

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**TÉCNICAS PARA ACÚMULO EM PLANTAS DE SUBSTÂNCIAS
FOTOSSINTETIZANTES DE USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Agricultura)

BOTUCATU – SP

Junho – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**TÉCNICAS PARA ACÚMULO EM PLANTAS DE SUBSTÂNCIAS
FOTOSSINTETIZANTES DE USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini

Co-orientadores: Dr. Fernando Gustavo Tonin

Dr^a. Maria Lúcia Bueno Trindade

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Agricultura).

BOTUCATU – SP

Junho – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

B234t Barberis, Luis Rodrigo Miyamoto, 1975-
Técnicas para acúmulo em plantas de substâncias fotosintetizantes de uso em terapia fotodinâmica / Luis Rodrigo Miyamoto Barberis. - Botucatu : [s.n.], 2008.
vi, 66 f. : il. color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2008

Orientador: Edivaldo Domingues Velini

Co-orientadores: Fernando Gustavo Tonin

Maria Lúcia Bueno Trindade

Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Antioxidantes. 3. Porfirina e compostos de porfirina. 4. Herbicidas. 5. Fototerapia. I. Velini, Edivaldo Domingues. II. Tonin, Fernando Gustavo. III. Trindade, Maria Lúcia Bueno. IV. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. V. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "TÉCNICAS PARA ACÚMULO EM PLANTAS DE SUBSTÂNCIAS
FOTOSSINTETIZANTES DE USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA"

ALUNO: LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS

ORIENTADOR: PROF. DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI

Aprovado pela Comissão Examinadora


PROF. DR. EDIVALDO DOMINGUES VELINI


PROFª DRª ANA CATARINA CATÁNEO


PROF. DR. ROBINSON ANTÔNIO PITELLI

Data da Realização: 18 de junho de 2008.

A meus pais, Luiz Gonzaga Barberis,

À minha mãe Ione Miyamoto Barberis, avó Toki Miyamoto,

e ao meu irmão Luis Henrique Miyamoto Barberis,

pelo apoio, carinho e compreensão em todos os momentos de minha vida.

OFEREÇO

A Eng^a Agrônoma MSc. Raquel Souza Mattana

Pelo amor, compreensão, apoio

e confiança em meu potencial, além dos sábios ensinamentos e conselhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me proporcionado a oportunidade de obtenção do título de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Edivaldo Domingues Velini, pela oportunidade de realização, orientação, e dedicação dispensada, sempre acreditando em meu potencial durante todo o período de Mestrado.

A Dr^a Maria Lúcia Bueno Trindade pela co-orientação, suporte técnico-científico, e valiosos esforços e contribuições ao longo de todo trabalho.

Ao Dr. Fernando Gustavo Tonin pela co-orientação e auxílios em toda parte laboratorial e analítica.

Aos amigos Caio Antonio Carbonari, Angélica Pitelli, Marcelo Rocha Corrêa e Eduardo Negrisoni, pelos bons momentos de convívio e colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

Aos nossos amigos e técnicos de campo e laboratório, Luiz Marcelo Siono, José Guilherme Cordeiro e José Roberto Marques Silva pelas preciosas colaborações durante a realização dos experimentos.

A todos os funcionários do setor de Agricultura pela ajuda e todas etapas do experimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Agronomia / Agricultura, da Faculdade de Ciências Agronômicas, pela oportunidade e formação.

A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa de estudos concedida.

À BioAtiva - Pesquisas de Compostos Bioativos Ltda e Ecobiotech, pela parceria, suporte, oportunidade e contribuições para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste estudo.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO	6
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1 Determinação dos espectros de absorção de luz dos filtros utilizados.....	19
5.2 Compostos inibidores da protox, precursores e antioxidantes.....	24
5.3 Duração dos períodos de claro ou escuro.....	24
5.4 Espécies e variedades estudadas.....	26
5.5 Substituição da atmosfera com supressão do Oxigênio.....	26
5.6 Testes para definição do método de extração.....	27
5.7 Experimento I.....	28
5.8 Experimento II.....	30
5.9 Experimento III.....	33
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
6.1 Determinação dos espectros de absorção de luz dos filtros utilizados	35
6.2 Compostos inibidores da protox, precursores e antioxidantes.....	38
6.3 Duração dos períodos de claro ou escuro.....	39
6.4 Espécies e variedades estudadas.....	39
6.5 Substituição da atmosfera com supressão do Oxigênio.....	41
6.6 Testes para definição do método de extração.....	42
6.7 Análise conjunta dos compostos.....	43
6.8 Avaliação da mobilidade dos herbicidas e compostos intermediários.....	48
6.9 Experimento I.....	49
6.10 Experimento II.....	50
6.11 Experimento III.....	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
8. CONCLUSÕES.....	58

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
------------------------------------	----

1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver tecnologias para o uso de plantas como unidades de produção ou diretamente como fontes de agentes fotossensibilizantes do Ácido 5-Aminolevulinato (5-ALA), Protoporfirina IX (Proto IX) e precursores destes compostos em plantas. Os experimentos foram conduzidos no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM) – FCA – UNESP - Botucatu/SP, durante o ano de 2007. Foram realizados ensaios para seleção do melhor conjunto de condições para o acúmulo de protoporfirina IX e seus precursores em alface, milho e cana-de-açúcar, cujas variáveis analisadas foram: 1) seleção de comprimentos de onda; 2) duração dos períodos com e sem luz; 3) variedades (11 genótipos); 4) aplicação de antioxidantes (vitaminas C e E); 5) compostos que interferem na síntese de Proto IX (oxyfluorfen, carfentrazone e ácido levulênico); 6) adição de precursores da síntese de Proto IX (glutamato); 7) substituição da atmosfera com supressão do Oxigênio. Os resultados foram analisados sobre a dispersão das médias dos tratamentos em relação às parcelas testemunhas para os tratamentos e espécies estudadas. Utilizou-se a técnica de HPLC-MS para identificação e quantificação dos compostos. A partir dos resultados dos ensaios realizados foram selecionados três experimentos: I) Acúmulo de Proto IX e 5-ALA a partir de inibidores da protoporfirinogênio oxidase (Protox) e fontes seletivas de luz (Escuro, Sombríte 75%, Claro+Vitamina C+E, Claro, Filtro Azul, Filtro vermelho, Filtro Amarelo, Filtro Verde, Testemunha) em plantas de

alface, pulverizadas com Oxyfluorfen + Glutamato monossódico + Vitamina C e E, portanto 9 tratamentos com 4 repetições. II) Seleção de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) para acúmulo de Proto IX com uso de herbicidas inibidores da Protox (Oxyfluorfen e Carfentrazone), precursores de Proto IX (Glutamato Monossódico e Ácido levulênico) e antioxidantes (Vitaminas C e E) em 8 genótipos de cana-de-açúcar (PO933499; RB806043; RB470355; PO830698; SP701143; PO901387; PO894414; SP903414); dispostos em esquema fatorial 9 x 8, com 4 repetições. III) Efeito de diferentes fotoperíodos (claro/escuro: 1h / 3h, 0:15h / 3:45h, 0:05h / 3:55h), em genótipo de cana-de-açúcar (SP903414) para acúmulo de Proto IX com uso de herbicidas inibidores da Protox (Oxyfluorfen e Carfentrazone), precursores de Proto IX (Glutamato e Ácido levulênico) e antioxidantes (Vitaminas C e E) dispostos em esquema fatorial 7 x 5, com 4 repetições. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em todos os ensaios realizados. No experimento I, foram detectados aumentos significativos nas concentrações de Proto IX para a condição sem filtro (claro) e aumentos de 5-ALA para as condições sem filtro, claro e amarelo. No experimento II, foram detectados em curto prazo aumentos significativos nas concentrações de Proto IX para os genótipos RB470355, SP903414 submetidos ao tratamento Oxyfluorfen + Glutamato Monossódico + Vitamina C e E + Ácido levulênico, e para o genótipo SP701143 submetido ao tratamento Testemunha + Vitamina C e E + Ácido levulênico, indicando que podem ser utilizadas como fontes acumuladoras de Proto IX. No experimento III, foram detectados aumentos significativos nas concentrações de Proto IX para a condição de fotoperíodo escuro, no tratamento Carfentrazone + Glutamato + Vitamina C e E, indicando que o acúmulo de Proto IX foi preservado pela não formação do oxigênio singlete produzido pela luz.

De uma forma geral, a síntese de Uroporfirina e Coproporfirina foram observadas na maioria das biomassas analisadas, sendo em alguns casos, superiores à de Protoporfirina IX e 5-ALA. Os teores de Proto IX, 5-ALA, Uroporfirina e Coproporfirina aumentaram em até 426; 9,1; 56 e 391 vezes, respectivamente, comprovando a viabilidade da técnica desenvolvida para produção de Proto IX e seus precursores.

2. SUMMARY

TECHNIQUES FOR ACCUMULATION IN PLANTS OF SUBSTANCES USE OF PHOTOSYNTHETIZERS IN PHOTODYNAMIC THERAPY

Botucatu, 2008, 66p. Dissertação (Mestrado em Agronomia / Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: LUIS RODRIGO MIYAMOTO BARBERIS

Adviser: EDIVALDO DOMINGUES VELINI

Co-adviser: FERNANDO GUSTAVO TONIN

MARIA LÚCIA BUENO TRINDADE

The present work had as objective to develop technologies for the use of plants about units of production or directly as sources of agents photosensitizers, Acid 5-Aminolevulinate (5-ALA), Protoporphyrin IX (Proto IX) and precursors this compounds in plants. The experiments were conducted at the Center for Advanced Research in Weed Plant (NUPAM) – FCA – UNESP - Botucatu/SP, during the year 2007. Tests were conducted to select the best set of conditions for the accumulation of protoporphyrin IX and precursors in lettuce, corn and sugar cane, whose variables were analyzed: 1) selection of a wavelength, 2) duration of periods with and without light, 3) varieties (11 genotypes), 4) application of antioxidants to reduce the action of Proto IX (vitamins C and E), 5) compounds that interfere

with the synthesis of Proto IX (oxyfluorfen, carfentrazone and levulênic acid), 6) addition of precursors for synthesis of Proto IX (glutamate), 7) Replacement of the atmosphere with suppression of the Oxygen. The results were analyzed on the dispersion of the averages of the treatments in relation to the portions witness for the treatments and studied species. It was used technique of HPLC-MS for identification and quantification of compounds. From the results of tests conducted three experiments were selected: I) Accumulation of Proto IX and 5-ALA from protoporphyrinogen oxidase (Protox) inhibitor selective and sources of light (Dark, Shade 75%, Light + Vitamin C + E, Light, Blue filter, Red filter, Yellow filter, Green filter, Witness) in lettuce plants, sprayed with Monosodium Glutamate + Oxyfluorfen + Vitamin C and E, so 9 treatments with 4 repetitions. II) Selection of genotypes of sugarcane for accumulation of Proto IX with the use of herbicides Protox inhibitors (Oxyfluorfen and Carfentrazone), precursors of Proto IX (Glutamate and Levulenic Acid) and antioxidants (vitamin C and E) in 8 genotypes of sugar cane (PO933499; RB806043; RB470355; PO830698; SP701143; PO901387; PO894414; SP903414); arranged in factorial 9 x 8, with 4 repetitions. III) Effect of five different photoperiods (light / dark: 1h / 3h, 0:15 h / 3:45 h, 0:05 h / 3:55h) in genotype of the sugar cane (SP903414) for accumulation of Protoporphirin IX with the use of herbicides inhibitors of Protox (Oxyfluorfen and Carfentrazone), precursors (Monosodium Glutamate and Levulenic Acid) and antioxidants (vitamin C and E) arranged in factorial 7 x 5, with 4 repetitions. Adopted is a completely randomized design in all tests. In the experiment I, were detected at concentrations of Proto IX for the condition without filter (light), and increases in 5-ALA for the conditions without filter (light), and yellow filter. In the experiment II, were detected in short time significant increases in the concentrations of Proto IX for the genotypes RB470355, SP903414 submitted to treatment, Oxyfluorfen + Monosodium Glutamate + Vitamin C and E + Levulenic Acid, and the genotype SP701143 subjected to treatment Witness + Vitamin C and E + Levulenic Acid, indicating that can be used as sources of accumulate Proto IX. In the experiment III, were detected at concentrations of proto IX for the condition of photoperiod dark, in the treatment Carfentrazone + Monosodium Glutamate + Vitamin C and E, indicating that the accumulation of Proto IX was preserved by the no existence formation of oxygen singlet produced by light.

In general, the synthesis of and were observed in most of the analyzed biomasses, being in some cases, superiors to the one of Proto IX and 5-ALA. The levels of

Proto IX, 5-ALA, Uroporphyrin and Coproporphyrin increased in up to 426; 9,1; 56 and 391 times, respectively, proving the viability of the technique developed for production Proto IX and their precursors.

Keywords: protoporphyrin IX, sugarcane, oxyfluorfen, precursors, antioxidants.

3. INTRODUÇÃO

Os conhecimentos de química e biologia de plantas se encontram por caminhos cada vez mais conhecidos. Porém, até o presente momento, as últimas pesquisas em ambos os campos são limitadas. Algumas plantas mostram uma estrutura química simples, assim como, uma diversidade de estruturas moleculares complexas, denominadas, ingredientes ativos, frequentemente com intensa atividade biológica.

Tomando como base a indústria farmacêutica, a indústria agroquímica também tem implementado a química combinatória e os “screenings” de alto processamento que têm como função rastrear novos herbicidas e pesticidas. A exploração sistemática da planta por rotas biológicas com sondas de moléculas pequenas (massa molecular < 700) é uma aproximação geral do que é atualmente chamado de “genética química”, que é centrada no princípio de que moléculas orgânicas podem ser usadas em mutações na genética clássica para modular proteínas funcionais e assistir na delineação das rotas biológicas (Stockwell, 2000 ; Alaimo *et al.*, 2001; Shogren-Knaak *et al.*, 2001).

As moléculas herbicidas conhecidas atuam na fisiologia da planta, uma vez que, seu mecanismo de ação reconheça o sítio de ação e consiga atuar inibindo enzimas responsáveis pela produção de compostos secundários vitais para o desenvolvimento da

planta. O emprego de inibidores de protox (protoporfirinogênio oxidase) para a acumulação de porfirinas pode ser um exemplo da inter-relação de genética química com o uso de herbicidas.

Porfirinas são importantes tanto para plantas, quanto para animais. As principais etapas da rota de produção destes compostos também são similares em animais e vegetais. Na presença de luz com comprimentos de onda adequados, as porfirinas fluorescem e induzem a formação de oxigênio singlete, tornando-se compostos fototóxicos com capacidade de promover a oxidação de lipídios, a ruptura de membranas e a morte celular. Estas duas características, associadas às particularidades bioquímicas das células neoplásicas, têm levado ao maior acúmulo e atividade de porfirinas, permitindo o desenvolvimento de sistemas seletivos para o diagnóstico e tratamento de neoplasias de vários tipos e em diferentes órgãos de humanos.

Como a produção de Oxigênio singlete depende obrigatoriamente da presença de luz em comprimentos de ondas adequados. O fornecimento ou indução do acúmulo de porfirinas tem sido amplamente utilizado para que se obtenha a fotossensibilização necessária ao uso da Terapia Fotodinâmica (TFD). Também há a possibilidade de fornecer tanto a luz quanto o agente fotossensibilizante de forma tópica aumentando a seletividade da técnica.

A maior limitação do uso da TFD é a baixa disponibilidade e ou alto custo dos agentes fotossensibilizantes. A cana-de-açúcar, alface e milho foram as primeiras espécies vegetais a serem testadas para este fim. Foram conduzidos testes com a aplicação de inibidores da Protox (Protoporfirinogênio IX Oxidase), precursores da síntese do ácido 5-aminolevulênico e com o fornecimento de luz com comprimentos de onda específicos. Testes complementares determinaram as melhores doses, melhores inibidores da protox e intervalos para a coleta das plantas. As concentrações dos compostos de interesse e dos inibidores da Protox foram monitoradas. Este trabalho teve como principal objetivo desenvolver tecnologias para o uso de plantas como unidades de produção ou diretamente como fontes de dois importantes agentes fotossensibilizantes que são o ácido 5-Aminolevulevulinato e a Protoporfirina IX.

4. REVISÃO DE LITERATURA

Herbicidas difenil-éteres causam rápida fotodegradação em tecidos verdes de plantas, causando acúmulo de altas concentrações de compostos fotossensibilizantes como a Proto IX (Lydon & Duke, 1988, Mastringe & Scala, 1988a,b, Sandman & Böger, 1988, Witkowski & Halling, 1988, Becerril & Duke, 1989b, Duke *et al.*, 1990, Mastringe *et al.*, 1990,).

A síntese de porfirinas é fundamental para a produção de clorofilas em plantas e heme em plantas e animais. O heme é um componente de enzimas como catalases e peroxidases além de proteínas como a hemoglobina e citocromos. Na Figura 1 é representada a estrutura do núcleo funcional das porfirinas e na Figura 2 são listados os principais passos para a formação de porfirinas em plantas e animais. As principais diferenças referem-se à alimentação da rota, feita a partir do glutamato em plantas e a partir de glicina e Succinil CoA em humanos. A partir do ácido 5-aminolevulênico, as enzimas envolvidas são as mesmas em todas as transformações necessárias para a produção dos tetrapirróis.

O fato das enzimas, substratos e produtos serem os mesmos em plantas e animais, não deve ser visto como um indicador da ausência de variabilidade genética. Os poucos estudos que comparam as seqüências de aminoácidos ou nucleotídeos das enzimas em diferentes espécies têm demonstrado a existência de variabilidade nos genes envolvidos (Watanabe *et al*, 2001 e Weller, 2002).

As porfirinas e seus precursores têm sido amplamente utilizados como agentes fotossensibilizantes na terapia fotodinâmica, cuja denominação foi utilizada pela primeira vez por von Tappeiner em 1904 para descrever a fotossensibilização com consumo de oxigênio que ocorre em tecidos vivos. A TFD vem sendo empregada no tratamento de lesões neoplásicas não melanocíticas, queratinocíticas superficiais, com carcinomas epidermóides, ceratoses, actínicas, carcinomas basocelulares e doenças de Bowen. Já foi utilizada experimentalmente em micose fungóide, sarcoma de Kaposi e ceratoacantomas (Bakos *et al*, 2003).

O princípio da TFD é a geração de oxigênio singlete pelo agente fotossensibilizante que é ativado por uma fonte de luz de alta potência e com comprimento de luz adequado (Ribeiro & Jorge, 2005). A seletividade da técnica baseia-se na aplicação tópica do agente fotossensibilizante e da luz ou na acúmulo seletivo do agente fotossensibilizante nas células alvo (neoplásicas). A produção de oxigênio singlete é cessada alguns μ S após a interrupção do fornecimento de luz (Dysart & Patterson, 2005; Maier & Pindl, 2006).

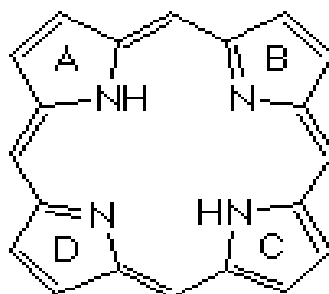


Figura 1 – Núcleo tetrapirrólico presentes nas porfirinas de plantas e animais (Porphyrin – Wikipedia, the free encyclopedia).

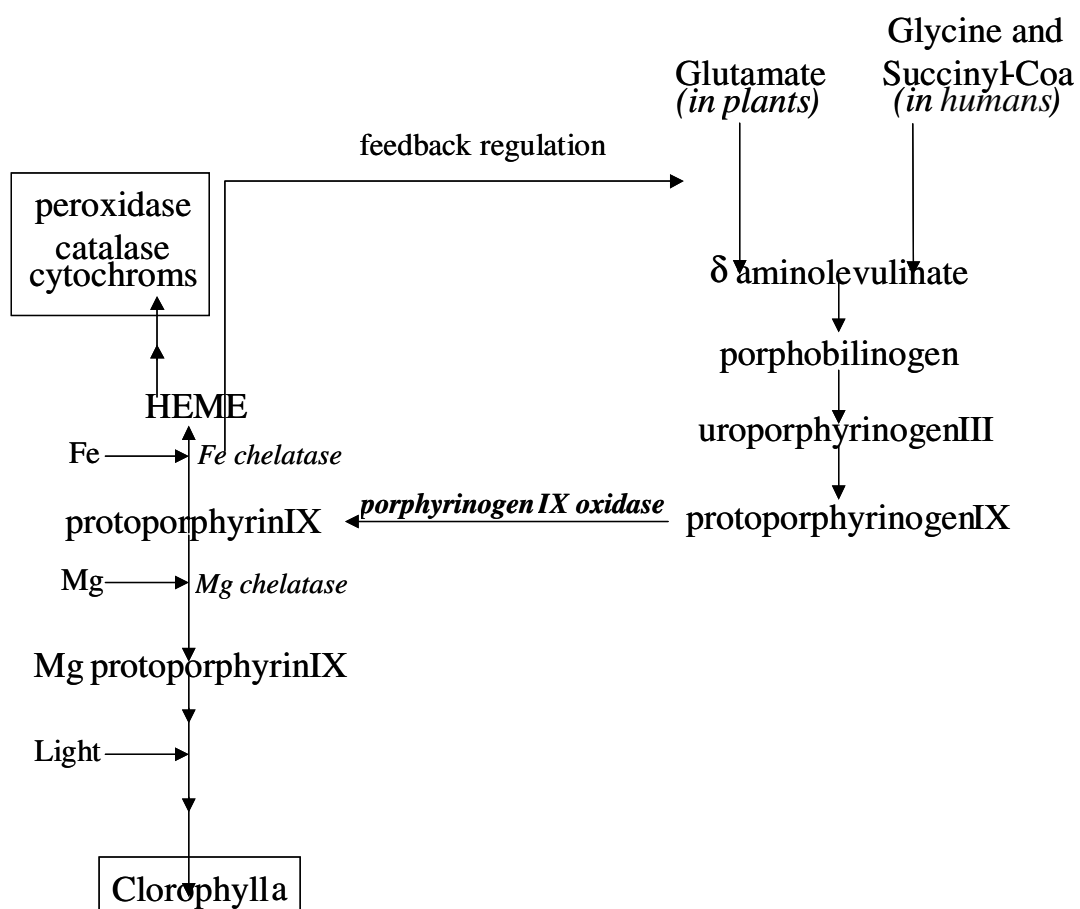


Figura 2 – Rota de síntese de porfirinas, heme e clorofilas em animais e plantas (Porphyrin – Wikipedia, the free encyclopedia, Dodge, 1992, Hess, 1993, Xiao *et al.*, 1998, Nelson *et al.*, 2000;).

Além do agente fotossensibilizante, a TFD depende de outro componente igualmente importante: a fonte de luz. A disponibilidade de fontes de luz de alta potência (lasers), com capacidade de emitir em diferentes regiões do espectro, foi fundamental para a expansão do uso da TFD nas últimas décadas. As porfirinas, os principais agentes fotossensibilizantes em uso, têm a capacidade de absorver luz em vários comprimentos de onda, conforme pode ser observado na Figura 3. As maiores intensidades de fluorescência são obtidas quando a excitação é feita com luz ultravioleta ou azul. A luz azul já foi utilizada com sucesso em TFD (Gahlen *et al.*, 2001, Alexiades-Armenakas, 2006), mas a maioria dos trabalhos refere-se ao uso da luz vermelha, predominando os comprimentos de onda próximos a 630nm, com maior capacidade de penetração nos tecidos (Calzavara-Pinton *et al.*, 1996, Gossner *et al.*, 1999a, Gossner *et al.*, 1999b, Karrer *et al.*, 2001, Bakos *et al.*, 2003, Pech *et al.*, 2005, Pech *et al.*, 2002, Tunstall *et al.*, 2002). A limitada penetração da luz nos tecidos, sobretudo quando se usam ondas de menor comprimento, é a principal limitação ao uso da TFD para a eliminação de tumores de grandes dimensões ou altamente infiltrados em tecidos normais (Karrer *et al.*, 2001). A seleção do comprimento de onda, com opção predominante pelo vermelho considera, prioritariamente, o potencial de penetração da luz nos tecidos.

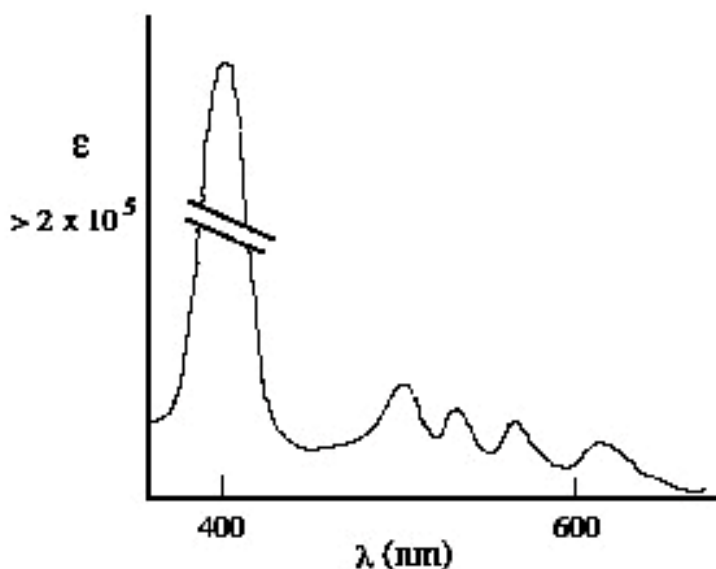


Figura 3 – Espectro de absorção de luz típico das porfirinas (Van Hillegersberg *et al.*, 1992)

Com o grande avanço no desenvolvimento e fabricação de lasers, a indisponibilidade de compostos fotossensibilizantes tornou-se a principal limitação ao uso da TFD na maioria dos países. Muitos dos compostos avaliados não estão disponíveis comercialmente como medicamentos, limitando o uso em escala experimental. Considerando especificamente as porfirinas, os compostos de maior atividade são a Proto IX e seus derivados (hematoporfirina e Photofrin). Os vários tipos de porfirinas diferem substancialmente em termos de estrutura química e de afinidade com as enzimas envolvidas em suas transformações, destacando-se a ferroquelatase, mas, são praticamente idênticos quanto à absorção de luz e à capacidade de induzir a produção de oxigênio singlete. Há três possibilidades para indução de altas concentrações de protoporfirina IX, ou compostos similares, em células neoplásicas: 1) aplicação das porfirinas hematoporfirina (Ebert *et al.*, 1985, Roberts & Cairnduff, 1995, Boyle & Dolphin, 1996, Calzavara-Pinton *et al.*, 1996, , Atamna & Frey, 2004) ou Photofrin (Roberts & Cairnduff, 1995, Atamna & Frey, 2004) diretamente; 2) aplicação de precursores das porfirinas, destacando-se a aplicação sistêmica ou tópica do ácido 5-aminolevulênico e seus ésteres (Roberts & Cairnduff, 1995, Boyle & Dolphin, 1996, Calzavara-Pinton *et al.*, 1996, Sroka *et al.*, 1996, Goosner *et al.*, 1998, Boogert van den *et al.*, 1998, Goosner *et al.*, 1999b, Goosner *et al.*, 1999a, Gahlen *et al.*, 2001, Peach 2002, Tunstall *et al.*, 2002, Krieg *et al.*, 2002, Dalton *et al.*, 2002, Horn *et al.*, 2003, Bakos *et al.*, 2003, Manivasager *et al.*, 2003, Atamna & Frey, 2004, Igbaseimokumo, 2004; Pech, 2005); 3) aplicação de compostos com capacidade de bloquear a ferroquelatase (N-metilprotoporfirina IX e chumbo) e que induzem a acumulação da protoporfirina IX naturalmente produzida pelo organismo (Dailey & Smith, 1984, Atamna *et al.*, 2002).

A genética química dirigiu a expansão no campo da química biológica na última década, e esta aproximação, é vista com um aumento crescente em outras áreas da biologia em geral como, aplicações em bacteriologia (Eggert *et al.*, 2001), biologia do câncer (Torrance *et al.*, 2001), desenvolvimento de vertebrados (Peterson *et al.*, 2002), e neurobiologia (Stockwell, 2002). Em atividades experimentais, os compostos anticancerígenos fototerapêuticos mais utilizados são o ácido 5-aminolevulênico ou seus ésteres que podem ser aplicados de forma tópica (compondo cremes ou por instilação intraperitoneal) ou sistêmica (por administração oral ou intravenosa.) Nas aplicações sistêmicas, administrações orais e intravenosas induzem a comportamentos farmacocinéticos similares do composto (Dalton *et*

al., 2002) indicando que o ácido 5-ALA poderia estar presente como componente de alimentos e com capacidade de induzir à acumulação de Proto IX.

O Photofrin (Figura 4), que corresponde a uma mistura complexa de oligômeros de hematoporfirina (Byrne, 1990, Maier & Pindl, 2006) é o único efetivamente registrado na Holanda, França, Alemanha, Japão, Estados Unidos e Canadá, para o tratamento dos cânceres de bexiga, trato digestivo e urinário, pulmão e esôfago. Este composto é aplicado sistemicamente por injeções intravenosas. As principais desvantagens da aplicação sistêmica do Photofrin são a necessidade de altas doses, a seletividade relativamente baixa entre tecidos normais e tumorais e a acumulação na pele, impossibilitando o contato com a luz natural por várias semanas após o tratamento. Estas limitações são importantes, também, quando se faz a aplicação sistêmica do ácido 5-aminolevulênico e da hematoporfirina.

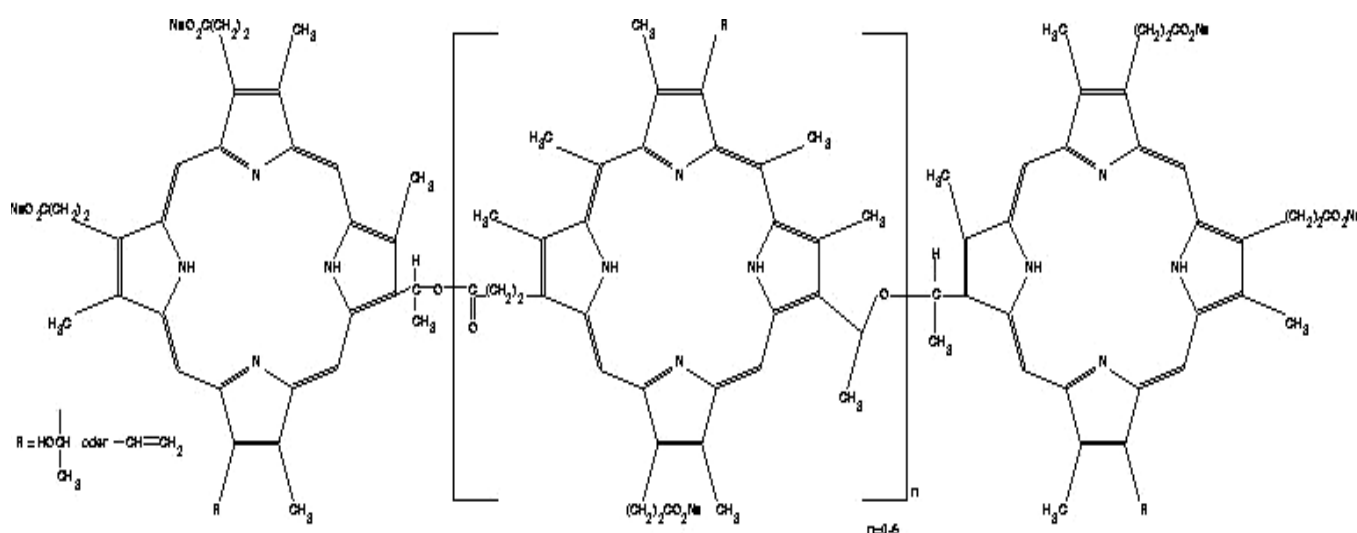


Figura 4 – Estrutura do porfirmer Sódio, composto ativo do Photofrin (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/summary.cfc?ID=145>).

O maior nível de fluorescência promovido pela protoporfirina IX em células cancerígenas é, talvez, a principal vantagem no uso de porfirinas, ou de compostos que induzem ao seu acúmulo, como agentes fotossensibilizantes em terapia fotodinâmica. Este

acúmulo preferencial em células cancerígenas foi observado em um grande número de trabalhos em que se aplicou a hematoporfirina (Ebert *et al.*, 1985), o Photofrin (Roberts & Carnduiff, 1995, Atamna & Frey, 2004) e o ácido 5-aminolevulênico e seus derivados (Loh *et al.*, 1993, Heyerdahl *et al.*, 1997, Krieg *et al.*, 2002, Gronlund-Pakkanen *et al.*, 2002, Ohgari *et al.*, 2005; Velini *et al.*, 2005, Kristiansson *et al.*, 2005). Embora diferenças nas taxas de absorção das substâncias, síntese da protoporfirina IX ou de enzimas como a esterase possam justificar, em parte, as diferenças entre células normais e cancerígenas (Koller & Romslo, 1980, Ebert *et al.*, 1985, Tunstal *et al.*, 2002, Ohgari *et al.*, 2005), a menor atividade da enzima ferroquelatase em células cancerígena tem sido citada como o principal determinante do acúmulo de porfirina IX em células cancerígenas (Van Hillegersberg *et al.*, 1992, Atamna *et al.*, 2002, Dailey & Smith, 2002, Bhasin *et al.*, 2002, Krieg *et al.*, 2002). De modo coerente, inibidores da ferroquelatase podem induzir a grandes acúmulos de protoporfirina IX produzida naturalmente pelos tecidos (Dailey & Smith, 1984, Atamna *et al.*, 2002, Bhasin *et al.*, 2002) mas o uso terapêutico destes compostos tem sido limitado pela elevada toxicidade que apresentam.

Não foram encontradas informações sobre o uso terapêutico da protoporfirina IX, um composto produzido em grandes quantidades tanto por plantas quanto por humanos. A única informação encontrada na literatura refere-se a um estudo realizado em 1980 que indica a rápida acumulação deste composto em mitocôndrias de células hepáticas de rato (Koller & Romslo, 1980). Deve ser destacado que as mitocôndrias correspondem ao principal local de produção de Oxigênio singlete quando se faz a terapia fotodinâmica. O ácido 5-aminolevulênico que também ocorre naturalmente em plantas vem sendo empregado como agente fotossensibilizante em TFD, mas não há informações sobre as concentrações deste composto e de seus ésteres em vegetais.

Uma limitação importante dos compostos utilizados em TFD é o custo elevado. O ácido 5-aminolevulênico pode custar até R\$222,00/g no mercado nacional. As informações da literatura indicam que as doses terapêuticas de ácido 5-aminolevulênico podem variar entre 60 e 400mg/kg de peso corpóreo quando o composto é aplicado de modo sistêmico (injeção intravenosa ou oralmente de 4-6 horas antes da aplicação de luz). Desse modo, várias gramas do composto são necessárias em cada aplicação, limitando o uso da técnica. Os ésteres do ácido 5-aminolevulênico podem custar de R\$477,40 até R\$734,15/g do

ácido que é produzida após a hidrólise do composto. O custo elevado também é uma limitação importante da hematoporfirina. Não foram encontradas informações sobre o preço do Photofrin, ainda não registrado para uso terapêutico e não disponível para fins experimentais no Brasil.

Além do uso terapêutico, a maior fluorescência das células cancerígenas quando se faz o tratamento com porfirinas, ou com compostos que induzem ao seu acúmulo, pode ser utilizada para facilitar a localização destas células permitindo antecipar o diagnóstico de neoplasias (Figura 5).

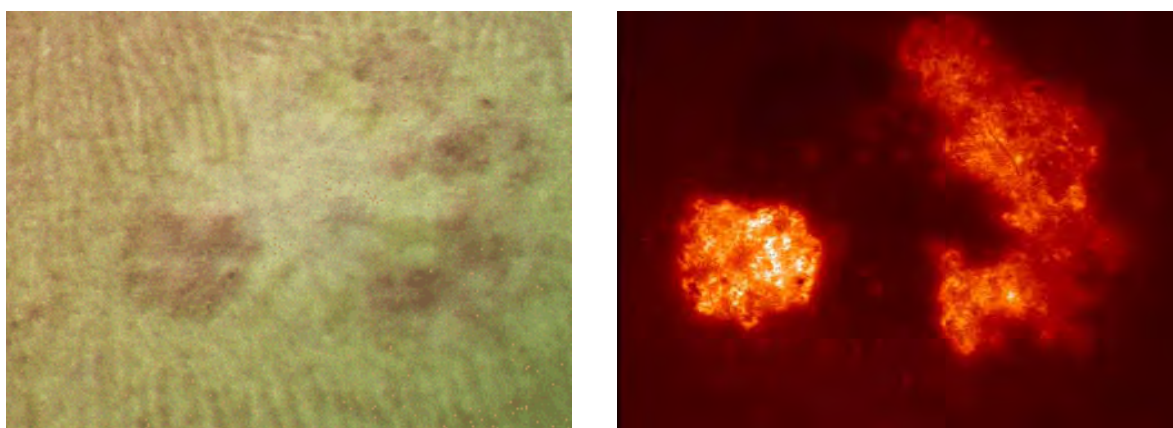


Figura 5 – Imagem de um carcinoma sem (esquerda) e com (direita) a aplicação de laser capaz de induzir a fluorescência da protoporfirina IX (http://www.physik.uni-regensburg.de/forschung/maier/sauerstoff/singulett_e.html).

A produção e acúmulo de porfirinas em plantas tem sido bastante estudada em função destes compostos serem precursores das clorofilas e do heme. Adicionalmente, a enzima protoporfirinogênio IX oxidase (PPO ou PROTOX) constitui-se no sítio da ação dos herbicidas difenil-éteres (oxyfluorfen, lactofen, fomesafen), oxadiazolinas (oxadiazon e oxadiargil) e ariltiazolinonas (sulfentrazone e carfentrazone). Este mecanismo de ação dos herbicidas e os compostos que nele atuam, são apresentados em detalhes por alguns autores (Dodge, 1992; Hess, 1993; Weller, 2002) e as principais informações são apresentadas a seguir. A inibição da síntese da protoporfirina IX gera um intrigante acúmulo

deste pigmento nas plantas tratadas com os herbicidas deste grupo. Em plantas, a protoporfirina IX também apresenta grande reatividade produzindo, na presença de luz, Oxigênio singlete. A protoporfirina IX é produzida nos cloroplastos, pela ação da Protox, que tem o protoporfirinogênio IX como substrato. Como a regulação da rota depende prioritariamente da concentração de protoporfirina IX e seus derivados no interior dos cloroplastos, a paralisação da atividade desta enzima gera um grande acúmulo de protoporfirinogênio IX que extravasa para o citosol. No citosol, o protoporfirinogênio IX é convertido, de modo não enzimático, a protoporfirina IX, que é acumulada em grandes concentrações (centenas de vezes superiores às normais). Este pigmento produz, em contato com a luz nos comprimentos de onda capazes de induzir sua fluorescência, grandes quantidades de Oxigênio singlete que promovem a oxidação de lipídeos e a ruptura de membranas, levando as células à morte.

A regulação da rota de produção de porfirinas em plantas ocorre anteriormente ao ácido 5-aminolevulênico, sendo possível inferir que as concentrações deste composto também podem ser aumentadas pelo uso de inibidores da Protox. Quanto à formação de ésteres deste ácido em plantas, não foram localizadas informações na literatura.

A ação e codificação da Protox, que está presente e atua nos cloroplastos, produzindo clorofila e nas mitocôndrias, produzindo heme é inteiramente codificada no núcleo (Watanabe, 2001). Os autores também estudaram e demonstraram a existência da translocação intracelular do Protoporfirinogênio e da Protoporfirina IX. Os resultados indicam que os excessos destes compostos presentes nos cloroplastos e citosol, em decorrência da ação sub-letal de herbicidas (aplicados em baixas doses), podem ser utilizados nas mitocôndrias para a produção de grupos heme (Watanabe, 2001). A deficiência de heme e hemoglobina está associada à anemia (Porphyrin – Wikipedia, the free encyclopedia), assim como falhas na produção de heme a, heme b e heme c já foi associada ao envelhecimento (Atamna *et al*, 2002) e ao mal de Alzheimer (Atamna & Frey, 2004) em humanos. Não foram encontradas informações sobre os possíveis efeitos do aumento da concentração de heme em alimentos de origem vegetal, sobre a saúde de humanos e outros animais.

Os principais compostos disponíveis no Brasil e capazes de inibir a ação da Protox, promovendo o acúmulo de Protoporfirina IX e, possivelmente, do ácido 5-aminolevulênico e de heme, são descritos por Rodrigues e Almeida, 2005. Dentre os

compostos disponíveis há vários que são utilizados em baixas doses ou com baixa toxidez viabilizando o seu uso em uma fração das doses herbicidas para o aumento das concentrações da protoporfirina IX e, possivelmente, do ácido 5-aminolevulênico e de heme. Os valores de IDA (Ingestão Diária Aceitável) de vários dos compostos (destacando-se carfentrazone e flumioxazin) são relativamente altos e compatíveis com uma dieta exclusiva a partir de alimentos que receberam a aplicação (na dose máxima para alcançar efeito herbicida) imediatamente antes de serem colhidos. Uma característica comum aos inibidores da Protox é a expressiva degradação quando expostos a luz, mas não há informações sobre os comprimentos de onda que promovem sua inativação. A determinação destes comprimentos de onda pode permitir o desenvolvimento de procedimentos de fotólise dos compostos, reduzindo suas concentrações nas plantas, após a indução da produção da protoporfirina IX, mas, é necessário que o comprimento de onda selecionado não induza a fluorescência do tetrapirrol. Também não se sabe se a supressão dos comprimentos que geram a degradação pode permitir a redução da dose aplicada.

Com estas informações será possível avaliar a viabilidade do desenvolvimento de filtros e fontes de luz para que a acumulação do 5-aminolevulênico, da protoporfirina IX e de heme após a aplicação dos inibidores da Protox seja contínua ou para que os inibidores da protox sejam degradados. A supressão de luz para a continuidade da produção e acumulação da porfirina IX em culturas de células já foi anteriormente utilizada, com sucesso (Xiao *et al*, 1998). O aumento da concentração destes compostos também poderá ser alcançado pelo fornecimento de glutamato, um composto de baixo custo e baixa toxicidade, disponível no Brasil como condimento alimentar.

Outra informação fundamental refere-se à capacidade de translocação do ácido 5-aminolevulênico e da Porfirina IX em plantas. Se os resultados indicarem a capacidade de translocação dos dois compostos naturais, inibidores da Protox já reconhecidos como imóveis na planta como o oxyfluorfen (Rodrigues & Almeida, 2005) poderiam ser aplicados topicamente às folhas. As regiões que recebem e mantêm o herbicida poderiam atuar como produtoras dos compostos Protoporfirina IX e ácido 5-aminolevulênico, fornecendo-os para outras partes das plantas que não receberam a aplicação do herbicida e cuja biomassa seria uma fonte dos compostos naturais com, provavelmente, baixas concentrações do inibidor da Protox aplicado.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram desenvolvidos para selecionar o melhor conjunto de condições para o acúmulo de protoporfirina IX e seus precursores em alface, milho e cana-de-açúcar. Nestes ensaios foram aplicados diferentes tratamentos envolvendo as seguintes variáveis testadas entre si, sendo elas:

- 1) Seleção de comprimentos de onda com uso de filtros de luz;
- 2) Duração dos períodos com e sem luz;
- 3) Espécies e variedades. Foram testados 11 genótipos (um de alface, dois de milho e oito cultivares de cana-de-açúcar);
- 4) Aplicação de antioxidantes (vitaminas C e E) para reduzir a ação da Proto IX;
- 5) Compostos que interferem na síntese de Proto IX (oxyfluorfen, carfentrazone);
- 6) Adição de precursores da síntese de Proto IX (glutamato monossódico);
- 7) Substituição da atmosfera com supressão do Oxigênio.

Todos os ensaios realizados foram conduzidos no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia - NUPAM da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, campus de Botucatu/SP.

A análise estatística aplicada no conjunto de ensaios desenvolvidos será apresentada sobre a dispersão das médias dos tratamentos em relação às parcelas testemunhas para os tratamentos e espécies estudadas.

5.1 Determinação dos espectros de absorção de luz dos filtros utilizados

Inicialmente foi realizado o escaneamento (de 190 A 900 nm), em espectrofotômetro de duplo feixe modelo GBC/Cintra 40, de filtros de luz, utilizando, papel celofane, das cores azul, roxo, vermelho, laranja, amarelo, verde e da combinação verde + vermelho.

Os espectros de absorção de luz desses filtros em camadas simples, dupla, tripla e quádrupla, podem ser observados nas Figuras 6 a 12.

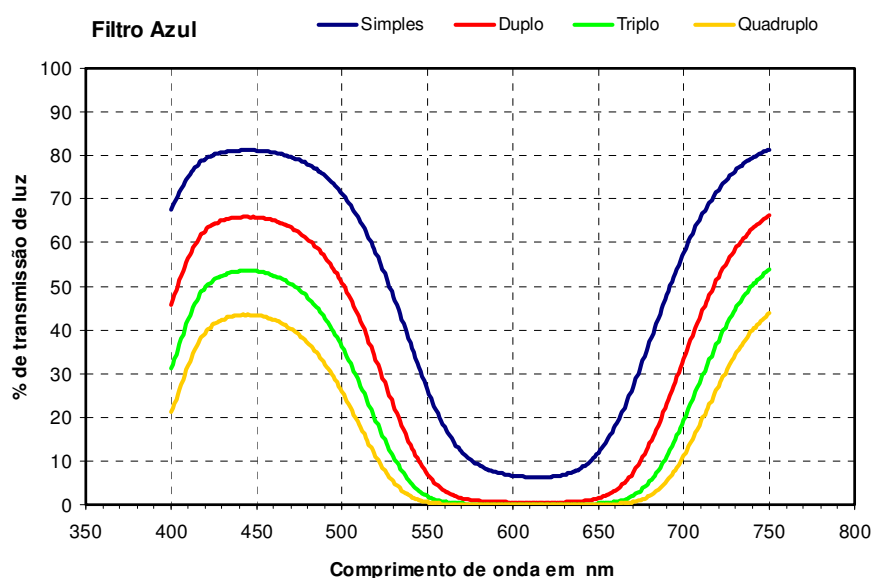
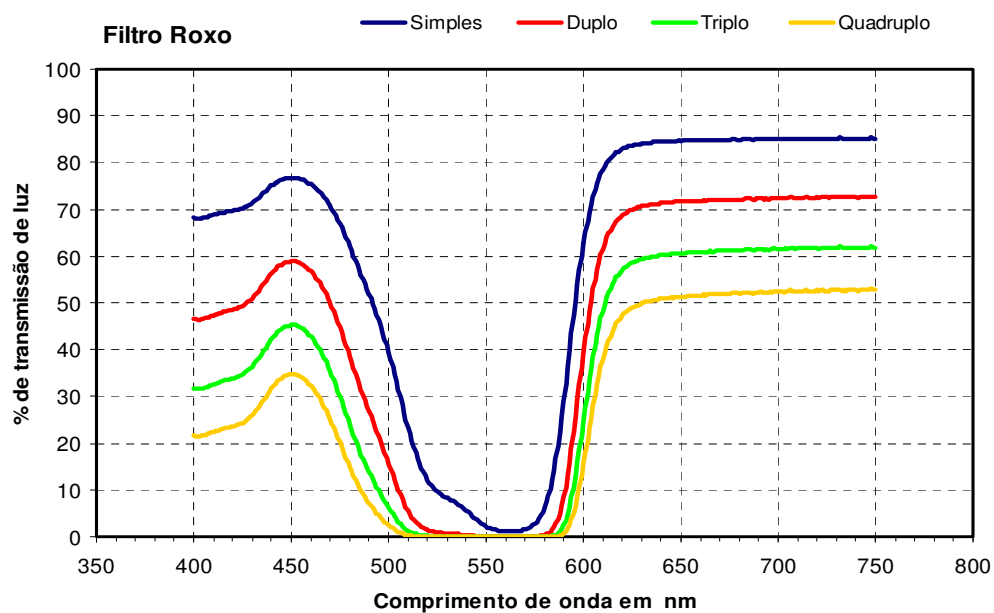


Figura 6 – Porcentagem de transmissão de luz do filtro azul em camada simples, dupla, tripla e quádrupla.



mples,

dupla, tripla e quádrupla.

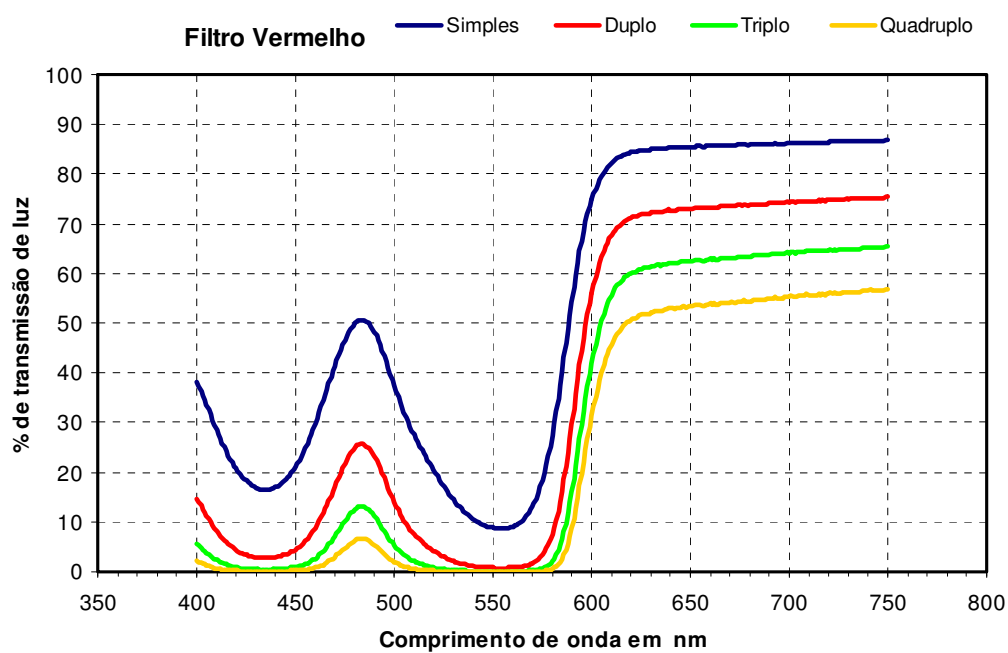


Figura 8 – Porcentagem de transmissão de luz do filtro vermelho em camada simples, dupla, tripla e quádrupla.

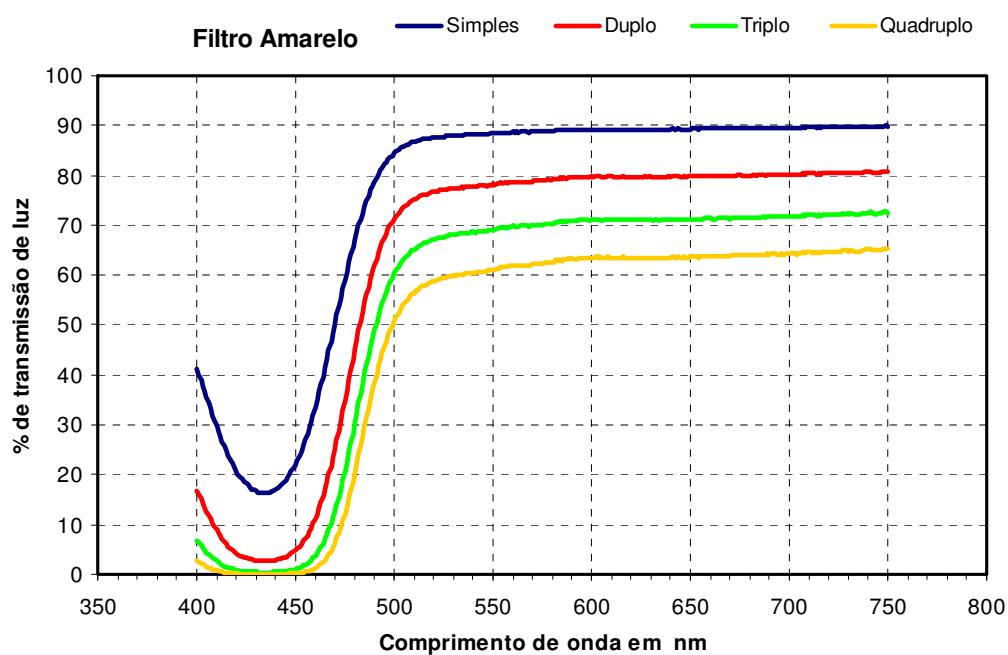


Figura 9 – Porcentagem de transmissão de luz do filtro amarelo em camada simples, dupla, tripla e quádrupla.

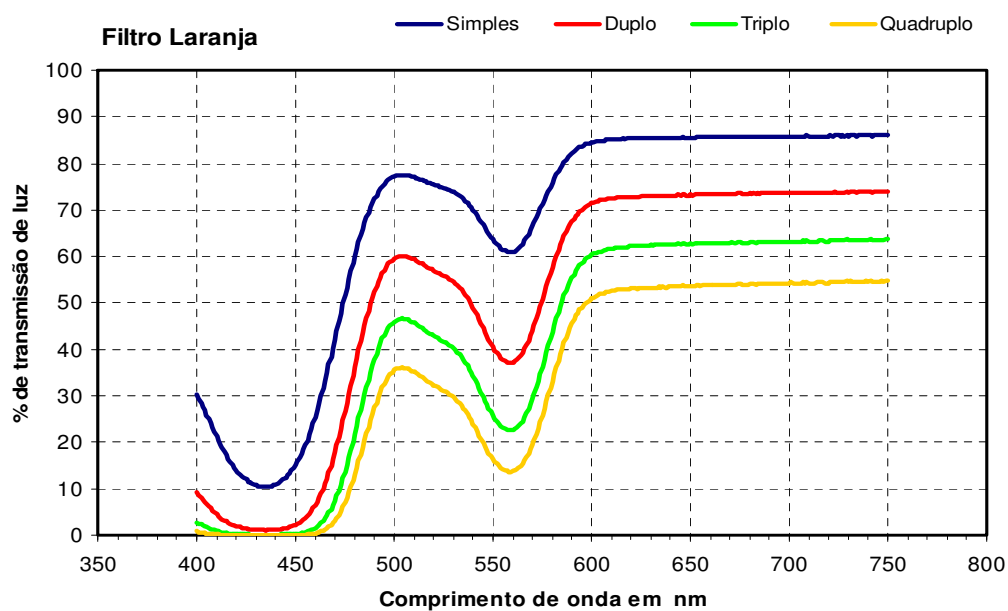


Figura 10 – Porcentagem de transmissão de luz do filtro laranja em camada simples, dupla, tripla e quádrupla.

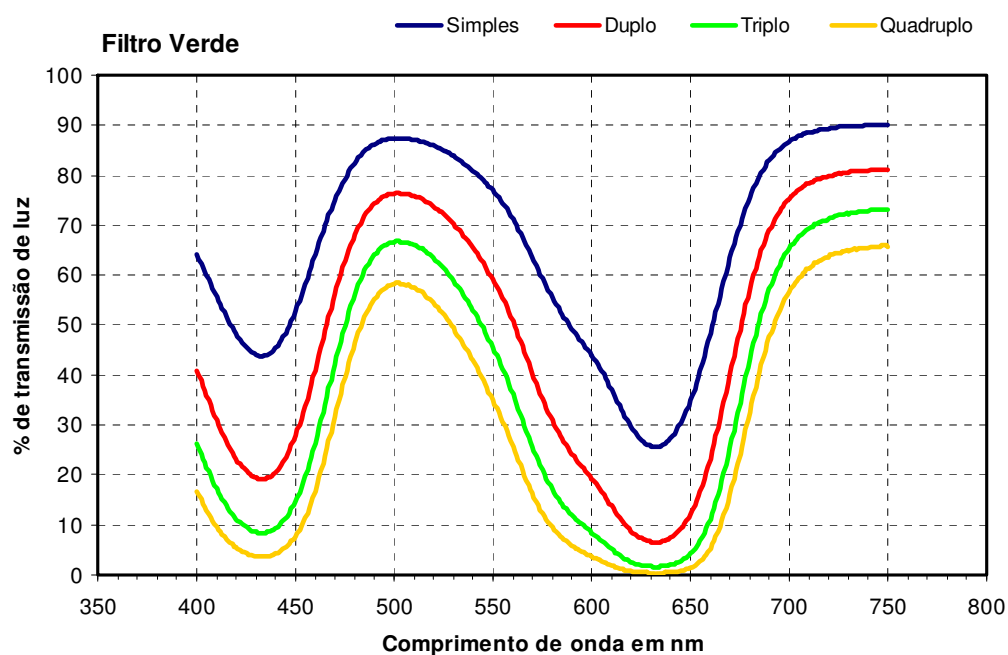


Figura 11 – Porcentagem de transmissão de luz do filtro verde em camada simples, dupla, tripla e quádrupla

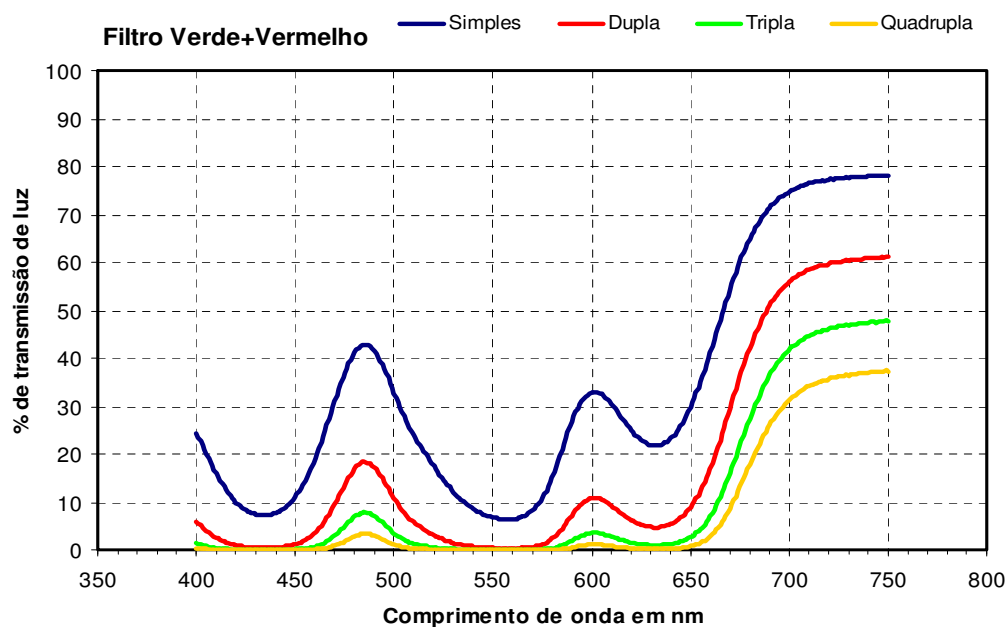


Figura 12 – Porcentagem de transmissão de luz do filtro verde + vermelho em camada simples, dupla, tripla e quádrupla.

A análise dos espectros de absorção de luz permite determinar o potencial de uso de filtros e fontes de luz com comprimentos de onda específicos para a indução da fotólise dos inibidores da protox e a preservação da capacidade das plantas produzirem e acumularem os compostos de interesse. Deve ser destacado que há um grande número de opções para a aquisição de filtros e fontes de luz, mas é fundamental saber quais os comprimentos de onda desejáveis e os que devem ser evitados. Sendo viável o uso do fornecimento de luz em comprimentos de onda específicos, as fontes seletivas serão construídas a partir de materiais e equipamentos disponíveis no mercado nacional.

A figura 13 mostra representa o ensaio envolvendo a seleção de comprimentos de onda com uso de filtros de luz.

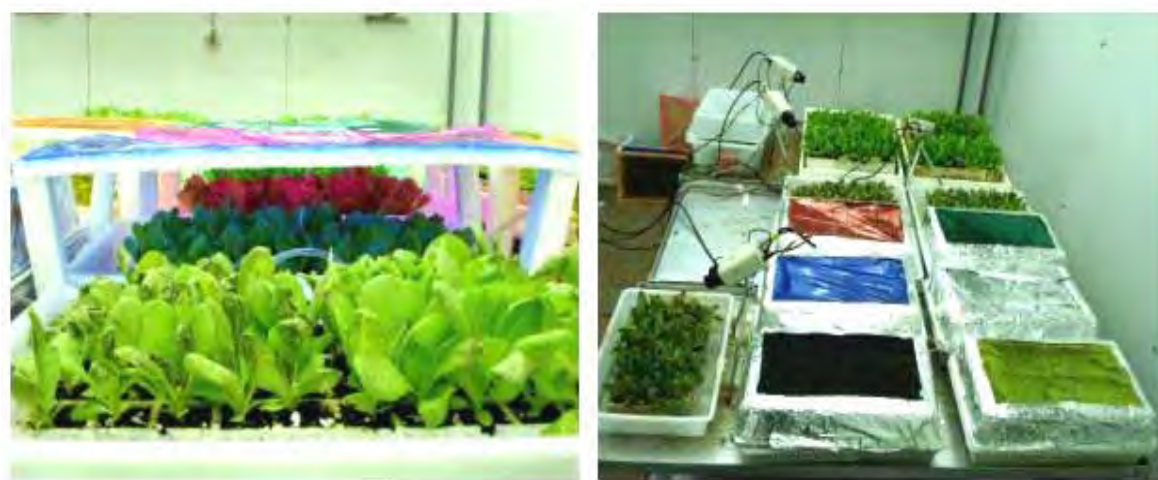


Figura 13 – Fotografia dos experimentos com seleção de comprimentos de onda aplicados às plantas. Foto esquerda vista lateral e a direita vista superior.

5.2 Compostos inibidores da protox, precursores e antioxidantes

Quanto aos compostos que interferem na síntese de Proto IX, o carfentrazone é fortemente retido no solo e a sua translocação se torna limitada pela rápida inativação dos tecidos vasculares. O oxyfluorfen foi selecionado em função da sua intensa fotólise e da baixíssima translocação em plantas; efetivamente, o composto pode ser classificado como imóvel tanto na parte aérea quanto no sistema radicular. O oxyfluorfen foi priorizado para uso nos testes com objetivo de determinar a viabilidade da aplicação de inibidores da protox apenas em parte das folhas das plantas. Os resultados iniciais poderão indicar a necessidade de expandir a relação de compostos em teste.

A utilização do glutamato monossódico como principal composto precursor da síntese de porfirinas em plantas é fundamental para o acúmulo de Proto IX e seus precursores, testados em ensaios anteriores com alface.

A ação antioxidante das vitaminas C e E podem reverter os efeitos do Oxigênio singlete produzido quando há interação da Proto IX com Oxigênio e luz, sendo importante para a diminuição do estresse oxidativo em plantas de alface, colaborando para reduzir a necrose dos tecidos (figura 14) .

5.3 Duração dos períodos de claro ou escuro

O experimento foi realizado com uma única aplicação dos inibidores da protox, precursores e antioxidantes por um período de 15 dias alocados em câmara climatizada.

Foram desenvolvidos cinco sistemas de controle do fotoperíodo que permitiram aplicar às plantas, as condições: claro, escuro, 1h de luz / 3h de escuro, 0:15h de luz / 3:45h de escuro, 0:05h de luz / 3:55h de escuro. (figura 15)

O propósito do uso de diferentes fotoperíodos foi o de adequar os intervalos de claro e escuro com o acúmulo da protoporfirina IX sem que ocorra perda de tecidos e em curto espaço de tempo.

Um sensível acúmulo de Proto IX pôde ser detectado em ambos os discos de cotilédones de pepino e em toda planta de *Lemma pausicostata* dentro de trinta

minutos de exposição ao herbicida de difenil éter (Becerril & Duke, 1989a, Matsumoto & Duke, 1990). Este acúmulo pode ser monitorado no escuro sem danos fotodinâmicos nas células das plantas. Em plantas de *L. pausicostata*, o aumento da acumulação de Proto IX, atingiu o limiar superior dentro de duas horas no escuro; entretanto, em cotilédones de pepino o acúmulo continuou por muito mais tempo. Em outras plantas de pepino o herbicida causou acumulação muito baixa de Proto IX ou ausente no escuro quando comparado com o acúmulo no claro (Mastringe & Scalla, 1988b, Mayasich *et al.*, 1990, Nandihalli *et al.*, 1991).



Figura 14 – Aplicação dos inibidores da protox, precursores e antioxidantes em pulverizador estacionário



Figura 15 – Equipamentos para controle de fotoperíodo, instalados em câmara climatizada com controle de umidade e temperatura. Foto esquerda (vista geral) e foto direita (vista do interior)

5.4 Espécies e variedades estudadas

Foram testados onze genótipos: - um de alface (*cv.* Regina), dois de milho (um híbrido e uma variedade) e oito cultivares de cana-de-açúcar (1.PO933499; 2.RB806043; 3.RB470355; 4.PO830698; 5.SP701143; 6.PO901387; 7.PO894414; 8.SP903414).

A escolha da alface foi mais adequada no início dos testes devido a mesma ser altamente sensível aos inibidores da protox, ter alto potencial de produção de porfirina e ser bastante sensível ao estresse oxidativo provocado pelo acúmulo de porfirina.

A elevada sensibilidade da alface não é interessante para o acúmulo das porfirinas em nível comercial, mas é interessante como planta teste, pois, apresenta resultados rápidos e da forma em que todos os compostos, inibidores da protox, precursores, antioxidantes, filtros de luz e substituição da atmosfera determinem doses adequadas, tipos de filtros que melhor se adaptem ao acúmulo da protoporfirina IX, com preservação dos tecidos.

As plantas de cana-de-açúcar e milho foram escolhidas devido as mesmas serem amplamente cultivadas, por responderem bem ao estresse oxidativo causado pela luz e pela adição dos compostos e se mostrarem em pré-testes anteriores acumuladoras potenciais em nível comercial de protoporfirina IX, uroporfirina e coproporfirina, ambos ativados pela inibição da enzima protox.

5.5 Substituição da atmosfera com supressão do Oxigênio

O princípio da supressão da atmosfera substituindo o oxigênio pelo CO₂ foi de diminuir os efeitos deletérios causados pelos danos fotooxidativos da combinação da luz com o oxigênio formando o oxigênio singlete (figura 16)



Figura 16 - Substituição da atmosfera com CO₂ para a supressão do Oxigênio.

5.6 Testes para definição do método de extração

Inicialmente foi testado um método de extração utilizado por Pornprom *et. al.*, (1994), Becerril *et. al.*, (1992) e Sherman *et. al.*, (1991), que mostrou-se bastante lento, com a possibilidade de processar apenas doze amostras por hora. De modo simplificado, a biomassa das plantas é triturada em graal de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido ou de areia purificada. Após a trituração, a extração propriamente dita é feita com 8ml de metanol com hidróxido de amônia. Extrações sequenciais na mesma amostra indicaram que os produtos de interesse eram extraídos continuamente mesmo após quatro repetições dos procedimentos. Procurou-se elevar a eficiência do método com a adição de 40 ml da solução extratora, mas os resultados não foram alterados.

Finalmente, os procedimentos anteriores foram alterados adotando-se homogeneização de folhas congeladas em moinho do tipo Turrax em função da praticidade de extração. Os reagentes para extração foram mantidos os mesmos (metanol + hidróxido de amônia e metanol puro). No método de extração mais exequível para elevados números de amostras (matéria fresca congelada em freezer e homogeneizada em Turrax com 10 ml de metanol).

5.7 Experimento I: “Acúmulo de protoporfirina IX e 5-ALA pela aplicação de inibidores da protox e fontes seletivas de luz em plantas de alface (*Lactuca sativa* cv Regina)”

O experimento com alface foi selecionado dentre os ensaios anteriores por se tratarem das melhores condições entre os tratamentos, no que diz respeito, ao emprego de doses adequadas de inibidores da protox, precursores, antioxidantes e seleção dos melhores filtros de luz em camada quádrupla.

Este experimento teve como objetivo selecionar fontes seletivas de luz adequados para o acúmulo de protoporfirina IX e 5-ALA .

As plantas de alface receberam as aplicações de Oxyflourfen (Goal) (4ml p.c./l) + Glutamato monossódico (10g/l) + Vitamina C (25g/l) e E (2,5ml/l) em pulverizador experimental estacionário regulado para um consumo de calda de 1000 l/ha, foram utilizadas mudas de alface cultivar Regina em cultivo hidropônico (Castellane & Araújo, 1995), mantidas em câmara climatizada a 25°C e 70% de umidade relativa com luz contínua. A escolha da condução da cultura pelo sistema hidropônico se deu pela facilidade de manuseio das mudas de alface dentro da câmara climatizada e ainda pelo rápido crescimento e desenvolvimento das mesma sob fotoperíodo adequado. O volume de 1000 l/ha aplicado é devido ao maior fornecimento de glutamato monossódico para as plantas, sendo importante precursor na rota da protoporfirina IX,

Foram aplicados nove tratamentos de luz em camadas quádrupla de folhas de papel tipo celofane: 1. Escuro, 2.Sombrite 75%, 3.Vitamina C+E, 4. Claro, 5.Filtro Azul, 6. Filtro vermelho, 7. Filtro Amarelo, 8. Filtro Verde, 9.Testemunha. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, com 4 repetições.(Figura 13)

No tratamento sem filtro de luz a aplicação com vitaminas C (25g/l) e E (2,5ml/l) foi realizado 24 horas antes da aplicação do inibidor da protox, para redução do estresse oxidativo. Os sintomas de acúmulo de porfirinas foram avaliados aos 2 dias após aplicação (DAA). Os espectros de absorção e emissão foram determinados em espectrofotômetro de duplo feixe. Utilizou-se espectrofotômetros de duplo feixe modelo GBC/Cintra 40 para determinar as intensidades de absorção ou transmissão de luz com diferentes comprimentos de onda (190 a 900nm) pelos filtros.

A parte laboratorial envolveu duas etapas: extração e análise do material. Para a extração utilizou-se o método segundo Pornprom *et al.*, (1994), Becerril *et al.*, (1992) e Sherman *et al.*, (1991), cuja biomassa fresca das plantas é triturada em grau de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido ou de areia purificada. Após a trituração das folhas, a extração foi feita com 8ml de metanol e hidróxido de amônia utilizando 0,2 g do material triturado em ambiente protegido de luz. Para tanto, tubos “falcon” foram envolvidos com papel alumínio, antes de passarem por ultra-sonificação e centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos e, então, filtrados em filtro tipo membrana Millex (Millipore) de 0,2 μ .

As análises foram realizadas em CLAE-EM (cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa tipo quadropolo), marca Shimadzu, modelo 2010EV, que apresenta resposta uniforme a grupos de compostos com características similares, mantendo uma relação aproximadamente constante entre a intensidade de sinal (área do pico cromatográfico) e a concentração dos diferentes compostos expressas em unidades molares. Para as análises, as condições do CLAE estabelecidas foram os seguintes gradientes dos solventes (metanol, água e metanol/0,1 mol/l de NH₄OH e acetonitrila 9:1 v/v) na fase móvel. A coluna empregada foi uma pré-coluna de C₁₈ de 5 x 2mm, marca Shimadzu com volume de injeção de 5 μ l. O tempo total de corrida foi de 15 minutos e o tempo de retenção da protoporfirina IX foi de 7,1 minutos. Foram estabelecidos 6 pontos para a curva de calibração sendo empregada a quantificação em diferentes concentrações dos padrões de protoporfirina IX e 5-ALA.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e comparação de médias com uso do teste Tukey no nível de 5% de probabilidade.

5.8 Experimento II: “Seleção de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) para acúmulo de Protoporfirina IX com uso de herbicidas inibidores da Protox, precursores e antioxidantes.”

As folhas de cana-de-açúcar foi considerada em ensaios anteriores promissora para o acúmulo dos compostos (Proto IX, 5-ALA, Uroporfirina e Coproporfirina), sendo ainda considerada uma espécie altamente tolerante ao estresse oxidativo. Este trabalho teve como principal objetivo selecionar genótipos de cana-de-açúcar como unidades de produção ou como fontes de dois importantes agentes fotossensibilizantes que são do ácido 5-aminolevulênico e a Protoporfirina IX.

A aplicação dos tratamentos foi feita em pulverizador experimental regulado para um consumo de calda de 1000 l/ha, em pedaços de 20 cm de folhas, dispostas horizontalmente em bandejas plásticas. Após esta etapa, as folhas foram inseridas em copos plásticos com algodão umedecido no fundo e, em seguida, alocadas em câmara climatizada a 25°C, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14 horas de luz durante 15 dias. (figura 17)

Foram adotados nove tratamentos: 1.Oxyfluorfen (Goal) (6ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 2.Oxyfluorfen (Goal) (6ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização); 3.Oxyfluorfen (Goal) (6ml p.c./l); 4.Carfentrazone (Aurora) (0,250ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 5.Carfentrazone (Aurora) (0,250ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização); 6.Carfentrazone (Aurora) (0,250ml p.c./l); 7.Testemunha + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 8.Testemunha + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização); 9.Testemunha; os quais foram aplicados em 8 diferentes genótipos: 1.PO933499; 2.RB806043; 3.RB470355; 4.PO830698; 5.SP701143; 6.PO901387; 7.PO894414; 8.SP903414.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado por esquema fatorial 9 x 8, com quatro repetições (cada repetição constituiu-se de um pedaço de 20cm de folha de cana). Os sintomas de acúmulo de porfirinas foram avaliados aos 2 DAA

dos tratamentos. Uma das etapas da avaliação dos resultados consistiu na determinação da porcentagem da superfície com a cor característica da porfirina (marrom-avermelhada) através de notas visuais de controle, baseadas em uma escala percentual, onde “0” representa nenhum sintoma e “100” sintomas por toda superfície da folha. Após a avaliação, as folhas foram coletadas e acondicionadas em freezer à -20°C.

A parte laboratorial envolveu duas etapas: extração e análise do material. Para a extração utilizou-se o método segundo Pornprom et. al. (1994), Becerril et. al. (1992) e Sherman et. al. (1991), cuja biomassa fresca das plantas é triturada em graau de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido ou de areia purificada. Após a trituração das folhas, a extração foi feita com 8ml de metanol e hidróxido de amônia em 0,2 gramas do material triturado em ambiente protegido de luz. Para tanto, tubos “falcon” foram envolvidos com papel alumínio, antes de passarem no aparelho de ultra-sonificação e centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos e, então, filtrados em filtro tipo membrana Millex (Millipore) de 0,2 µm. As análises foram realizadas em CLAE-EM (cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa tipo quadropolo), marca Shimadzu, modelo 2010EV, que apresenta resposta uniforme a grupos de compostos com características similares, mantendo uma relação aproximadamente constante entre a intensidade de sinal (área do pico cromatográfico) e a concentração dos diferentes compostos expressas em unidades molares.

Para as análises, as condições do CLAE estabelecidas foram os seguintes gradientes dos solventes (metanol, água e metanol/0,1 mol/l de NH₄OH e acetonitrila 9:1 v/v) na fase móvel. A coluna empregada foi uma pré-coluna de C₁₈ de 5 x 2mm, marca Shimadzu com volume de injeção de 5µl. O tempo total de corrida foi de 15 minutos e o tempo de retenção da proporfirina IX foi de 7,1 minutos. Foram estabelecidos 6 pontos para a curva de calibração sendo empregada a quantificação em diferentes concentrações dos padrões de protoporfirina IX e 5-ALA.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e comparação de médias com uso do teste Tukey no nível de 5% de probabilidade.

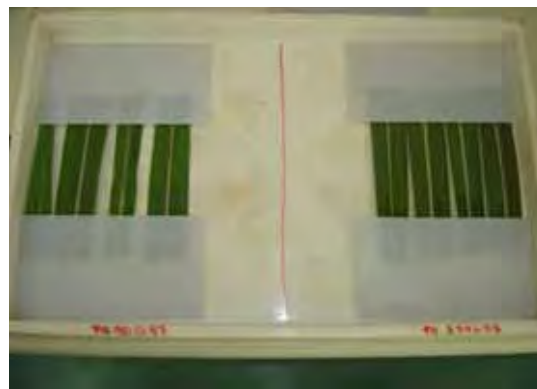


Figura 17 – Sequência de montagem do experimento, separação dos genótipos, aplicação em pulverizador estacionário na vazão de 1.000 l/ha e posterior acomodação em câmara climatizada

5.9 Experimento III: “Efeito de diferentes fotoperíodos sobre o acúmulo de protoporfirina IX submetidos à aplicação de herbicidas inibidores da Protox, precursores e antioxidantes.”

O experimento com cana-de-açúcar e fotoperíodos foi selecionado pelas diferentes condições de aplicação da luz e escuro possibilitado o melhor estudo das condições entre os tratamentos. Os acúmulos foram monitorados sem danos fotodinâmicos nas células das plantas ou fotodegradação da Proto IX.

Este experimento teve como objetivo selecionar fotoperíodos adequados para que o acúmulo de protoporfirina IX ocorra sem perda de tecidos e em curto espaço de tempo.

A aplicação dos tratamentos foi feita em pulverizador experimental estacionário regulado para um consumo de calda de 1000 l/ha, em pedaços de 20 cm de folhas, dispostas horizontalmente em bandejas plásticas. Após esta etapa, as folhas foram inseridas em copos plásticos com algodão umedecido no fundo e, em seguida, colocadas em cinco sistemas de controle do fotoperíodo que permitiram aplicar às plantas, as condições: claro, escuro, 1h de luz / 3h de escuro, 0:15h de luz / 3:45h de escuro, 0:05h de luz / 3:55h de escuro, sendo, após isso alocados em câmara climatizada a 25°C, 70% de umidade relativa durante 15 dias. (figuras 14 e 15)

Os tratamentos adotados foram: 1. Oxyfluorfen (Goal) (6ml p.c./l); 2. Oxyfluorfen (Goal) (6ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L), 3. Carfentrazone (Aurora) (0,250ml p.c./l); 4. Carfentrazone (Aurora) (0,250ml p.c./l) + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 5. Testemunha + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização); 6. Testemunha + Glutamato Monossódico (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L); 7. Testemunha; sendo aplicados em 1 genótipo de cana-de-açúcar, SP903414, escolhido por se comportar como acumulador de protoporfirina IX em ensaios anteriores.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado por esquema fatorial 7 x 5, com quatro repetições (cada repetição constituiu-se de um pedaço de 20cm de folha de cana). Os sintomas de acúmulo de porfirinas foram avaliados aos 5 DAA dos tratamentos. A avaliação consistiu na determinação da porcentagem da superfície com a

cor característica da porfirina (marrom-avermelhada) através de notas visuais de controle, baseadas em uma escala percentual, onde “0” representa nenhum sintoma e “100” sintomas por toda superfície da folha. Após a avaliação, as folhas foram coletadas e acondicionadas em freezer à -20°C.

A parte laboratorial envolveu duas etapas: extração e análise do material. Para a extração foi utilizada 0,2g de matéria fresca de cana congelada, moída em Turrax com 10 ml de metanol por 5 minutos, sendo posteriormente, filtrada em filtro tipo membrana Millex (Millipore) de 0,2µm. As análises foram realizadas em CLAE-EM (cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa tipo quadropolo), marca Shimadzu, modelo 2010EV, que apresenta resposta uniforme a grupos de compostos com características similares, mantendo uma relação aproximadamente constante entre a intensidade de sinal (área do pico cromatográfico) e a concentração dos diferentes compostos expressas em unidades molares.

Para as análises, as condições do CLAE estabelecidas foram os seguintes gradientes dos solventes (metanol, água e metanol/0,1 mol/l de NH_4OH e acetonitrila 9:1 v/v) na fase móvel. A coluna empregada foi uma pré-coluna de C_{18} de 5 x 2mm, marca Shimadzu com volume de injeção de 5µl. O tempo total de corrida foi de 15 minutos e o tempo de retenção da protoporfirina IX foi de 7,1 minutos. Foram estabelecidos 6 pontos para a curva de calibração sendo empregada a quantificação em diferentes concentrações dos padrões de protoporfirina IX e 5-ALA.

Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e comparação de médias com uso do teste Tukey no nível de 5% de probabilidade.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos diversos ensaios desenvolvidos conjuntamente na seleção das melhores condições para o acúmulo de protoporfirina IX e precursores em alface, milho e cana-de-açúcar serão apresentados nos itens que se seguem.

6.1 Determinação dos espectros de absorção de luz dos filtros utilizados

Os testes realizados com os diferentes filtros de luz indicaram que em função dos espectros obtidos e do espectro típico de absorção da protoporfirina IX, obtido em literatura (Duggan & Gassman, 1974) foram selecionados os filtros azul, vermelho, amarelo e verde para serem utilizados nos ensaios referentes às fontes seletivas de luz e seus efeitos sobre a acumulação de porfirina em plantas tratadas com inibidores da Protox (experimento I).

Foram avaliados filtros com propriedades em termos de retenção e transmissão de luz (cores e espessuras). Os resultados visuais obtidos indicam que os filtros de luz azul e verde foram os mais adequados para preservar as plantas tratadas das lesões por estresse oxidativo e acumular protoporfirina (resultados detectados sem análise de compostos). (figura 18)



Figura 18 – Aspecto das injúrias de plantas de alface submetidas a diferentes filtros de luz.

Deve ser destacado que todas as informações neste ensaio sobre acúmulo de protoporfirina IX, foram baseadas em avaliações visuais a partir das folhas de alface. Acredita-se por sintomas de fitotoxicidade observados no campo que a protoporfirina IX tem coloração característica marrom avermelhada, facilitando a discriminação entre os tecidos normais e os com sintoma de acúmulo. Além das avaliações visuais por notas (0 a 100%), as plantas também foram submetidas a determinações de condutividade elétrica das soluções de imersão das folhas em água destilada. O extravasamento de eletrólitos das células mortas aumentam a condutividade elétrica das soluções, ou seja, maiores valores correspondem a maiores mortalidade de células e tecidos.

As plantas foram mantidas na câmara climatizada e avaliados 48 horas após a aplicação. Neste ensaio procurou-se discriminar o sintoma característico de acúmulo de protoporfirina IX, e a subsequente lesão a que chamamos de injúria, como mostra a figura 19. Os resultados dessas avaliações são apresentados na Tabela 1.

Após as avaliações de visuais de injúria e peso da matéria fresca as amostras foram acondicionadas em freezer a -70°C , para posteriores avaliações em HPLC.

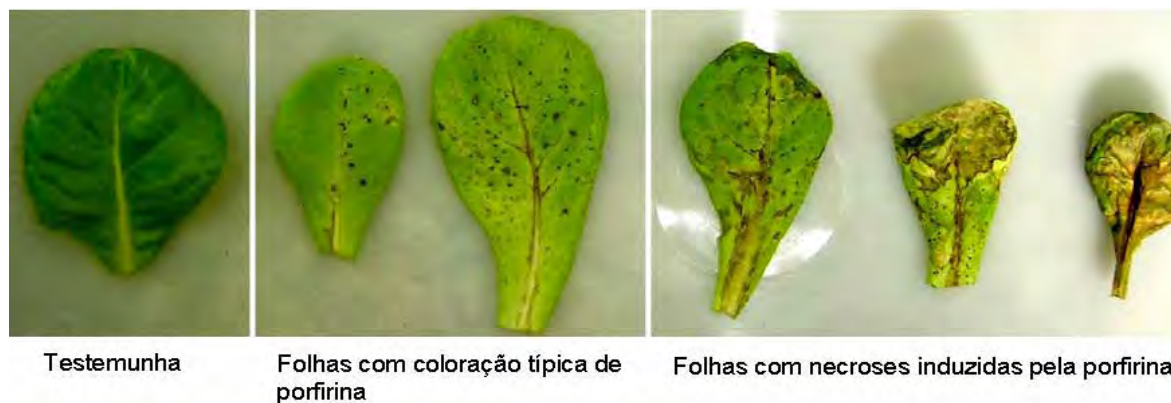


Figura 19 – Padrões iniciais de ocorrência de sintomas de acúmulo de protoporfirina IX observados em alface.

Os dados da tabela 1 deixam claro que as plantas sob filtro verde e mantidas no escuro produziram mais matéria fresca que as demais. Pela análise visual das plantas, as mantidas sob filtro verde assemelham-se às plantas mantidas no escuro, provavelmente, porque o verde é um comprimento de onda pouco absorvido pela planta.

Tabela 1 – Matéria fresca, condutividade elétrica e porcentagens de Sintomas de acúmulo de protoporfirina IX (pústulas avermelhadas) e injúria (necrose) das plantas de alface pulverizadas ou não com Oxyfluorfen (Goal) + Glutamato + Vitaminas C e E acondicionadas sob diferentes filtros de luz.

Tratamento	Matéria Fresca (g)	Condutividade ($\mu\text{s.cma}^{-1}$)	% Sintomas	% Injúria
Testemunha	1,57	184,62	0	0
Sem filtro	0,49	532,5	33,75	60,83
Vitamina C + E	0,73	499,75	38,75	43,75
Filtro Vermelho	0,95	449,25	34,58	45
Filtro Amarelo	0,77	491,5	32,92	44,58
Filtro Azul	1,06	369,1	45,42	24,16
Filtro Verde	2,15	489	34,58	16,66
Filtro Sombríte	1,05	424	23,33	46,66
Escuro	1,89	279,45	6,91	0

Os ensaios sobre o uso de fontes seletivas de luz, realizados até o momento, indicam que é importante a utilização dos filtros de luz para reduzir drasticamente a necrose celular, sem reduzir o acúmulo da porfirina. Os filtros que se mostraram mais efetivos foram o azul e o verde ambos em camada quadrupla. A aplicação das vitaminas C e E também foi importante para a diminuição do estresse oxidativo em plantas de alface, colaborando para reduzir a necrose dos tecidos, em outras espécies de plantas como o milho ou cana-de-açúcar, menos sensíveis ao estresse oxidativo. Pode ser evidenciado que a aplicação das vitaminas seja dispensada.

6.2 Compostos inibidores da protox, precursores e antioxidantes

Os resultados mais expressivos com compostos inibidores da protox foram obtidos com uso do oxyfluorfen, porém, ambos herbicidas, oxyfluorfen e carfentrazone, interrompem a atividade da protoporfirinogênio IX oxidase nos cloroplastos induzindo a planta a acúmulos de protoporfirinogênio IX. Este composto é liberado no citosol onde é rapidamente convertido a Proto IX, de modo não enzimático. Os dois herbicidas foram eficazes em induzir a síntese de Proto IX e seus precursores.

Quanto aos resultados observados do precursor glutamato monossódico (sal derivado do aminoácido ácido glutâmico) os primeiros testes em alface indicaram que a adição de glutamato foi fundamental para a acumulação de Proto IX e seus precursores, pressupondo que a alimentação da rota pelo glutamato, seja de grande importância, para que, enquanto os inibidores da protox estiverem atuando, o fornecimento dos precursores antecessores do protoporfirinogênio esteja garantida.

A adição das vitaminas C e E, com ação antioxidante, reverteram os efeitos do Oxigênio singlete produzido quando há interação da Proto IX com Oxigênio e luz em ensaios realizados com alface. Em função dos baixos custos das vitaminas C e E, além do glutamato, estes tornam-se fontes viáveis de fornecimento contínuo para futuros ensaios em que demandas de maiores doses destas vitaminas se façam necessárias.

O ácido levulênico compete com o 5-ALA na enzima ALA desidratase. O seu uso foi feito buscando a redução da síntese de porfirinas e o aumento do acúmulo de 5-ALA, mas os resultados não foram positivos, ou seja, o acúmulo de ALA não foi induzido pela aplicação de ácido levulênico.

6.3 Duração dos períodos de claro ou escuro

As maiores concentrações de Uroporfirina (Uro) e Coproporfirina (Copro) foram observadas nos tratamentos com aplicação de oxyfluorfen em folhas de cana-de-açúcar, variedade SP903414 (conforme já citado), com os seguintes regimes de aplicação de luz: claro (com luz continuamente); 1h de claro / 3h de escuro. Nestas condições, as concentrações estimadas de Uro e Copro foram até 9,9 e 129 vezes maiores do que as de Proto IX, respectivamente (Tabela 2). Deve-se deixar claro que estes testes só se basearam em função das massas moleculares conhecidas dos precursores Uro e Copro. O resultados no experimento III mostram resultados focados na protoporfirina IX.

As concentrações ainda precisam ser corrigidas após a obtenção dos padrões analíticos, mas os resultados indicam que as concentrações de Uro e Copro após a aplicação de inibidores da Protox podem ser muito superiores às concentrações de Proto IX e, possivelmente, são compostos de maior interesse para a extração e uso medicinal.

6.4 Espécies e variedades estudadas

Dentre os 11 genótipos testados (um de alface, dois de milho e oito cultivares de cana-de-açúcar). Os resultados foram variáveis de acordo com as espécies.

A alface como descrito anteriormente, mostrou-se altamente sensível aos inibidores da protox, com alto potencial de produção de porfirina e ser bastante sensível ao estresse oxidativo provocado pelo acúmulo de porfirina. Resultados mais conclusivos quanto à seleção de filtros de luz, precursores e antioxidantes serão apresentados no experimento I.

As plantas de cana-de-açúcar e milho tiveram boa resposta ao estresse oxidativo causado pela luz e pela adição dos compostos e se mostrarem nos ensaios acumuladoras potenciais em nível comercial de protoporfirina IX, uroporfirina e

coproporfirina, ambos ativados pela inibição da enzima protox e adição de precursores e antioxidantes. Nas figuras 20 e 21 são apresentados os sintomas característico do acúmulo de protoporfirina IX e/ou seus precursores em milho e cana-de-açúcar.



Figura 20 - Plantas de milho tratadas com inibidores da protox com sintomas de acúmulo de porfirinas.

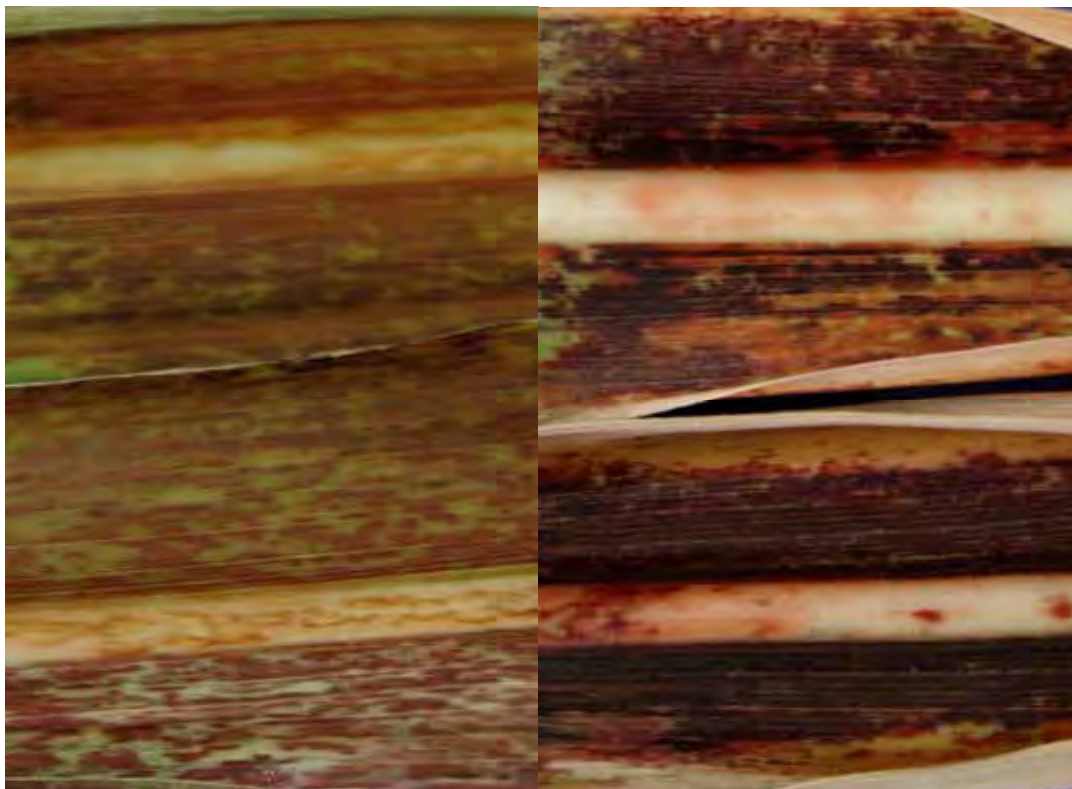


Figura 21 - Sintoma característico do acúmulo de porfirinas em folhas de cana-de-açúcar da variedade SP903414 tratadas com inibidores da protox.

6.5 Substituição da atmosfera com supressão do Oxigênio

Testes preliminares, realizados com sacos plásticos, indicaram que a supressão parcial do Oxigênio pode evitar completamente as injúrias promovidas pelos inibidores da Protox. Ainda há a necessidade de avaliar se a síntese de Proto IX e seus precursores é continuada.

Os trabalhos de substituição da atmosfera indicaram que é possível evitar completamente as intoxicações das plantas, mas em todos os testes realizados, as plantas morreram quando retornaram à atmosfera normal. O sistema ainda depende do desenvolvimento de certos ajustes como a construção de recipientes de vidro ou acrílico e o uso de misturadores de gases para que permitam um melhor controle de gases da atmosfera artificial.

6.6 Testes para definição do método de extração de Protoporfirina IX, ácido 5-aminolevulênico (5-ALA), Uroporfirina e Coproporfirina

Os resultados dos testes de extração com a nova metodologia (matéria fresca congelada em freezer e homogeneizada em Turrax com 10 ml de metanol) utilizando biomassa de milho são sumarizados na Tabela 2. O teste foi conduzido com quatro repetições experimentais.

As áreas dos picos dos quatro compostos em folhas de milho são apresentado na Tabela 2. O modelo abaixo foi ajustado aos dados, tendo como variável dependente as áreas acumuladas e o número de extrações como variável independente:

$$\text{Área Acumulada} = \text{Assíntota Máxima} (1 - 10^{-C \times \text{N}^\circ \text{ de extrações}})$$

Onde, “C” é constante do modelo. O valor da “Assíntota Máxima” é obtido no processo de ajuste do modelo aos dados. A “Assíntota Máxima” corresponde à área de picos acumulada se fossem efetuadas infinitas extrações em uma mesma amostra. As áreas acumuladas para 1-4 extrações foram expressas em porcentagem da Assíntota Máxima representando as estimativas da porcentagem de extração dos compostos.

Tabela 2 – Quantidades de compostos obtidos na biomassa de milho (Áreas Cromatográficas)

Extrações	Áreas dos picos			
	Proto IX	ALA	Copro	Uro
1	76422	663370	7213532	2009360
2	45736	293607	2447943	488379
3	47001	109129	631515	121157
4	35069	99967	846342	151813
Extrações	Áreas dos picos acumuladas			
	Proto IX	ALA	Copro	Uro
1	76422	663370	7213532	2009360
2	122158	956977	9661475	2497739
3	169159	1066106	10292990	2618896
4	204228	1166074	11139332	2770709
Extrações	Assíntotas estimadas pelo modelo			
	Proto IX	ALA	Copro	Uro
∞	319627	1199754	11175841	2794365
Extrações	Coeficientes de determinação			
	Proto IX	ALA	Copro	Uro
	0,9812	0,9906	0,9902	0,9854
Extrações	Eficiência de extração estimada			
	Proto IX	ALA	Copro	Uro
1	23,91	55,29	64,55	71,91
2	38,22	79,76	86,45	89,38
3	52,92	88,86	92,10	93,72
4	63,90	97,19	99,67	99,15

Os resultados obtidos indicam que o procedimento utilizado para extrair os compostos na grande maioria dos trabalhos, embora sendo o mais eficiente, permite extrair apenas parcialmente os compostos. Deve ser lembrado que no processamento das amostras experimentais, apenas uma extração foi feita. Os coeficientes de extração estiveram entre 23,91% para Proto IX e 71,91% para Uroproporfirina.

Os resultados obtidos mostrando elevada concentração de Proto IX no extratos analisados imediatamente após a extração indicam que a indisponibilização da Proto IX pode estar ocorrendo no próprio extrato. É possível que o composto esteja se combinando com outros componentes das plantas alterando os tempos de retenção no cromatógrafo e o espectro de massa obtido.

6.7 Análise conjunta dos compostos

Os resultados dos principais estudos selecionados serão tratados em conjunto. Esta conduta é viável porque a proposta do estudo não era a síntese de porfirinas em plantas, mas selecionar procedimentos, espécies ou variedades que maximizassem estes acúmulos permitindo utilizar a biomassa vegetal como fonte destes compostos e seus precursores.

Na Tabela 3 são resumidas as informações obtidas de modo discriminado por espécie vegetal. Observa-se que a cana-de-açúcar foi a espécie com maior potencial de produção de Proto IX, ALA e Copro. Em termos médios, os maiores incrementos à síntese de ALA foram obtidos em alface mas, para os fins deste projeto, o incremento médio é menos importante do que o incremento máximo observado para cada composto. A cana-de-açúcar, mais especificamente a variedade SP903414, sofreu incrementos máximos de aproximadamente 426, 9 e 391 vezes, para Proto IX, ALA e Copro, respectivamente, constituindo a melhor alternativa para a produção dos compostos.

Para a Uro e em termos médios, os estímulos à produção foram maiores em milho do que em cana. Contudo, quando se analisam os incrementos máximos dos teores deste composto, os resultados obtidos para milho e cana (variedade SP903414), os

resultados são próximos. Os resultados justificam a priorização da cana-de-açúcar na condução deste estudo.

Tabela 3 – Resumo dos resultados obtidos. Informações sobre os estímulos à produção dos compostos. Os resultados referem-se à relação entre os teores dos compostos em plantas tratadas e os teores nas testemunhas sem tratamento.

Composto	Espécie	Nº de Tratamentos	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo
Protoporfirina IX	Milho	8	3,74	1,93	0,68	1,95	7,60
	Alface	8	0,83	0,49	0,17	0,26	1,65
	Cana	208	22,80	37,49	2,60	0,81	425,97
	Total	224	21,33	36,51	2,44	0,26	425,97
ácido 5-aminolevulênico	Milho	8	1,38	0,66	0,23	0,75	2,75
	Alface	8	5,89	1,22	0,43	4,46	7,37
	Cana	208	2,94	2,16	0,15	0,64	9,10
	Total	224	2,99	2,18	0,15	0,64	9,10
Uroporfirina	Milho	8	23,30	17,19	6,08	3,27	55,80
	Alface	8	3,88	2,01	0,71	1,54	6,89
	Cana	137	7,40	7,16	0,61	0,04	43,40
	Total	153	8,05	8,55	0,69	0,04	55,80
Coproporfirina	Milho	8	9,75	7,72	2,73	1,31	22,24
	Alface	8	3,12	1,00	0,35	2,02	4,60
	Cana	139	34,56	41,89	3,55	0,50	391,13
	Total	155	31,66	40,62	3,26	0,50	391,13

Na Figura 17, são apresentadas informações sobre a dispersão das médias dos tratamentos em relação às parcelas testemunhas para os tratamentos e espécies estudadas. Observa-se que os tratamentos com menores estímulos são bastante frequentes, enquanto os tratamentos com estímulos mais intensos à produção dos compostos apresentam frequência bastante baixa. Outro fato interessante observado no estudo foi à exploração de um número muito vasto de condições permitindo que mesmo os tratamentos de baixa frequência fossem identificados.

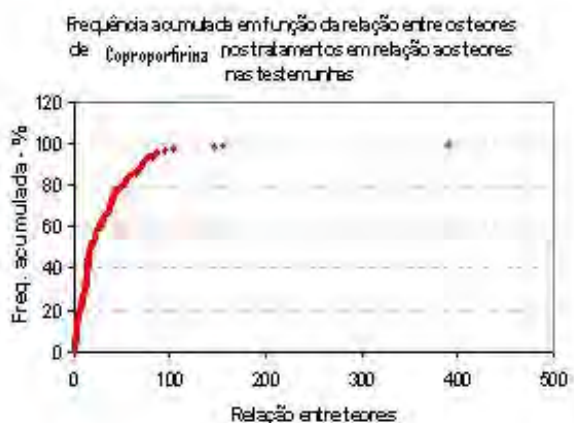
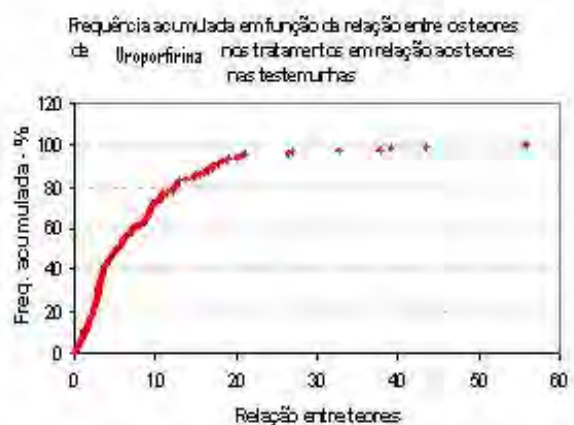
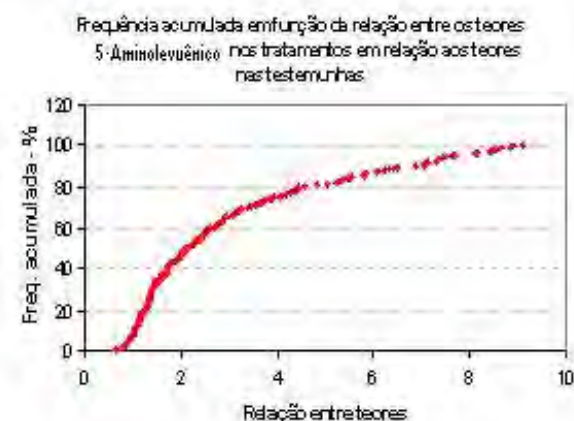
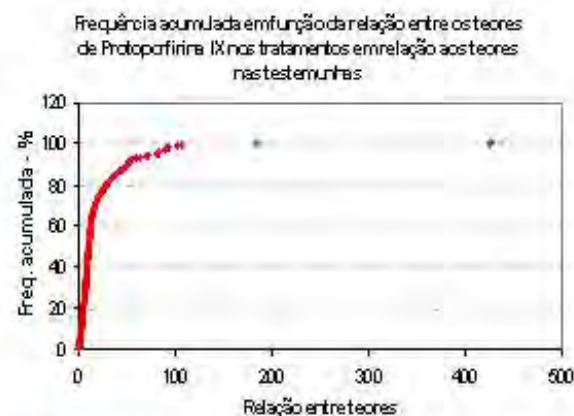


Figura 22 – Distribuições de frequências para as relações entre os teores dos compostos nos tratamentos em relação aos teores nas testemunhas.

A opção por trabalhar com as relações de teores foi feita em função de diferentes métodos de extração terem sido utilizados para as diferentes espécies e nas várias etapas do estudo, mas quando se analisam os teores dos compostos nas amostras, as curvas de frequência são similares, em função das concentrações dos compostos nas testemunhas das diferentes espécies serem próximas.

A discussão conjunta será concentrada nos tratamentos que proporcionaram os maiores acúmulos. Considerando o conjunto de compostos estudados, os maiores acúmulos foram obtidos no seguinte conjunto de condições:

1. Espécie: Cana-de-açúcar. Variedade SP903414 em cultivo de folhas destacadas.
2. Inibidor da Protox utilizado: oxyfluorfen na dose de 1kg i.a./ha.
3. Volume de calda utilizado na aplicação: 1000L/ha para cobrir completamente as folhas.
4. Condições ambientais: 25°C e 70% de Umidade Relativa.
5. Glutamato monossódico aplicado na dose de 10kg/ha.
6. Vitamina C aplicada na dose de 25kg/ha.
7. Vitamina E aplicada na dose de 2,5kg/ha.
8. Fornecimento de luz. Os maiores estímulos para à síntese de ALA, Uro e Copro ocorreram nos tratamentos com luz contínua ou com intervalos 1h de luz / 3h de escuro indicando que a luz é fundamental para a produção e acúmulo das mesmas.
9. Para a Proto IX, os maiores teores foram observados nos tratamentos sem luz. A justificativa para este resultado é a instabilidade e alta capacidade da Proto IX produzir Oxigênio singlete na presença de luz. No escuro, tanto a Proto IX quanto os tecidos das plantas são preservados.

Quanto ao ácido 5-aminolevulênico (5-ALA), os aumentos de concentrações na biomassa foram modestos, indicando ser pouco provável que se possa

utilizar a biomassa de plantas tratadas com inibidores da Protox como fontes deste composto. Quanto à Uroporfirina, Coproporfirina (precursores da Protoporfirina IX) e outros compostos intermediários, a confecção de padrões analíticos depende da purificação dos mesmos a partir da biomassa vegetal, seguida da confirmação da estrutura a partir de espectros de ressonância magnética.

Até o momento, as informações sobre as concentrações de Uroporfirina e Coproporfirina são aproximadas. O equipamento utilizado (LC/MS marca Shimadzu modelo 2010EV com detector do tipo quadrupolo), apresenta resposta uniforme a grupos de compostos com características similares, mantendo uma relação aproximadamente constante entre a intensidade de sinal (área do pico cromatográfico) e a concentração dos diferentes compostos expressas em unidades molares. As relações das áreas cromatográficas de picos de Uroporfirina e Coproporfirina com as áreas de Proto IX, para a qual se dispunha de padrão analítico, podem estar sujeitas a pequenos erros e serão corrigidas após a obtenção dos compostos isolados ou padrões analíticos. Em função da necessidade de uso deste procedimento para estimar as concentrações de Uroporfirina e Coproporfirina, é que se decidiu priorizar a discussão das relações entre áreas de picos correspondentes aos diferentes compostos, presentes nas amostras com tratamento e as áreas de pico das testemunhas. A variação na sensibilidade do detector a diferentes compostos não interfere nos resultados assim obtidos e expressos.

Comparando-se as áreas de pico de Uroporfirina e Coproporfirina com as áreas de pico de Proto IX e após correção pelos pesos moleculares dos compostos, foi possível observar que as áreas de pico correspondentes a estes dois precursores da Proto IX foram, em média, respectivamente, 1,9 e 7,1 vezes superiores às áreas de Proto IX. As maiores concentrações de Uroporfirina e Coproporfirina foram observadas nos tratamentos com aplicação de oxyfluorfen em folhas da variedade SP903414 (conforme já citado), com os seguintes regimes de aplicação de luz, respectivamente: claro (com luz continuamente); 1h de claro / 3h de escuro). Nestas condições, as concentrações estimadas de Uroporfirina e Coproporfirina foram respectivamente 9,9 e 129 vezes maiores do que as de Proto IX, respectivamente. As concentrações ainda precisam ser corrigidas após a obtenção dos padrões analíticos, mas os resultados indicam que as concentrações de Uroporfirina e Coproporfirina

após a aplicação de inibidores da Protox podem ser muito superiores às concentrações de Proto IX e, possivelmente, são compostos de maior interesse para a extração e uso medicinal.

Deve ser destacado que a Uroporfirina e a Coproporfirina são menos fluorescentes e mais fotoestáveis do que a que a Proto IX o que justifica os maiores acúmulos dos mesmos nos tratamentos com aplicação de luz. De todos os precursores da Proto IX analisados neste projeto, o 5-ALA é o mais simples deles e o mais próximo do início da rota de síntese de porfirinas. Como já está validado o conceito de que o 5-ALA pode ser utilizado como agente sensibilizante em TFD, está implícito que outros precursores da Proto IX que são produzidos a partir do próprio 5-ALA também têm potencial de uso.

Também é possível que o predomínio da Uroporfirina e Coproporfirina em relação à Proto IX se deva, em parte, à degradação parcial deste composto nos processos de extração e quantificação. Efetivamente, quando foi possível extrair e analisar a Proto IX imediatamente, os teores encontrados (de até 0,26%) foram muito superiores aos geralmente obtidos no estudo e na literatura.

Foram observados que diferentes pontos de uma mesma folha podem produzir quantidades muito diferentes de Proto IX e seus precursores, mesmo em condições controladas e utilizando um sistema de aplicação que garante a aplicação de doses uniformes às folhas.

O principal resultado do estudo foi o de ter selecionado, com base em metodologias estáveis e reprodutivas, os melhores tratamentos para induzir ao acúmulo da Proto IX e seus precursores, sendo priorizar o desenvolvimento de métodos de extração dos compostos.

6.8 Avaliação da mobilidade dos herbicidas e compostos intermediários

O objetivo deste conjunto de atividades foi o de avaliar se a acumulação de porfirina IX e seus precursores ocorreria em regiões não tratadas com os inibidores da Protox. Se a hipótese fosse comprovada, seria viável coletar os tecidos não tratados e não contaminados com estes compostos para utilizar como fonte da Proto IX e seus precursores.

Nesta etapa, foram utilizadas folhas de cana-de-açúcar (variedade SP 903414) que receberam a aplicação dos herbicidas com gotas de 1uL produzidas por microseringa. Aos sete dias após a aplicação as folhas foram fotografadas (Figura 9) e avaliadas quanto à concentração dos compostos de interesse. O acúmulo da Proto IX e seus precursores limitou-se à área de molhamento das gotículas, inviabilizando o uso de tecidos não tratados como fonte dos compostos.

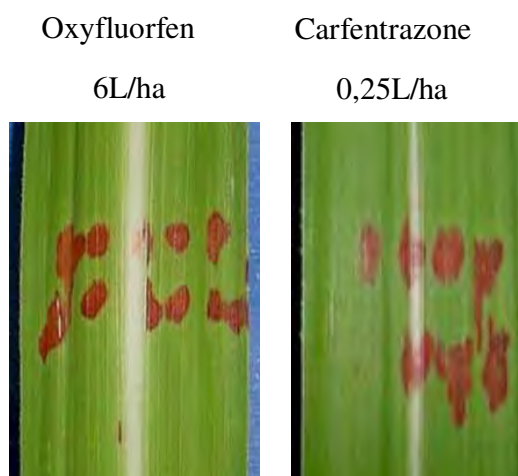


Figura 18 – Folhas tratadas com gotículas de 1uL de soluções com oxyfluorfen ou carfentrazone aos sete dias após o tratamento.

6.9 Experimento I: “Acúmulo de protoporfirina IX e 5-ALA pela aplicação de inibidores da protox e fontes seletivas de luz em plantas de alface (*Lactuca sativa* cv Regina)”

Os resultados indicaram que a intoxicação das plantas ocorreu mesmo com o uso de filtros com diferentes cores e que os tratamentos com maior potencial de uso em termos de indução da síntese de Proto IX eram os tratamentos sem seleção de comprimentos de onda, no caso, sem filtro (claro), já para indução da síntese de 5-ALA os melhores tratamentos foram, claro e amarelo, respectivamente, com comprimentos de ondas mais próximos e diferindo significativamente da testemunha. (Tabela 4)

Tabela 4: Médias transformadas (raiz quadrada) das concentrações de porfirina e ácido levulênico em plantas de alface submetidas aos diferentes tratamentos de luz. FCA/UNESP/Botucatu – 2008.

Tratamentos	Porfirina	Ácido aminolevulênico
	(µg/g)	
Escuro	3,053959 c	83,150576 ab
Sombrite 75%	4,830593 abc	88,806467 ab
Vit C+E Claro	5,436275 abc	86,712962 ab
Filtro Azul	4,642736 bc	71,771734 ab
Filtro vermelho	5,373788 abc	78,234464 ab
Filtro Amarelo	3,398273 c	95,529035 a
Filtro Verde	4,065904 bc	80,430336 ab
Claro	7,519356 a	96,974275 a
Testemunha	6,423779 ab	57,641493 b
F (tratamentos)	6,05**	4,17**
C.V. (%)	23,18	14,55
D.M.S	2,74	28,44

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey (P<0,05). ** - significativo ao nível de 1% de probabilidade.

6.10 Experimento II: “Seleção de genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) para acúmulo de Protoporfirina IX com uso de herbicidas inibidores da Protox, precursores e antioxidantes.”

O método analítico mostrou maiores acúmulos em µg/g de protoporfirina IX nos genótipos SP903414, RB470355 submetidos ao tratamento 2 (Oxyfluorfen (Goal) (6ml p.c./l) + Glutamato (10g/L) + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização)) e SP701143 submetido ao tratamento 8 (Testemunha + Vitamina C e E (25g/L e 2,5ml/L) + Ácido levulênico (0,1% imersão das folhas 1 hora antes da pulverização), respectivamente 21,25; 19,75 e 15,25 µg/g, diferindo significativamente da testemunha dos genótipos correspondentes, conforme tabela 5. As maiores concentrações foram observadas com o uso do inibidor da protox, juntamente com os precursores e antioxidantes, demonstrando que

ocorreu a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase e ocasionou o acúmulo do protoporfirigênio no cloroplasto, cuja substância se extravasa para o citosol da célula e se transforma em protoporfirina IX que na presença de luz e oxigênio, forma o oxigênio singleto, responsável pela peroxidação de lipídeos, degradação da membrana e morte celular.

As maiores médias de porcentagem dos sintomas ocorreram no genótipo SP903414 submetido ao tratamento 3 (Oxyfluorfen (Goal) (6ml/l)), com 80% da superfície foliar com sintoma (tabela 6). Esta observação evidencia que a não utilização dos compostos antioxidantes (vitamina C e E) e precursores da rota metabólica (glutamato) causa aumento dos níveis de danos causados nas folhas pela formação do oxigênio singleto. A adição das vitaminas C e E (α -tocoferol), como ação antioxidante, tiveram como objetivo reverter os efeitos do oxigênio singleto produzido quando há interação da Proto IX com Oxigênio e luz. Já a adição do glutamato garantiu o suprimento por compostos precursores, sendo ele, o principal precursor da síntese de porfirinas em plantas. Para os tratamentos 2 e 8, que superaram os demais no acúmulo de protoporfirina IX, foram os que apresentaram médias mais baixas de sintomas (tabela 6), comprovando a hipótese acima da ação dos antioxidantes e precursor. Outro fator relevante observado foi que no tratamento 8 os inibidores de protox (oxyfluorfen e carfentrazone) não estão presentes, atuando somente o precursor (ácido levulênico) e antioxidantes (vitamina C e E), portanto são necessários maiores estudos, uma vez que, pode se tornar uma alternativa interessante na produção de protoporfirina IX, pelo baixo custo e baixa toxicidade.

6.11 Experimento III: “Efeito de diferentes fotoperíodos sobre o acúmulo de protoporfirina IX submetidos à aplicação de herbicidas inibidores da Protox, precursores e antioxidantes.”

Para o acúmulo de Protoporfirina IX, os maiores teores significativos foram observados no tratamento 4, escuro (tabela 7). Este resultado é explicado pela instabilidade e alta capacidade da Proto IX produzir Oxigênio singlete na presença de luz. No escuro, tanto a Proto IX quanto os tecidos das plantas foram preservados.

Os teores de Proto IX foram bastante variáveis nos tecidos. Mesmo nos tratamentos com maior produção de porfirinas, parte dos tecidos se manteve sem a presença de sintomas que indicassem a presença destes compostos (tabela 8).

Um sensível acúmulo de Proto IX pôde ser detectado em fatias de cotilédones de pepino e em toda planta de *Lemna pausicostata* dentro de trinta minutos de exposição ao herbicida de difenil ether (Becerril and Duke 1989a, Matsumoto and Duke 1990). Esta acumulação pode ser monitorada na escuridão sem danos fotodinâmicos nas células das plantas ou fotodegradação da Proto IX, relativo a um pigmento fotolábil. Em plantas de *L. pausicostata*, o aumento da acumulação de Proto IX, finalizou dentro de duas horas no escuro; entretanto, em cotilédones de pepino o acúmulo continuou por muito mais tempo. Em outras plantas de pepino o herbicida causou acúmulo muito baixo de Proto IX ou ausente no escuro quando comparado com ao acúmulo no claro (Mastringe & Sealla, 1988b, Mayasich *et al.*, 1990, Nandihalli *et al.*, 1991).

Tabela 7: Médias transformadas (raiz quadrada) das concentrações de porfirinas em folhas de cana, em função de diferentes condições de fotoperíodo. FCA/UNESP/Botucatu – 2008.

tratamentos	Tratamentos						
	1	2	3	4	5	6	7
1 hora de luz	2,307209 Aa	2,149830 Aa	2,967978 Aa	2,430501 Ba	1,821367 Aa	3,036618 Aa	2,914006 ABa
15 min. de luz	2,078689 Aa	2,745356 Aa	2,580331 Aa	2,265515 Ba	3,076739 Aa	2,351680 Aa	3,158059 Aa
5 min. de luz	2,275764 Aa	2,393847 Aa	2,491393 Aa	3,092639 Ba	2,078689 Aa	1,609476 Aa	2,228519 ABa
Claro	2,412023 Aa	2,354832Aa	2,552285 Aa	2,372629 Ba	2,687086 Aa	3,092639 Aa	1,824045 ABa
Escuro	2,228519 Abc	3,048351 Abc	1,816497 Abc	4,838275 Aab	3,203051 Abc	1,910684 Abc	1,520159 Cc
F (tratamento)	1,93 ns						
F (doses)	0,82 ns						
F (trat x doses)	2,89 **						
CV (%)	25,91						
D.M.S.	0,74						

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns – não significativo.

Tabela 8. Médias das concentrações não transformadas de porfina ($\mu\text{g/g}$) em genótipos de cana-de-açúcar submetidos a diferentes tratamentos e Escala percentual média de sintomas visuais (0-100%). FCA – Unesp – Botucatu/SP, 2008

Variedade	Tratamento	Claro		1 hora de luz		Escuro		15 minutos de luz		5 minutos de luz	
		Proto IX	%Injúria	Proto IX	%Injúria	IX	%Injúria	Proto IX	%Injúria	Proto IX	%Injúria
SP903414	1	0	46,25	5,3942	53,75	4,8858	0	4,6414	0	5,2242	0,5
SP903414	2	5,6494	28,75	4,4958	29	9,4492	0	7,557	0	6,118	0,5
SP903414	3	6,6216	14	9,3452	14	3,2902	0	6,6488	0	6,4772	0,5
SP903414	4	5,7498	5,25	5,97	4	28,0196	0	5,2412	0	10,1124	0,25
SP903414	5	7,068	4	3,2698	0,25	10,379	0	9,8376	0	4,6808	0
SP903414	6	10,4256	11,5	9,1146	3,75	8,6096	0	6,348	0,25	3,4996	0
SP903414	7	2,7268	16,25	3,6508	10	10,2624	0	5,0752	0,25	6,234	0
Média		5,463029	18	5,891486	16,39286	10,6994	0	6,478457	0,071429	6,0494571	0,25

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de alteração de rotas metabólicas de plantas para acúmulo de substâncias nutraceuticas com uso de inibidores metabólicos ainda é um desafio a ser superado, uma vez que, no Brasil as pesquisas utilizando plantas para tais fins ainda são muito escassez.

A análise conjunta dos ensaios conduzidos indica que as metodologias utilizadas mostraram-se adequadas aos objetivos do trabalho, permitindo avaliar os melhores tratamentos e conjuntos de condições para o acúmulo de protoporfirina IX e precursores (5-aminolevulênico, Uroporfirina e Coproporfirina) em plantas de alface, milho e cana-de-açúcar.

Os teores de Proto IX foram bastante variáveis nos tecidos em ambas as espécies estudadas. Mesmo nos tratamentos com maior produção de protoporfirinas, parte dos tecidos se mantinha sem a presença de sintomas que indicassem a presença destes compostos. Em termos médios, o maior valor encontrado foi o de 130,83ug/g de matéria fresca, bastante superior aos valores máximos (6,92ug/g) encontrados em literatura (Sherman et al, 1991). Considerando as repetições deste tratamento, a maior concentração encontrada foi de 262.50ug/g (0,02625%). Quando a amostragem dos tecidos foi direcionada a pontos com coloração intensa, seguida da extração e injeção imediata no cromatógrafo, a máxima concentração de Proto IX na biomassa foi de 0,26% com base em peso fresco e 0,77% com base em peso seco. Este procedimento de extração e análise imediata é inviável para uso em

um grande número de amostras em função da duração de cada cromatograma (de 20 a 50 minutos) mas é viável para ser utilizado na definição do melhor conjunto de condições para a indução do acúmulo de porfirina.

A análise dos resultados obtidos indica que, utilizando os tratamentos indutores corretos e a espécie e/ou variedade adequada, a obtenção de Proto IX ou seus precursores a partir da biomassa de plantas é técnica e provavelmente viável. O custo dos tratamentos avaliados é bastante baixo. As condições de cultivo são simples e a espécie selecionada é rústica.

8. CONCLUSÕES

Em função dos experimentos realizados conclui-se que, as condições de luz, sem filtro (luz direta) e com filtro amarelo favorecem o aumento das concentrações de protoporfina IX e 5-ALA respectivamente, em plantas de alface.

A solução contendo Carfentrazone (Aurora) + Glutamato Monossódico + Vitamina C e E, no genótipo SP903414 de cana-de-açúcar demonstraram ser favoráveis ao acúmulo de protoporfina IX sem a presença de luz e em curto período de exposição.

Os genótipos de cana-de-açúcar, RB470355, SP903414 e SP701143 são promissoras fontes acumuladoras de protoporfina IX, quando submetidas à solução de Oxyfluorfen (Goal) + Glutamato Monossódico + Vitamina C e E + Ácido levulênico, ou somente submetidas à Vitamina C e E + Ácido levulênico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAIMO, P.J.; SHOGREN-KNAACK, M.A.; SHOKAT, K.M. Chemical genetic approaches for the elucidation of signaling pathways. **Curr Opin Chem Biol**, v.5, n.36, p. 0–367, 2001.

ALEXIADES-ARMENAKAS, M. Laser-mediated photodynamic therapy. **Clin. Dermatol.** v.24, n.1, p.16-25, 2006.

ATAMNA, H.; FREY II, W.H. A role for heme in Alzheimer's disease: Heme binds amyloid β and has altered metabolism. **PNAS**, v.101, n.30, p.11153-58. 2004.

ATAMNA, H. et al. Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging. **Proc. Natl. Acad> Sci. USA.** , v.99, n.23, p.14807-12, 2002.

BAKOS, R.M.; et al. Terapêutica fotodinâmica com ácido delta-aminolevulínico em neoplasias queratinocíticas superficiais. Na. **Brás. Dermatol.**, v.28, n.2, 11p. 2003.

BECERRIL, J.M.; DUKE, S.O. Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. **Plant Physio.** v.35, p.119-126. 1989.

BHASIN, G.; KAUSAR, H.; ATAR, M. Protoporphyrin-IX accumulation and cutaneous tumor regression in mice using a ferrochelatase inhibitor. **Cancer Lett.**, v.187, n.1-2, p.9-16. 2002.

BIOSYNTH. Biosynthesis principles for 5-aminolevulinic acid and its ester derivatives. **Biochemica & Synthetica.** 2006. Disponível em http://www.biosynth.com/index.asp?topic_id=212.

BOOGERT VAN DEN, J.; et al. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tissues: pharmacokinetics after oral or intravenous administration. **J. Photochem Photobiol. B.**, v.44, n.1, p.29-38. 1998.

BOYLE, R.W.; DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochem. Photobiol.** V.64, n. 3, p.469-85. 1996.

BYRNE, C.J.; MARSHALLSAY, L.V.; WARD, A.D. The composition of Photofrin II. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.6, n.1-2, p.13-27. 1990.

CASTELLANE, P.D.; ARAUJO, J.A.C. **Cultivos sem solo - Hidroponia.** 4^a ed. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 43 p.

CALZAVARA-PINTON, P.G.; et al. Photodynamic therapy with systemic administration of photosensitizers in dermatology. [Journal of Photochemistry and Photobiology Biology.](#) v.36, n. 2, p. 225-31. 1996.

DAILEY, H.A.; SMITH, A. Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. **Biochem. J.**, v.223, n.2, p.441-5.1984.

DALTON, J.T.; et al. Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer. **J. Pharmacol. Exp.**, v.301, n.2, p.507-12. 2002.

DODGE, A D. Photosynthesis. In: **Ralph C. Kikwood. Target Sites for Herbicide Action. University of Stranthclyde**, Glasgow, United Kingdom. 1992. p. 1-27.

DYSART, J.S.; PATTERSON, M. S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. **Phys. Med. Biol.** v.50, n.11, p.2597-616. 2005.

DUKE, S.O., et al. Photosensitizing porphyrins as herbicides. **Am. Chem. Soc. Symp. Ser.** n.449, p..371. 1990.

EBERT, P.S.; HESS, R.A.; TSCHUDY, D.P. Augmentation of hematoporphyrin uptake and in vitro-growth inhibition of L1210 leukemia cells by succinylacetone. **J. Natl. Cancer Inst.** V.74, n.3, p.603-8. 1985.

GAHLEN, J.; et al. Systemic vs local administration of delta-aminolevulinic acid for laparoscopic fluorescence diagnosis of malignant intra-abdominal tumors. **Experimental study. Surg. Endosc.**, v.15, n.2, p.196-9. 2001.

GOSSNER, L.; et al. A new long-range through-the-scope balloon applicator for photodynamic therapy in the esophagus and cardia. **Endoscopy**, v.31, n.5, p.370-6. 1999.

GOSSNER, L.; et al. Photodynamic destruction of high grade dysplasia and early carcinoma of the esophagus after the oral administration of 5-aminolevulinic acid. **Cancer.** v.86, n.10, p.1921-8. 1999.

GOSSNER, L.; et al. Photodynamic Therapy of early squamous epithelial carcinomas and severe squamous epithelial dysplasias of the esophagus with 5-aminolevulinic acid. **Z. Gastroenterol.** v.36, n.1, p.19-26. 1998.

GOSSNER, L; et al. Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barret's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid. **Gastroenterology**, v.114, n.3, p.448-55. 1998.

GRONLUND-PAKKANEN S.; et al. The fluorescence biodistribution and kinetics of aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in the bladder of a rat model with orthopic urothelial carcinoma. **J. Urol.**, v. 167, n.4, p.1848-53. 2002.

HESS, F.D. Herbicide effects on plant structure, physiology and biochemistry. In: ALTMAN, J. **Pesticide Interactions in Crop Production Beneficial and Deleterious Effects**. CRC Press, London. 1993. 579p.

HEYERDAHL, H.; et al. Pharmacokinetic studies on 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tumors and normal tissues. **Cancer Lett.**, v.112, n.2, p.225-31. 1997.

HORN, M.; et al. Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy in patients with basal cell carcinoma prone to complications and poor cosmetic outcome with conventional treatment. **Br. J. Dermatol.** , v.149, n.6, p.1242-9. 2003.

IGBASEIMOKUMO, U. Quantification of in vivo Photofrin uptake by human pituitary adenoma tissue. **J. Neurosurg**, v.101, n.2, p.272-7. 2004.

KARRER, S.; et al. Role of lasers and photodynamic therapy in the treatment of cutaneous malignancy. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v.2, n.4, p.229-37. 2001.

KOLLER, M.; ROMSLO, I. Uptake of protoporphyrin IX by isolated rat liver mitochondria. **Biochem. J.**, v.188, p.329-35. 1980.

KRIEG, R.C.; et al. Metabolic characterization of tumor cell-specific protoporphyrin IX accumulation after exposure to 5-aminolevulinic acid in human colonic cells. **Photochem. Photobiol.**, v.76, n.5, p.518-25. 2002.

KRISTIANSSON, S.; et al. Kinetics of protoporphyrin IX formation in rat oral mucosa and skin after application of 5-aminolevulinic acid and its methylester. **Photochem. Photobiol.** v.81, n.2, p.394-7. 2005.

LYDON J., DUKE S.O. Porphyrin synthesis is required for photobleaching activity of the p-nitrosubstituted diphenyl ether herbicides. **Pestic Biochem Physiol** 37: 239-248. 1998.

LOH, C.S.; et al. Oral versus intravenous administration of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. **Br. J. Cancer.** v.68, n.1, p.41-51. 1993.

MAIER, M.; PINDL, K. Investigation of the physical principles of the generation of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) during the photodynamic therapy of tumors and other skin diseases. Disponível em http://www.physik.uni-regensburg.de/forschung/maier/sauerstoff/singulett_e.html . 2006.

MANIVASAGER, V.; et al. A study of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester used in vitro and in vivo systems of human bladder cancer. **Int. J. Oncol.**, v.22, n.2, p. 313-8. 2003.

MASTRINGE, M.; CLAIR, D.; SCALLA R. Effects of peroxidizing herbicides on protoporphyrin IX levels in non-chlorophyllous soybean cell culture. **Pestic Biochem Physiol.** n.36, p.300-307. 1990.

MASTRINGE, M.; SCALLA, R. Studies on the mode of action of acifluorfen-methyl in non chlorophyllous soybeans cell culture. **Pestic Biochem Physiol.** n.36, p.300-307. 1988a.

MASTRINGE, M.; SCALLA, R. Effects of acifluorfen-methyl on cucumber cotyledons: protoporphyrin accumulation. **Pestic Biochem Physiol** .n.32, p164-172. 1988b.

NELSON, D.L., COX, M.M. LEHNINGER. **Principles of Biochemistry**. 3 ed. New York: Worth Publishers. 2000.1152p.

OHGARI, Y., et al. Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. **Biochem. Pharmacol.** ,v. 71, n.1-2, p.42-9. 2005.

ONCOLOGY TOOLS: Product Label. Disponível em <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/onctools/summary.cfc?ID=145>.

PEACH, O.; et al. Photodynamic therapy of human Barrett's cancer using 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX: an in-vivo dosimetry study in athymic nude mice. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v.14, n.6, p.657-62. 2002.

PEACH, O ; et al. Long-term results of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for superficial. **Barrett's cancer and high-grade intraepithelial neiplasia**. v.62, n.1, p.24-30. (2005).

PORPHYRIN. **Wikipedia, the free encyclopedia**. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Porphyrin>.

RIBEIRO, J.N.; JORGE, R.A Determinação do mecanismo de destruição de células mediado por meso-tetramesitylprofirina, octaetilporfirina de vanadil e luz visível. **Eclet. Quím.** v.30, n. 1, 10 p. 2005.

ROBERTS, D.J.; CAIRNDUFF, F. **Photodynamic therapy of primary skin cancer: a review**. v.48, n. 6, p.360-70. 1995.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**. 5a Ed. Londrina. . 2005. 592p

SANDMAM, G.; BÖGER, P. Accumulation of protoporphyrin IX in the presence of peroxidizing herbicides. **Z. Naturforsch** v.43, p.699-704. 1988.

STOCKWELL, B.R. Chemical genetics: ligand-based discovery of gene function. **Nat Rev Genet** n.1, p116–125. 2000.

SHO GREN-KNAAK M.A.; ALAIMO, P.J.; SHOKAT, K.M. Recent advances in chemical approaches to the study of biological systems. **Annu Rev Cell Dev Biol** n.17, p.405–433. 2001.

SROKA, R.; et al. Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic-acid-induced porphyrins in tumor-bearing mice. **J. Photochem. Photobiol.** v.34, n.1, p.13-9. 1996.

TUNSTALL, R.G.; et al. Porphyrin accumulation induced by 5-aminolevulinic acid esters in tumor cells growing in vitro and vivo. **Br. J. Cancer.** v.87, n.2, p.246-50. 2002.

Typical UV-visible absorption spectrum of a porphyrin.
<http://www.washburn.edu/cas/chemistry/sleung/porphyrin/uv-vis.html>.

VAN HILLEGERSBERG, R.; et al. Selective accumulation of endogenously produced porphyrins in a liver metastasis model in rats. **Gastroenterology**, v.103, n.2, p.647-51. 992).

VELINI, E. D., et al. Eucalyptus ESTs corresponding to the protoporphyrinogen IX oxidative enzyme related to the synthesis of heme, chlorophyll and to the action of herbicides. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.3 (Supl.), p.548-554. 2005.

WATANABE, N.; et al. Dual targeting of spinach Protoporphyrinogen Oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of in-frame initiation codons. **The Journal of Biological Chemistry.**, v.273, n.23, p.20447-81. 2001.

WITKOWSKI, D.A.; HALLING, B. P. Inhibition of plant protoporphyrinogen oxidase by the herbicide acifluorfen methyl. **Plant physiol.** n.90, p.1239-1242. 1989.

WELLER, S. Photosystem II Inhibitors. In: **Herbicide Action Course**. Purdue University, West Lafayette. 2002. p. 127-80.

XIAO, Z.; et al. Biodistribution of Photofrin II and amino-levulinic acid-induced protoporphyrin IX in normal rat bladder tumor models: implications for photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.67, n.5, p.573-83. 1998.