curcumina	430	5,89	4,77

4.2 Fotodegradação dos fotossensibilizadores

A Figura 4 apresenta os espectros de absorção dos FSs solubilizados em DMSO mostrando a diminuição da absorbância das bandas sob irradiação e evidenciando a decomposição dos FSs com a luz. A HY degradou proporcionalmente com a luz, mantendo o mesmo perfil espectral, ao contrário da CUR que, além da degradação, teve deslocamento da banda principal em 430 nm e o surgimento de outra banda próxima de 350 nm. O aparecimento da banda nova pode ser atribuído à formação de fotoprodutos, devido à degradação da molécula da CUR. Esta molécula possui uma cadeia linear com dois anéis aromáticos nas pontas, assim é possível que a molécula se quebre com o fornecimento da energia luminosa e a produção de espécies reativas de oxigênio durante o processo de fotobranqueamento da CUR, formam-se fenóis e outras moléculas menores. Os fotoprodutos da CUR solubilizada em isopropanol e irradiada em 400-510 nm por 4h apresentaram vários compostos menores formados, tais como vanilina, ácido vanílico, aldeído ferúlico, ácido ferúlico e 4-vinil-guaiacol, sendo que estes foram identificados utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas ⁸⁴, entretanto, a citotoxicidade e o efeito fotodinâmico desses compostos não foram estudados.

Figura 11. Fotodegradação dos FSs. A) HY 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em DMSO; B) CUR 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ambos em DMSO, em função do tempo de irradiação.

Através do acompanhamento das bandas características dos FSs ($\lambda = 590$ nm para HY e 430 nm para CUR), foi possível estimar a quantidade dos FSs remanescentes após a fotodegradação. A Figura 11 mostra a degradação da HY e CUR em função dos tempos de 0, 10, 20 e 30 min da irradiação nos comprimentos de onda 590 nm e 455 nm para HY e CUR, respectivamente. Ao longo do tempo, a CUR apresentou a rápida degradação e, durante 30 min de irradiação, a HY teve apenas 20% de degradação, já a CUR em torno de 54%. Essa diferença significativa demonstrou que a CUR é uma molécula menos fotoestável que a HY.

Figura 12. Porcentagem dos fotossensibilizadores remanescentes em solução de DMSO em função do tempo de irradiação com LED ($\lambda = 590$ nm para HY e 455 nm para CUR).

4.3 Determinação dos coeficientes de partição

A tabela 6 apresenta os valores de log P obtidos para HY e CUR.

Tabela 6. Coeficientes de partição obtidos para os fotossensibilizadores

Fotossensibilizador	Log P	Característica
Curcumina	$2,12 \pm 0,12$	Hidrofóbica
Hipericina	$0,48 \pm 0,02$	Anfifílica

Os valores de Log P obtidos mostraram que a CUR possui característica mais hidrofóbica e a HY anfifílica. O log P teórico da CUR calculado pelo programa computacional MOPAC é próximo a 2,5¹⁰¹, corroborando com o valor obtido neste experimento. Além disso, há relação entre o valor de log P e a citotoxicidade da CUR e outros compostos similares a ele, para os quais, quanto maior o Log P, o composto é menos citotóxico, ou seja menor potencial de destruir as células¹⁰¹. O valor do Log P da HY obtido neste estudo foi próximo ao valor descrito recentemente na literatura pelo nosso grupo de pesquisa⁶¹.

Apesar da hidrofobicidade da HY, o composto possui seis hidroxilas e dois átomos de oxigênio quinona na periferia, esses grupos polares deixam a HY com caráter anfifílico, sendo que a desprotonação da HY é possível pelos grupos fenólicos *bay* e *peri*, com valores de pKa de 1,8 e 9-12 respectivamente (Figura 11). A estabilidade do ânion *bay* e sua facilidade de ionização são devidas à proximidade dos grupos de hidroxilas que permite o compartilhamento de um átomo de hidrogênio com os dois átomos de oxigênio formando a ligação de hidrogênio. Portanto, em pH fisiológico em torno de 7,0, a HY apresenta-se predominantemente na forma de monoânion. Embora os possíveis sais formados com o monoânion da HY sejam insolúveis em meio aquoso, estes agem como par de íons lipofílicos que facilitam a sua difusão na bicamada lipídica¹⁰². No entanto, em altas concentrações, HY pode se agregar em meio aquoso e prejudicar a eficiência terapêutica¹⁰³.

Figura 13. Ilustração dos grupos hidroxila bay e peri e os seus respectivos pKa.
Fonte: Adaptado ¹⁰⁴.

Por outro lado, estudos da literatura mostraram que o FS hidrofóbico interage facilmente com as células tumorais via receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) devido à alta quantidade de LDL contida nas células do câncer ¹⁰⁵. Já para aplicação clínica, a solubilidade do FS no meio aquoso é importante para biodisponibilizar a molécula no organismo. Tanto a HY quanto a CUR, apresentam capacidade de ligar-se aos receptores de LDL em virtude das suas características hidrofóbicas ^{67; 106}. Esta peculiaridade permite que a TFD utilizando esses FSs seja um tratamento seletivo na destruição do tumor com mínima invasão dos tecidos sadios.

Em suma, um FS ideal deve ser anfifílico, ou seja, uma parte apolar para difusão celular e outra parte polar para oferecer a biodisponibilidade no organismo ¹⁰⁷. Portanto, HY apresenta características mais adequadas para TFD.

4.4 Fotoxidação do ácido úrico

Para detectar e quantificar o oxigênio singlete, utilizou-se AU pois à medida que este reage com o oxigênio singlete produzido durante o processo fotodinâmico pelo FS, a banda do ácido úrico em 290 nm é diminuída (Figura 14).

Figura 14. Espectro de absorção ótica antes e após irradiação de uma mistura de AU 10 µg mL⁻¹ e FS 10 µg mL⁻¹ em SDS 2%. A) Hipericina B) Curcumina.

A Figura 12 mostra a fotodegradação dos FSs, durante 5 min de irradiação com potências de LED próximas e os comprimentos de onda 590 nm e 455 nm para HY e CUR, respectivamente. A HY teve apenas 5% de degradação, já a CUR degradou 24%, esses resultados corroboram com o experimento da fotodegradação, o qual mostrou que a HY foi um composto mais fotoestável comparando com a CUR.

Através da equação (4), calculou-se os coeficientes da atividade fotodinâmica (Tabela 7), podendo-se concluir que HY é cerca de seis vezes mais eficiente na produção de oxigênio singleto do que a CUR.

Tabela 7. Coeficientes de Atividade Fotodinâmica dos FSs

Fotossensibilizador	Atividade Fotodinâmica (m ² J ⁻¹)
Hipericina	7,5 ± 0,4
Curcumina	1,26 ± 0,08

4.5 Influência da agregação na formação de oxigênio singleto

A influência da agregação do FS na produção de oxigênio singleto foi avaliada. Os FSs foram misturados com AU em PBS sem adição de dodecil sulfato de sódio (SDS), uma vez que SDS é surfactante aniônico que pode auxiliar na solubilização dos FSs em meio aquoso, dessa forma, a não adição desse composto promove a

agregação dos solutos insolúveis, no caso os FSs hidrofóbicos ¹⁰⁸. A Figura 15 mostra os espectros de absorção das misturas sendo que as bandas do AU em 290 nm apresentaram a mesma intensidade que corresponde à concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, como os FSs estão na forma agregada, as bandas principais de absorção da HY e CUR em 590 e 430 nm respectivamente, estão com baixa intensidade. À medida que a mistura foi irradiada, não houve a diminuição significativa da banda de AU, isso evidencia que não houve formação de oxigênio singlete num meio onde pode haver FS agregado.

Figura 15. Espectro de absorção ótica antes e após irradiação com LED de uma mistura de AU 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e FS 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em PBS. A) Hipericina B) Curcumina.

Um estudo da literatura investigou o efeito de agregação intracelular da HY através dos parâmetros: concentração, tempo de incubação e a dose de luz durante a HY-TFD e observaram que a HY na concentração de 5 μM , permaneceu na forma monomérica nas células de queratinócitos murinos por mais de 26h de incubação, entretanto, o efeito intenso de agregação da HY foi observado com a concentração de 50 μM HY, sendo que a fluorescência intracelular da HY diminuía com o tempo de incubação¹⁰⁹. Em seguida, os pesquisadores provaram que a fototoxicidade da HY com o tempo de incubação de 1 e 7 h da HY 50 μM foi semelhante a HY 5 μM nas mesmas condições ¹⁰⁹. Dessa forma, a agregação é um efeito que não somente dificulta a administração clínica dos FSs, como pode também afetar a fototoxicidade durante o tratamento da TFD, devido à baixa produção de oxigênio singlete. Para o melhor resultado da TFD, a combinação dos parâmetros de aplicação pode influenciar crucialmente a sua eficiência terapêutica, além disso, outros estudos também

mostram a importância do uso de veículos de drogas para desagregar o FS, além da entrega eficiente nos tecidos, diminuindo a agregação e maximizando o resultado terapêutico da TFD⁵⁶.

4.6 Ensaios citotóxicos

Para a avaliação da fototoxicidade da hipericina e da curcumina após irradiação com LED, as células HEP-2 e Vero foram incubadas por 2h com várias faixas de concentração: 0 a 21,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0 a 3,16 ng mL^{-1} para hipericina, 0 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para curcumina, em meio de cultura. O efeito da luz nas células foi obtido após a incubação de FS utilizando a irradiação em $590 \pm 10 \text{ nm}$ e em $455 \pm 10 \text{ nm}$ para HY e CUR, respectivamente.

Através dos resultados de IC_{50} nas células HEP-2 (Tabela 8), pode-se concluir que a irradiação potencializou a citotoxicidade dos FSs (446 vezes para HY e apenas 8,1 vezes para CUR) pelo mecanismo da TFD, uma vez que no escuro, os FS são poucos tóxicos, pois são necessárias concentrações extremamente altas para acarretar 50% de morte celular. A potencialização de citotoxicidade dos FSs pela luz é um aspecto importante para aplicação clínica, uma vez que a luz pode tonar um recurso seletivo para destruição localizada do tumor evitando danos aos tecidos sadios²⁶.

Tabela 8. Valores de IC_{50} dos FSs: HY e CUR para a linhagem celular HEP-2 após 2h de incubação e irradiação por 20 min, $\lambda = 590 \text{ nm}$ ($I = 8,4 \text{ mW cm}^{-2}$) e $\lambda = 455 \text{ nm}$ ($I = 7,9 \text{ mW cm}^{-2}$), respectivamente.

Dose de luz (J cm^{-2})	$\text{IC}_{50} \pm \sigma (\mu\text{mol mL}^{-1})$	
	HY	CUR
0	$19,5 \pm 2,4$	$95,3 \pm 10,3$
10	$0,044 \pm 0,006$	$11,7 \pm 1,3$

Para as células Vero, os valores de IC_{50} (Tabela 9) foram em geral maiores do que nas HEP-2, o que indica menor citotoxicidade o que era esperado já que a linhagem Vero é constituída de células não tumorais.

Tabela 9. Valores de IC₅₀ dos FS: HY e CUR para a linhagem celular Vero após 2h de incubação e irradiação por 20 min, $\lambda = 590$ nm ($I = 8,4$ mW cm⁻²) e $\lambda = 455$ nm ($I = 7,9$ mW cm⁻²), respectivamente.

Dose de luz (J cm ⁻²)	IC ₅₀ ± σ (μmol L ⁻¹)	
	HY	CUR
0	22,3 ± 1,9	101,9 ± 7,4
10	0,07 ± 0,01	16,2 ± 1,8

A citotoxicidade da HY tem sido bastante investigada na literatura ^{58; 63; 110}. O aumento do potencial citotóxico pela ativação da luz é um mecanismo conhecido, uma vez que a HY é uma molécula que apresenta grupos cromóforos que absorvem a luz e a excitação do estado fundamental para estado excitado gera a produção de oxigênio singlete que é um agente indutor de apoptose nas células tumorais. Além disso, a citotoxicidade da HY pode variar com o tipo de célula¹¹¹. Os resultados deste estudo mostraram que a HY foi mais citotóxica nas células tumorais do que nas células não-tumorais, dessa forma, evidenciou-se a seletividade da HY no tratamento de câncer devido a sua característica hidrofóbica, a HY tem mais facilidade de difundir e acumular nas células tumorais ¹¹².

Schmitt *et al.* mostraram que a HY extraída da *Hypericum perforatum* é menos fototóxica do que a HY na forma pura, fato que pode ser atribuído aos constituintes adicionais presentes no extrato¹¹³. O uso de FS sintético é considerado uma vantagem na TFD, além de assegurar a eficiência fotodinâmica, a síntese pode, também, garantir o grau de pureza do FS eliminando a possibilidade de intoxicação por outras substâncias indesejadas. A HY utilizada neste trabalho foi sintetizada com pureza confirmada.

Sabe-se que o efeito citotóxico de baixa concentração da CUR pode ser intensificado pela irradiação com os comprimentos de onda próximos à máxima absorvância da CUR. Dujic *et al.* têm mostrado que a combinação de baixas concentrações da CUR (0,2 - 1 μg mL⁻¹) e a luz visível ou UVA pode inibir a proliferação celular dos queratinócitos humanos, HaCat, e induz a morte celular via apoptótica ⁷². Outros resultados similares foram obtidos com as células HeLa, fibroblastos humanos, melanócitos, melanoma, carcinoma nasofaríngeo e carcinoma pulmonar de Lewis ^{73,78,79}.

O potencial anticâncer intrínseco da CUR é conhecido na literatura ¹¹⁴, entretanto, através dos dados obtidos nessa investigação, pode-se observar que a ativação da CUR pela luz azul potencializou o seu efeito terapêutico. Portanto, a combinação da CUR e luz torna o tratamento de câncer mais efetivo. A toxicidade sistêmica da CUR foi investigada pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, utilizando uma dose de 3,5 g da CUR por Kg de massa corporal por 90 dias nos ratos e nenhum efeito adverso foi observado ¹¹⁵. Por outro lado, Bruzell *et al.* compararam a fototoxicidade da curcumina sintética e curcumina natural, que é uma mistura utilizada como alimento composto por três tipos de curcuminóides e mostrou que não há diferença significativa entre os resultados ⁸⁹, portanto, o uso da CUR como fotossensibilizador pode ser vantajoso em termo da disponibilidade e da baixa toxicidade no ser humano.

4.7 Citotoxicidade da curcumina degradada

Avaliou-se a citotoxicidade da curcumina previamente degradada pela luz azul. Para baixas concentrações (3, 12 e 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$), foram testadas sob procedimento da TFD, ou seja, após a incubação com a curcumina degradada, as células HEp-2 foram irradiadas em dose de luz 10 J cm^{-2} e os resultados foram comparados com a curcumina não degradada nas mesmas condições. Através da Figura 14 pode-se observar que em geral a curcumina degrada teve a diminuição do potencial citotóxico nas concentrações mais altas de 12 e 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na menor concentração a curcumina, tanto não degradada quanto degradada, praticamente não apresentou fototoxicidade.

Já para as altas concentrações (27, 96, 178 $\mu\text{mol L}^{-1}$), foram avaliadas a citotoxicidades da curcumina não degradada e degradada sob condição de ausência da luz (Escuro). A Figura 14 mostrou que, em geral, a curcumina degradada é menos citotóxica que a curcumina não degradada.

Portanto, concluiu-se que a degradação da CUR realmente afeta o seu potencial citotóxico, além disso, conforme o resultado obtido deste experimento os possíveis fotoprodutos gerados pela CUR também não apresentam citotoxicidade. Diferentemente, num outro estudo com o fotossensibilizador comercial, Photodithazine[®], um derivado de clorina, foi mostrado que os seus fotoprodutos são

mais citotóxicos que o mesmo não fotodegradado e que possui alta eficiência fotodinâmica ¹¹⁶. Esses resultados nos motivaram estudar a citotoxicidade dos fotoprodutos da curcumina. Nesse caso, como a fotodegradação leva a diminuição da citotoxicidade e da fototoxicidade, isso leva à diminuição da eficiência da terapia fotodinâmica em função do tempo de irradiação, devendo este fato ser levado em consideração no planejamento da terapia empregando a CUR.

Figura 16. Citotoxicidade e fototoxicidade da Curcumina previamente degradada pela luz azul nas células da HEP-2.

4.8 Acumulação intracelular dos fotossensibilizadores

A capacidade e cinética da acumulação intracelular dos FSs está intimamente relacionada com o tempo de incubação. A rapidez de um FS para se acumular no interior das células pode diminuir o tempo de incubação do FS, por conseguinte, reduzir o tempo do experimento. Esta vantagem reflete mais ainda na aplicação clínica da TFD, uma vez que, atualmente, os FS requerem um tempo de administração muito longo, em torno de 8 – 24h ¹¹⁷. Dessa forma, tempos longos de acumulação leva a diversas inconveniências, tais como, tempo longo de espera, fotossensibilização

indesejada e degradação do FS pelo metabolismo ¹¹⁸. Portanto, a acumulação rápida de FS possibilita o aumento de eficiência da TFD e melhora na sua aplicação clínica.

Cada FS tem suas propriedades diferentes para acumulação intracelular. A Figura 15 mostra a acumulação intracelular da HY e da CUR nas células tumorais de HEP-2, as imagens foram obtidas através do microscópio Confocal de fluorescência, após 1, 2 e 3 h de incubação com FS. Os controles foram feitos para demonstrar que sob condições de excitação para HY e CUR com os lasers de Hélio-neônio e argônio, respectivamente, as células HEP-2 não apresentaram autofluorescência, esta informação foi importante para garantir que toda fluorescência emitida após a excitação provém do FS.

Ao comparar as intensidades de fluorescência emitida em tempos diferentes pela HY e CUR (Figura 15), pode-se observar que a HY se acumulou rapidamente logo depois de 1h de incubação e intensificou em seguida com 2 e 3h, isso deve-se à característica anfifílica da HY em intercalar a membrana celular, um estudo comparativo mostrou que a HY possui maior capacidade de acumulação intracelular do que Protoporfirina XI induzida pelo ácido aminolevulínico (ALA) em células tumorais de Meduloblastoma ¹¹⁹. Por outro lado, a acumulação da CUR é um pouco mais lenta conforme mostrada nas imagens, as baixas intensidades de fluorescência nos primeiros tempos evidenciaram a dificuldade da CUR se acumular no interior das células. Posto que a CUR é muito hidrofóbica e acumula majoritariamente nas membranas celulares ¹²⁰. Além disso, uma vez que 50 % da CUR degrada em meio de cultura após 8h de incubação ⁸⁵, por tanto, os tempos escolhidos foram de 0, 1, 2 e 3h, para que a degradação dos FSs seja baixa.

Figura 17. Imagens da microscopia Confocal de fluorescência mostram a acumulação intracelular dos FSs. A) Hipericina, B) Curcumina, nas células da HEp-2

4.9 Detecção do tipo de morte celular por microscopia de fluorescência

Em virtude das diferenças morfológicas entre necrose e apoptose, foi possível analisar o tipo de morte celular com o auxílio dos corantes BE e LA. As imagens microscópicas obtidas (Figura 17) permitiram a distinção entre as células vivas, apoptóticas e necróticas pela coloração.

Figura 18. Microscopia de fluorescência das células HEP-2, após 24h da TFD com incubação de FS por 2h, HY 0,09 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a CUR 23,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$, utilizou-se a irradiação em 590 nm para HY e 455 nm para CUR na dose de 10 J cm^{-2} . Controle= células não incubadas com FS, Escuro= células incubadas com FS, sem irradiação e TFD= células incubadas com FS e irradiadas. A marcação com o brometo de etídio e laranja de acridina que as células vivas tenham coloração verde, as apoptóticas com coloração verde e em alaranjado e as necróticas..

As células HEP-2 tiveram 100% de morte celular por apoptose após a HY-TFD e para a CUR-TFD apenas 66% de apoptose e 9% de necrose (Figura 17). Sabe-se que a HY e CUR são dois FSs que induzem apoptose e necrose via TFD ^{70,73}, entretanto, observou-se que HY foi mais eficiente na indução da morte celular

comparando com a CUR nas mesmas condições de dose de luz, tempo de incubação e concentrações do FS ($2 \times IC_{50}$).

Figura 19. Porcentagens de células apoptóticas e necróticas da HEP-2 após a TFD.

4.10 Comparação da eficiência fotodinâmica da Hipericina e da Curcumina

A Tabela 6 mostra uma comparação dos resultados obtidos para HY e CUR nos experimentos. Pode-se observar que em geral a HY mostrou-se mais eficiente em relação a CUR. Em recente revisão publicada por Yin *et al.* sobre os efeitos terapêuticos da CUR, foi destacada a eficiência desses dois compostos naturais, HY e CUR na fotoinativação dos microrganismos ¹²¹. Essa revisão menciona que a CUR, além de ser um composto de fácil acesso na natureza, é considerada como alimento, condimento e conservante natural ¹¹⁴, em vista disso, a sua aplicação na TFD é bastante investigada, apesar da baixa geração de oxigênio singlete quando ativada pela luz azul. O uso da CUR como FS nos tratamentos de infecções e lesões superficiais é altamente indicado, pois, embora o comprimento de onda da luz azul não seja penetrante nos tecidos, ele é mais energético que a luz amarela (no caso da HY) e é utilizado em vários protocolos de tratamento antimicrobiano contra micose, acne e infecção ^{122; 123}. Dessa forma, os dados obtidos neste trabalho demonstraram que a CUR possui atividade fotodinâmica para geração de oxigênio singlete que

potencializa mais ainda o efeito terapêutico de tratamentos convencionais feitos somente com a luz azul, sendo que vários trabalhos na literatura obtiveram resultados positivos aplicando a CUR-TFD contra microrganismos patológicos^{124; 125}.

Tabela 10. Comparação da HY com CUR: Absortividade molar, fotodegradação, coeficiente de partição em octanol-água (LogP), eficiência fotodinâmica, concentração inibitória média (IC₅₀) e tipo de morte celular.

Experimentos	Hipericina	Curcumina
Absortividade molar ($\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	2,34 ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$)	5,89 ($\lambda_{\text{max}} = 455 \text{ nm}$)
Fotodegradação (t= 30 min)	20%	54%
Formação de fotoproducto	Não	Sim
Citotoxicidade do fotoproducto	---	Diminui em função do tempo de irradiação
Log P	0,48 (anfifílico)	2,12 (lipofílico)
Atividade fotodinâmica ($\text{m}^2 \text{ J}^{-1}$)	7,5	1,26
Cinética de acumulação intracelular	rápido	lento
IC₅₀ em HEp-2 (escuro/claro) $\mu\text{mol mL}^{-1}$	19,5 / 0,044	95,3 / 11,7
IC₅₀ em Vero (escuro/claro) $\mu\text{mol mL}^{-1}$	22,3 / 0,07	101,9 / 16,2
% Apoptose	100%	66%

5. CONCLUSÕES

Os estudos das propriedades físicas e químicas dos FSs serviram como suporte para comparar a eficiência fotodinâmica dos compostos. Embora a HY tenha menor absortividade molar que a CUR, a HY é mais estável na presença de luz e não forma fotoprodutos, o que sugere que a molécula permanece íntegra. Além disso, a característica anfifílica da HY permite a melhor difusão celular. Ao contrário da CUR que é uma molécula muito hidrofóbica.

O ensaio de fotoxidação do ácido úrico permitiu concluir que a HY tem atividade fotodinâmica cerca de seis vezes maior que a CUR. Porém, em meio aquoso sem surfactante, os dois FSs não possuem atividade fotodinâmica, devido à agregação.

A rápida fotodegradação da CUR acarretou a brusca diminuição da banda de absorção espectral e o crescimento de uma nova banda, sugerindo a formação de fotoproduto. Pela primeira vez foi investigada a citotoxicidade da CUR fotodegradada com luz azul. A curcumina torna-se menos citotóxica quanto maior o tempo de irradiação, sugerindo progressiva fotodegradação da molécula.

Quanto à citotoxicidade HY foi quase 400 vezes mais citotóxica em relação a sua citotoxicidade no escuro. Já para CUR, a luz potencializou apenas oito vezes a citotoxicidade para as células tumorais HEP-2. HY apresentou IC₅₀ cerca de 250 vezes mais baixo que a CUR no escuro e também sob irradiação na mesma fluência de luz. Esses resultados sugerem que HY é muito mais citotóxica do que a CUR.

Através da microscopia Confocal de fluorescência, pode ser observado que a HY acumula mais rápido do que a CUR nas células HEP-2. além disso, a HY-TFD induziu cerca de 1,5 vezes mais apoptose do que a CUR-TFD.

Baseando-se neste estudo comparativo, os resultados obtidos sugerem que a HY é um FS mais eficiente para TFD que a CUR. Tanto a CUR quanto a HY por apresentar baixa toxicidade na ausência de luz, são compostos seguros para serem utilizados clinicamente, cada um com suas aplicações adequadas às suas propriedades.

6. REFERÊNCIAS

- ¹ SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell cycle targeted cancer therapies. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, n. 1, 2016.
- ² STEWART, B. W.; KLEIHUES, P. (Eds.). **World cancer report**. Lyon: IARC Press, 2003. Disponível em: <<https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/WorldCancerReport.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2016.
- ³ GRUTTERS, J. P. et al. Comparison of the effectiveness of radiotherapy with photons, protons and carbon-ions for non-small cell lung cancer: a meta-analysis. **Radiotherapy and Oncology**, v. 95, n. 1, p. 32-40, 2010.
- ⁴ ADELSTEIN, D. J. et al. Docetaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy followed by accelerated fractionation/concomitant boost radiation and concurrent cisplatin in patients with advanced squamous cell head and neck cancer: A Southwest Oncology Group phase II trial (S0216). **Head Neck**, v. 32, 2010.
- ⁵ KAYL, A. E.; MEYERS, C. A. Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 18, n. 1, p. 24-28, 2006.
- ⁶ SCHNEIDER, T. et al. Immune response after radiofrequency ablation and surgical resection in non-small cell lung cancer. **Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 28, n. 2, p. 585-592, 2016.
- ⁷ SIEGEL, R. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. **Ca-a Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 4, p. 220-241, Jul./Aug. 2012.
- ⁸ SHARMA, S. K. et al. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? **Israel Journal of Chemistry**, v. 52, n. 8-9, p. 691-705, Sep. 2012.
- ⁹ DABROWSKI, J. M.; ARNAUT, L. G. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: from local to systemic treatment. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1765-1780, 2015.
- ¹⁰ ALLISON, R. R. Photodynamic therapy: oncologic horizons. **Future Oncology**, v. 10, n. 1, p. 123-124, 2014.
- ¹¹ TEGOS, G. et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-16, 2012.
- ¹² ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, MICHAEL R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.
- ¹³ CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular

localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

¹⁴ ROBERTSON, C.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.

¹⁵ LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chemical reviews**, v. 115, n. 4, p. 1990-2042, 2015.

¹⁶ WANG, W.; MORIYAMA, L. T.; BAGNATO, V. S. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT. **Laser Physics Letters**, v. 10, n. 2, p. 1-8, 2013.

¹⁷ FARNSWORTH, R. H. et al. Vascular remodeling in cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 27, p. 3496-3505, 2014.

¹⁸ YANG, S. Q.; ZHAO, J. K.; SUN, X. D. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. **Drug Design Development and Therapy**, v. 10, p. 1857-1867, 2016.

¹⁹ ZHENG, Y. et al. Photodynamic-therapy activates immune response by disrupting immunity homeostasis of tumor cells, which generates vaccine for cancer therapy. **International journal of biological sciences**, v. 12, n. 1, p. 120-132, 2016.

²⁰ GOLLNICK, S. O.; VAUGHAN, L.; HENDERSON, B. W. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. **Cancer research**, v. 62, n. 6, p. 1604-1608, 2002.

²¹ BERNAL, C. et al. Selective photoinactivation of *C. albicans* and *C. dubliniensis* with hypericin. **Laser Physics**, v. 21, n. 1, p. 245-249, Jan. 2011.

²² DOVIGO, L. N. et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 243-251, Apr. 2013.

²³ TARSTEDT, M. et al. Aminolevulinic acid and methyl aminolevulinate equally effective in topical photodynamic therapy for non-melanoma skin cancers. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 3, p. 420-423, Mar. 2016.

²⁴ CHOI, Y. M.; ADELZADEH, L.; WU, J. J. Photodynamic therapy for psoriasis. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 26, n. 3, p. 202-207, June 2015.

²⁵ PARMEGGIANI, F. et al. Effect of factor XIII-A G185T polymorphism on visual prognosis after photodynamic therapy for neovascular macular degeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 19796-19811, Aug. 2015.

- 26 KRAMMER, B.; VERWANGER, T. Photodynamic therapy. In: BERGAMINI, G.; SILVI, S. (Ed.). **Applied Photochemistry**: when light meets molecules. Cham: Springer, 2016. p. 377-396. (Lecture notes in chemistry, v. 92).
- 27 BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 3, p. 173-186, 2002.
- 28 ENK, C. D.; LEVI, A. Low-irradiance red LED traffic lamps as light source in PDT for actinic keratoses. **Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine**, v. 28, n. 6, p. 332-334, Dec. 2012.
- 29 HARRIS, D. C.; BERTOLUCCI, M. D. **Symmetry and spectroscopy**: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy. [S.l.]: Courier Corporation, 1978.
- 30 BONNETT, R.; MARTÍNEZ, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, n. 47, p. 9513-9547, 2001.
- 31 HUANG, Z. et al. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors - potential and technical challenges. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 7, n. 4, p. 309-320, Aug. 2008.
- 32 GEORGAKOUDI, I.; FOSTER, T. H. Singlet oxygen- versus nonsinglet oxygen-mediated mechanisms of sensitizer photobleaching and their effects on photodynamic dosimetry. **Photochemistry and Photobiology**, v. 67, n. 6, p. 612-625, June 1998.
- 33 ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T.; ROTHSCHILD, Z. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Edusp, 2003. v. 4.
- 34 DELUCIA, Roberto; PLANETA, Cleopatra S.; DE OLIVEIRA FILHO, Ricardo M. Capítulo 1 Noções Básicas da Farmacologia. **Farmacologia Integrada**, p. 11, 2016..
- 35 FISCHER, F. et al. A Chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n. 1, p. 89-104, 1998.
- 36 BOYLE, R. W.; DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n. 3, p. 469-485, Sept. 1996.
- 37 HUNTER, C. A.; SANDERS, J. K. The nature of. pi.-. pi. interactions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 14, p. 5525-5534, 1990.
- 38 KESSEL, D. The role of low-density lipoprotein in the biodistribution of photosensitizing agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n. 3, p. 261-262, 1992.

- 39 HEBERT, P. R. et al. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality - An overview of randomized trials. **Journal of the American Medical Association**, v. 278, n. 4, p. 313-321, July 1997.
- 40 FRESHNEY, R. I. Culture of tumor cells. In: _____. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. p.463-479.
- 41 CELL ENVIRONMENTAL SYSTEMS. **Cell culture system**. Eric S. Berry, Bernard R. Danti. US4661458 A, 28 abr. 1987.
- 42 EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v. 130, n. 3373, p. 432-437, 1959.
- 43 VROUENRAETS, M. B. et al. Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. **Anticancer Research**, v. 23, n. 1B, p. 505-522, Jan./Feb. 2003.
- 44 FRESHNEY, R. I. Cytotoxicity. In: _____. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. p. 365-381.
- 45 CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three - photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.
- 46 GRIVICICH, Ivana et al. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007..
- 47 ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- 48 HENGARTNER, M. O. The Biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.
- 49 OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2002.
- 50 ABBAS, A. K.; KUMAR, V.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran-Patologia: patologia: bases patológicas das doenças**. Tradução Maria da Conceição Zacharias. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- 51 AGOSTINIS, P. et al. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, n. 3, p. 221-241, Mar. 2002.

- 52 GUEDES, R. C.; ERIKSSON, L. A. Theoretical study of hypericin. **Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry**, v. 172, n. 3, p. 293-299, June 2005.
- 53 JENDZELOVSKA, Z. et al. Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-20, May 2016.
- 54 CHEN, B.; DE WITTE, P. A. Photodynamic therapy efficacy and tissue distribution of hypericin in a mouse P388 lymphoma tumor model. **Cancer Letters**, v. 150, n. 1, p. 111-117, 2000.
- 55 BERNAL, C. et al. Photodynamic efficiency of hypericin compared with chlorin and hematoporphyrin derivatives in HEP-2 and Vero epithelial cell lines. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 2, p. 176-185, 2015.
- 56 SAW, C. L. L.; HENG, P. W. S.; OLIVO, M. Potentiation of the photodynamic action of hypericin. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 27, n. 1, p. 22-33, 2008.
- 57 BUYTAERT, E. et al. Molecular effectors and modulators of hypericin-mediated cell death in bladder cancer cells. **Oncogene**, v. 27, n. 13, p. 1916-1929, Mar. 2008.
- 58 LAFFERS, W. et al. Photosensitizing effects of hypericin on head neck squamous cell carcinoma in vitro. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 272, n. 3, p. 711-718, 2015.
- 59 LIN, S. et al. Enhancement of oxaliplatin sensitivity in human colorectal cancer by hypericin mediated photodynamic therapy via ROS-related mechanism. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 71, p. 24-34, Feb. 2016.
- 60 BARATHAN, M. et al. Hypericin-photodynamic therapy leads to interleukin-6 secretion by HepG2 cells and their apoptosis via recruitment of BH3 interacting-domain death agonist and caspases. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 6, p. 1-10, June 2013.
- 61 MORITZ, M. N. et al. Semi-synthesis and PDT activities of a new amphiphilic chlorin derivative. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 17, p. 39-47, Mar. 2016.
- 62 XU, Y. et al. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces apoptosis in K562 human leukemia cells through JNK pathway modulation. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 5, p. 6475-6482, 2015.
- 63 MIRMALEK, S. A. et al. Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of *Hypericum perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Cancer Cell International**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2016.

- 64 KLEEMANN, B. et al. St John's wort *Hypericum perforatum* L. photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1-20, 2014.
- 65 XU, C. S.; LEUNG, A. W. N. Light-activated hypericin induces cellular destruction of nasopharyngeal carcinoma cells. **Laser Physics Letters**, v. 7, n. 1, p. 68-72, Jan. 2010.
- 66 THEODOSSIOU, T. A. et al. The Multifaceted photocytotoxic profile of hypericin. **Molecular Pharmaceutics**, v. 6, n. 6, p. 1775-1789, Nov./ Dec. 2009.
- 67 MUKHERJEE, P. et al. Accumulation and interaction of hypericin in low-density lipoprotein - a photophysical study. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 3, p. 706-712, May/June 2008.
- 68 KARIOTI, A.; BILIA, A. R. Hypericins as potential leads for new therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 562-594, Feb. 2010.
- 69 VANTIEGHEM, A. et al. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis - involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. **Febs Letters**, v. 440, n. 1-2, p. 19-24, Nov. 1998.
- 70 VOGEL, H.; PELLETIER, J. Curcumin-biological and medicinal properties. **J. Pharma**, v. 2, n. 50, p. 24, 1815.
- 71 NAGABHUSHAN, M.; BHIDE, S. Curcumin as an inhibitor of cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 11, n. 2, p. 192-198, 1992.
- 72 DUJIC, J. et al. Low concentrations of curcumin induce growth arrest and apoptosis in skin keratinocytes only in combination with UVA or visible light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 8, p. 1992-2000, 2007.
- 73 BANERJEE, S. et al. Remarkable photocytotoxicity of curcumin in HeLa cells in visible light and arresting its degradation on oxovanadium(IV) complex formation. **Chemical Communications**, v. 48, n. 62, p. 7702-7704, 2012.
- 74 ELLERKAMP, V. et al. Photodynamic therapy potentiates the effects of curcumin on pediatric epithelial liver tumor cells. **Anticancer Research**, v. 36, n. 7, p. 3363-3372, July 2016.
- 75 ABUELBA, H. et al. In vitro evaluation of curcumin effects on breast adenocarcinoma 2D and 3D cell cultures. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 56, n. 1, p. 71-76, 2015.
- 76 LIN, H. Y. et al. Demethoxycurcumin induces autophagic and apoptotic responses on breast cancer cells in photodynamic therapy. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 439-449, Jan. 2015.

- 77 KOON, H. K. et al. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cell. **Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 205-215, 2006.
- 78 BERND, A. Visible light and/or UVA offer a strong amplification of the anti-tumor effect of curcumin. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 183-189, Mar. 2014.
- 79 CHEJUI, C. K. et al. Low concentrations of curcumin in combination with UVA reduce collagen expression in human skin fibroblasts. **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 3, p. E7-E7, Mar 2013.
- 80 BUSS, S. et al. Visible Light Is a Better Co-Inducer of Apoptosis for Curcumin-Treated Human Melanoma Cells than UVA. **Plos One**, v. 8, n. 11, p. 1-8, Nov. 2013.
- 81 PARK, K.; LEE, J. H. Photosensitizer effect of curcumin on UVB-irradiated HaCaT cells through activation of caspase pathways. **Oncology Reports**, v. 17, n. 3, p. 537-540, Mar. 2007.
- 82 YAN, D. J.; GEUSZ, M. E.; JAMASBI, R. J. Properties of Lewis Lung carcinoma cells surviving curcumin toxicity. **Journal of Cancer**, v. 3, n. 1, p. 32-41, 2012.
- 83 SINGH, S. P.; SHARMA, M.; GUPTA, P. K. Enhancement of phototoxicity of curcumin in human oral cancer cells using silica nanoparticles as delivery vehicle. **Lasers in Medical Science**, v. 29, n. 2, p. 645-652, Mar. 2014.
- 84 TØNNESEN, H. H.; KARLSEN, J.; VAN HENEGOUWEN, G. B. Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 183, n. 2, p. 116-122, 1986.
- 85 WANG, Y.-J. et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 15, n. 12, p. 1867-1876, 1997.
- 86 SCHNEIDER, C. et al. Degradation of curcumin: from mechanism to biological implications. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7606-7614, Sept. 2015.
- 87 ZHANG, H. S. et al. Synthesis and characterization of curcumin-incorporated glycopolymers with enhanced water solubility and reduced cytotoxicity. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 8, p. 655-662, Aug. 2016.
- 88 CHOI, J. S. Development of surface curcumin nanoparticles modified with biological macromolecules for anti-tumor effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 850-859, Nov. 2016.
- 89 BRUZELL, E. M.; MORISBAK, E.; T NNESEN, H. H. Studies on curcumin and curcuminoids. XXIX. Photoinduced cytotoxicity of curcumin in selected aqueous

preparations. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 4, n. 7, p. 523-530, 2005.

⁹⁰ WAN, K. et al. Novel nanoemulsion based lipid nanosystems for favorable in vitro and in vivo characteristics of curcumin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 504, n. 1-2, p. 80-88, May 2016.

⁹¹ CHOI, J.-S. Development of surface curcumin nanoparticles modified with biological macromolecules for anti-tumor effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 850-859, 2016.

⁹² FALK, H.; MEYER, J.; OBERREITER, M. A Convenient semisynthetic route to hypericin. **Monatshefte für Chemie**, v. 124, n. 3, p. 339-341, 1993.

⁹³ POOLER, J. P.; VALENZENO, D. P. Physicochemical determinants of the sensitizing effectiveness for photooxidation of nerve membranes by fluorescein derivatives. **Photochemistry and photobiology**, v. 30, n. 4, p. 491-498, 1979.

⁹⁴ KĘPCZYŃSKI, M. et al. Do Liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water?. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, n. 2, p. 127-134, 2002.

⁹⁵ FRESHNEY, R. I. Subculture and cell lines. In: _____. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2010. p.187-206.

⁹⁶ MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in cell biology**, v. 46, p. 153-185, 1995.

⁹⁷ JASIM, F.; ALI, F. Measurements of some spectrophotometric parameters of curcumin in 12 polar and nonpolar organic solvents. **Microchemical journal**, v. 39, n. 2, p. 156-159, 1989.

⁹⁸ NA T-SI, Y.; FOURNERON, J.-D. Hypericin and pseudohypericin. Purity criteria and quantitative determination in extracts of Saint John's Wort (*Hypericum perforatum*). **Monatshefte für Chemie**, v. 135, n. 10, p. 1319-1326, 2004.

⁹⁹ WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in medicine and biology**, v. 53, n. 9, p. R61-R109, 2008.

¹⁰⁰ AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.

¹⁰¹ FUJISAWA, S. et al. Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds. **Anticancer Research**, v. 24, n. 2B, p. 563-570, 2004.

- 102 HUYGENS, A.; KAMUHABWA, A. R.; DE WITTE, P. A. M. Stability of different formulations and ion pairs of hypericin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, n. 3, p. 461-468, Apr. 2005.
- 103 LIU, X. et al. Evaluation of hypericin: effect of aggregation on targeting biodistribution. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 1, p. 215-222, Jan. 2015.
- 104 KUBIN, A. et al. Hypericin-the facts about a controversial agent. **Current pharmaceutical design**, v. 11, n. 2, p. 233-253, 2005.
- 105 CHOWDHARY, R. K. et al. Correlation of photosensitizer delivery to lipoproteins and efficacy in tumor and arthritis mouse models; comparison of lipid-based and Pluronic P123 formulations. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 198-204, 2003.
- 106 FAN, C. et al. Effect of curcumin on the expression of LDL receptor in mouse macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 251-254, 2006.
- 107 ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, v. 6, n. 3, p. 817-840, 2013.
- 108 RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA JR, A.; TAVARES, L. C. Micellar solubilization of drugs. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 147-163, 2005.
- 109 THEODOSSIOU, T. et al. Evidence for intracellular aggregation of hypericin and the impact on its photocytotoxicity in PAM 212 murine keratinocytes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, n. 3, p. 438-443, 2004.
- 110 MADURAY, K.; DAVIDS, L. The anticancer activity of hypericin in photodynamic therapy. **Journal of Bioanalysis & Biomedicine**, v. 6, p. 1-3, 2011.
- 111 VANDENBOGAERDE, A. L. et al. Differential cytotoxic effects induced after photosensitization by hypericin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 38, n. 2-3, p. 136-142, 1997.
- 112 SAW, C. L. L. et al. Delivery of hypericin for photodynamic applications. **Cancer Letters**, v. 241, n. 1, p. 23-30, Sept. 2006.
- 113 SCHMITT, L. A. et al. Reduction in hypericin-induced phototoxicity by *Hypericum perforatum* extracts and pure compounds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, n. 2, p. 118-130, 2006.
- 114 NOORAFSHAN, A.; ASHKANI-ESFAHANI, S. A Review of therapeutic effects of curcumin. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 11, p. 2032-2046, 2013.
- 115 BASNET, P.; SKALKO-BASNET, N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4567-4598, 2011.

- ¹¹⁶ CORREA, J. et al. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. **Laser Physics**, v. 22, n. 9, p. 1387-1394, 2012.
- ¹¹⁷ ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 1, p. 27-42, 2004.
- ¹¹⁸ ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Oncologic photodynamic therapy: clinical strategies that modulate mechanisms of action. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 4, p. 331-341, Dec. 2013.
- ¹¹⁹ RITZ, R. et al. In vitro comparison of hypericin and 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX for photodynamic inactivation of medulloblastoma cells. **Plos One**, v. 7, n. 12, p. 1-11, 2012.
- ¹²⁰ KUNWAR, A. et al. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1780, n. 4, p. 673-679, 2008.
- ¹²¹ YIN, R.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photosensitizers: drug discovery under the spotlight. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 2159-2185, 2015.
- ¹²² GOLD, M. et al. A Multicenter clinical evaluation of the treatment of mild to moderate inflammatory acne vulgaris of the face with visible blue light in comparison to topical 1% clindamycin antibiotic solution. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 4, n. 1, p. 64-70, 2004.
- ¹²³ ZHOU, B. **Treatment of fungal infection by light irradiation**. US20120310307 A1, 20 dez. 2012.
- ¹²⁴ QUISHIDA, C. C. C. et al. Photodynamic inactivation of a multispecies biofilm using curcumin and LED light. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 997-1009, 2016.
- ¹²⁵ DOVIGO, L. N. et al. Susceptibility of clinical isolates of Candida to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in surgery and medicine**, v. 43, n. 9, p. 927-934, 2011.