

Quimiluminescência como fonte de luz alternativa na terapia fotodinâmica

Chemiluminescence as an alternative light source for photodynamic therapy

Ruy C.M.C. Ferraz¹, Carla R. Fontana¹, Ana P. de Ribeiro², Flávia Z. Trindade², Emery C. Lins³, Vanderlei S. Bagnato¹ e Cristina Kurachi¹

¹Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP) – São Carlos (SP), Brasil.

²Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Araraquara (SP), Brasil.

³Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas (CECS) da Universidade Federal do ABC (UFABC) – Santo André (SP), Brasil.

Resumo

A terapia fotodinâmica é a combinação do agente fotossensibilizador, da fonte de luz e do oxigênio que pode resultar na oxidação de biomoléculas e gerar danos celulares. Essa técnica é aplicada em diversas situações, desde o controle microbiológico até o tratamento de câncer. A maioria dos estudos utiliza as fontes de luz tradicionais, ou seja, *lasers*, sistemas à LED e lâmpadas. Iluminação portátil, flexível e independente de energia elétrica são características de grande interesse, principalmente, aos países em desenvolvimento no qual há uma grande parcela da população não assistida por hospitais de referência, além de cidades que não possuem o fornecimento de energia elétrica. Neste estudo, foi avaliada a viabilidade do uso, *in vitro*, da quimiluminescência como uma fonte de luz para a terapia fotodinâmica, induzindo a redução microbiana de *Staphylococcus aureus*. A quimiluminescência é uma reação química em que, por meio da mistura de reagentes líquidos, ocorre a emissão de luz sem a necessidade de qualquer ativação externa. Na análise *in vitro*, o agente fotossensível foi utilizado em quatro concentrações entre 6 e 75 µg/mL e iluminação entre 60 até 240 minutos. Os resultados demonstraram que o longo tempo de experimento não gerou redução microbiana nos grupos em que foi avaliado o efeito isolado da fonte de luz e do fotossensibilizador. Porém, quando foi avaliado o efeito fotodinâmico na combinação da reação química e o fotossensibilizador, atingiu-se redução da bactéria próxima de 98% (redução de duas ordens logarítmicas, aproximadamente) nas maiores concentrações de Photogem® e de dose de luz aplicada. Este estudo demonstrou a possibilidade do uso da quimiluminescência como uma fonte de luz alternativa no controle microbiano por meio do efeito fotodinâmico, além de apresentar as vantagens de irradiação portátil, flexível entre outras quando comparada com as fontes de luz convencionais.

Palavras-chave: medições quimiluminescentes; fotoquimioterapia; luz.

Abstract

Photodynamic therapy is a combined action of the photosensitizer, a light source and the oxygen that may result in an oxidation of biomolecules and cellular damage. This technique is used for several applications, from microbial control to cancer treatment. The majority of the studies use conventional light sources as lasers, LED systems and lamps. Portable, flexible and non-wired illumination are desired characteristics especially for developing countries where still great part of the population is not assisted by hospitals and several regions do not have electricity. In this study, the viability of chemiluminescence use a PDT light source was evaluated in the *in vitro* microbial reduction of *Staphylococcus aureus*. Chemiluminescence is a chemical reaction where after the reagents mixture a light emission occurs. The photosensitizer was tested at four concentrations between 6 and 75 µg/mL and illumination at exposure times between 60 and 240 minutes. The results showed that the experiment long procedure did not result in microbial reduction, which was verified at the individual effect of light and of photosensitizer. On the other hand, the photodynamic effect produced by the combination of the photosensitizer and chemiluminescence resulted in 98% microorganism reduction for the higher Photogem® concentrations and light dose. This study shows the viability of the chemiluminescence as a light source for the microbial control by PDT, associated with the characteristics of a portable and flexible illumination device.

Keywords: chemiluminescent measurements; photochemotherapy; light.

Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica utilizada em diversas práticas desde o tratamento de câncer até o controle microbiano. Muitos avanços são observados nas últimas décadas, porém desde o início do século passado o efeito fotodinâmico já era conhecido¹⁻³.

A base dessa técnica é a presença de três elementos fundamentais: fotossensibilizador, fonte de luz e oxigênio. O fotossensibilizador (FS) é uma substância capaz de se tornar ativa apenas após a absorção de fótons nas condições de iluminação. O agente fotossensível ativo (excitado) tende a retornar ao seu estado fundamental, sendo necessária a liberação da energia absorvida. Essa energia liberada pode ser absorvida por alguns substratos, entre eles, o oxigênio tornando-se uma espécie altamente reativa e de meia-vida curta.

Os outros substratos ativados são, por exemplo, superóxidos e radicais livres, porém a produção do oxigênio singlete é um dos principais fatores no sucesso da terapêutica⁴⁻⁷.

As fontes de luz tradicionalmente utilizadas na TFD são, entre outras, as lâmpadas, lasers e sistemas à base de diodo emissor de luz (LED). Apesar das inúmeras vantagens, ainda existe casos em que as fontes de luz convencionais se mostram bastante limitadas, como por exemplo, dependência de energia elétrica, ou seja, a maioria desses aparelhos está limitada pela não total portabilidade⁸.

Essas desvantagens são potencializadas em países em desenvolvimento, como o Brasil, que possuem muitas cidades com escassez ou sem fornecimento de energia elétrica, além da concentração de centros hospitalares nas grandes cidades e por consequência, as populações das outras cidades possuem um atendimento deficitário.

Dessa maneira, este trabalho demonstrou o interesse de verificar a potencialidade de fontes alternativas de luz com a finalidade de simplificar e ampliar o uso da terapia fotodinâmica. Assim, apresentamos o princípio básico de funcionalidade da quimiluminescência (QL), uma fonte de luz baseada em reações químicas na forma líquida sem geração de calor. Quando os reagentes se misturam ocorre a geração de luz portátil, prática, maleável e adequada para a TFD.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro*, a viabilidade do uso da quimiluminescência como fonte de luz da Terapia Fotodinâmica analisando a redução bacteriana de cepas de *Staphylococcus aureus*.

Material e métodos

O fotossensibilizador utilizado neste estudo foi o Photogem[®], classificado como um representante da primeira geração dos fotossensibilizadores, produzido a partir da hematoporfirina, uma substância presente no sangue

de animais e de humanos. O Photogem[®] é fabricado na Rússia – Moscou . O Photogem[®] foi avaliado em quatro concentrações: 6; 25; 50 e 75 µg/mL. Todo o procedimento experimental, entre a diluição do FS até o início do experimento *in vitro*, o fotossensibilizador foi protegido da exposição de luz.

A fonte de luz utilizada na iluminação das amostras se deu através da quimiluminescência cujo mecanismo foi descrito por Rauhut⁹ em 1967 e aceito até os dias atuais, associa os seguintes reagentes: oxalato de bis(2,4,6-triclorofenila) (TCPO), associado à presença do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de um ativador (ACT), no caso, 9,10-bis(feniletinil) antraceno (BPEA). Essa reação ocorre em solução de imidazol (IMI-H) e acetato de etila (EtOAc). Quando as reações do mecanismo de quimiluminescência terminam, o ACT está em seu estado eletronicamente excitado que, por sua vez, é instável e dessa maneira retorna ao estado fundamental emitindo luz ao ambiente⁴.

Foi utilizada uma reação química industrializada (Light Stick Ltd., Pequim, China) que foi caracterizada com um tempo de meia-vida (T_{1/2}) de 30 minutos, com intensidade hábil de utilização até a sua segunda T_{1/2} (totalizado 60 minutos). A intensidade irradiada por uma hora atinge intensidade média de 100 µW/cm². Foram utilizados 30 mL da solução, resultando em trinta unidades de light stick, colocados em um recipiente circular (placa Petri pequena) com as dimensões de 5,0cm de diâmetro e 1,5cm de altura. A área iluminada abrange 20 well-plates ao mesmo tempo de uma placa de 96 well-plates.

O microrganismo selecionado para execução deste estudo foi *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, Seattle, EUA) sendo o agente mais comum de infecções piogênicas (por bactérias) no ser humano, causando grande variedade de infecções. Ao final do procedimento foram obtidas suspensões celulares, em solução salina, padronizadas em uma mesma concentração celular (10⁶ células/mL) por meio de um sistema de espectrofotômetro no comprimento de onda em 600nm. (BioPhotometer, LeightLichtstrahlone, Alemanha).

Foram testadas as condições experimentais, obtidas a partir do cruzamento das concentrações de Photogem[®] avaliadas e a quimiluminescência com três tempos de iluminação, 60, 120 e 240 minutos, fornecendo doses de 0,2; 0,4 e 0,8J/cm², respectivamente.

Estas condições experimentais foram testadas da seguinte maneira: Grupo 1 sem fotossensibilizador e sem luz (FS-QL-); Grupo 2 apenas luz (FS-QL+); Grupo 3 apenas fotossensibilizador (FS+QL-) e Grupo 4 efeito fotodinâmico (FS+QL+). Para todas as condições avaliadas, foram realizadas diluições seriadas (10³; 10⁴; 10⁵ e 10⁶) a partir das amostras contidas nos orifícios das placas. Os procedimentos de semeadura foram realizados em triplicatas.

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas de Petri referentes às amostras das condições experimentais avaliadas foram submetidas à contagem de colônias.

Neste trabalho não foi avaliado o rendimento de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO's).

Resultados

Os resultados obtidos no Grupo 1 demonstraram que o microorganismo sobreviveu em todas as condições avaliadas e não foi observado nenhuma redução microbiana.

No Grupo 2 também foi observado o mesmo comportamento descrito anteriormente, ou seja, apenas a presença de luz da quimiluminescência não foi capaz de interferir do desenvolvimento da *S. aureus*.

Quando foi avaliado apenas o efeito do fotossensibilizador (Grupo 3) sobre o microorganismo verificou-se que a maior redução bacteriana observada foi de 22,6% em 240 minutos de experimento e na maior concentração (75 µg/mL) de fotossensibilizador utilizada, como é possível observar na Tabela 1.

Esse valor se torna menos expressivo quando é comparado com os resultados dos experimentos de terapia fotodinâmica (Grupo 4). Enquanto a redução microbiana foi de 22,6% no Grupo 3, no grupo TFD (nas mesmas condições) obteve-se o valor de 98% de redução.

A Figura 1 apresenta os resultados dos 4 grupos analisados no tempo de experimento igual a 240 minutos. O valor de 300 unidades formadoras de colônias (UFC) representa 0% de redução microbiana e, consequentemente, 100% de redução equivale a UFC = 0.

Discussão e conclusões

Por meio desses resultados pode-se observar que, mesmo em tempos prolongados de experimento, apenas a presença do fotossensibilizador não é suficiente para ocorrer uma redução bacteriana, relativamente, suficiente.

No caso em que apenas a luz da quimiluminescência esteve (grupo FS-QL+), permite a conclusão de que apenas o fator luz, nos parâmetros utilizados, não gera nenhuma redução bacteriana.

Já o grupo FS-QL- indica fielmente que não houve redução bacteriana devido ao simples ato do procedimento, não ocorrendo redução bacteriana por efeito de temperatura e nem por falta de nutrientes durante todos os tempos da metodologia analisada.

Dessa maneira, conclui-se que apenas no grupo, no qual, havia fotossensibilizador e a luz da quimiluminescência (grupo que foi realizado a terapia fotodinâmica) ocorreu a redução bacteriana em grande proporções, similar a outros estudos que utilizam fontes tradicionais como o laser e os LED's.

Portanto, a utilização da quimiluminescência como fonte de luz externa na redução bacteriana *in vitro* com terapia fotodinâmica é viável e com possibilidades de avanços e outras aplicações na área de TFD.

Tabela 1. Resultados da redução bacteriana (RB) do grupo 3 em todos os tempos pesquisados.

FS (µg/mL)	QL (min)	RB (%)
0	60	0
	120	0
	240	0
6	60	0
	120	0
	240	0
25	60	0
	120	0
	240	0
50	60	2,6
	120	3,6
	240	16
75	60	3,6
	120	13,6
	240	22,6

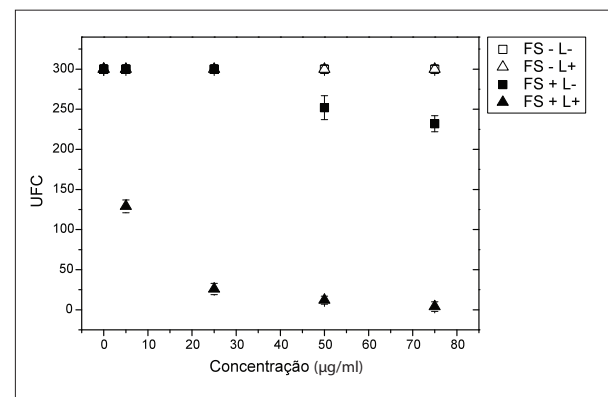


Figura 1. Unidades formadoras de colônias (UFC) em função da concentração (µg/mL) de fotossensibilizador.

Desta maneira, surge a possibilidade de diversas aplicações da TFD de maneira simplificada pois a quimiluminescência, como uma fonte de luz alternativa agrega valor a técnica em muitas vertentes, como por exemplo, a independência da energia elétrica e mobilidade ao procedimento. A quimiluminescência é um conjunto de reagentes líquidos e assim surge a possibilidade também de elaborar dispositivos anatômicos e altamente customizados a cada futura aplicação.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Unesp), ao Instituto Nacional de Óptica e Fotônica (Inof) e ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

1. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochem Photobiol Sci.* 2002;1(1):1-21.
2. Bagnato VS. *Novas técnicas ópticas para a área da saúde.* São Paulo: Livraria da Física, 2008.
3. Seshadri M, Bellnier DA, Vaughan LA, Spenyak JA, Mazurchuk R, Foster TH, et al. Light delivery over extended time periods enhances the effectiveness of photodynamic therapy. *Cancer Preclinical.* 2008;14 (9):2796-805.
4. Bisland SK, Goebel EA, Hassanali NS, Johnson C, Wilson BC. Increased expression of mitochondrial benzodiazepine receptors following low-level light treatment facilitates enhanced protoporphyrin IX production in glioma-derived cells in vitro. *Lasers Surg Med.* 2007;39(8):678-84.
5. Bisland SK, Lilge L, Lin A, Rusnov R, Wilson BC. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Phot Phot.*2004;(80):22-30.
6. Tsutsui H, MacRobert AJ, Curnow A, Rogowska A, Buinaccorsi G, Kato H, et al. Optimisation of illumination for photodynamic therapy with mTHPC on normal colon and a transplantable tumour in rats. *Lasers Med Sci.* 2002;17(2):101-9.
7. Babilas P, Schacht V, Liebsch G, Wolfbeis OS, Landthaler M, Szeimies RM, et al. Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo. *Br J Cancer.* 2003;88(9):1462-9.
8. Brancaleon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2002;17(3):173-86.
9. Rauhut MM, Bollyky LJ, Roberts BG, Loy M, Whitman RH, Iannotta AV, et al. Chemiluminescence from reactions of electronegatively substituted aryl oxalates with hydrogen peroxide and fluorescent compounds. *JAm Chem Soc.* 1967;6:6515-22.