

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MAYNNE DUARTE SURIANI FRANCO

Derivados de Protoporfirina IX funcionalizadas com
piperazina e morfolina visando potencializar a atividade
fotodinâmica

UBERLÂNDIA - MG

2023

MAYNNE DUARTE SURIANI FRANCO

Derivados de Protoporfirina IX funcionalizadas com
piperazina e morfolina visando potencializar a atividade
fotodinâmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Prof.^a Dra. Tayana Mazin Tsubone.

Coorientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior

UBERLÂNDIA - MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

F825
2023

Franco, Maynne Duarte Suriani, 1993-
Derivados de Protoporfirina IX funcionalizadas com
piperazina e morfolina visando potencializar a atividade
fotodinâmica [recurso eletrônico] / Maynne Duarte
Suriani Franco. - 2023.

Orientadora: Tayana Mazin Tsubone.
Coorientadora: Celso de Oliveira Rezende Júnior.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.236>
Inclui bibliografia.

1. Química. I. Tsubone, Tayana Mazin, 1989-, (Orient.).
II. Rezende Júnior, Celso de Oliveira, 1987-,
(Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

| | | | | | |
|------------------------------------|---|-----------------|-------|-----------------------|-------|
| Programa de Pós-Graduação em: | Química | | | | |
| Defesa de: | Dissertação de Mestrado Acadêmico, 371, PPGQUI | | | | |
| Data: | Treze de abril de dois mil e vinte e três | Hora de início: | 14:00 | Hora de encerramento: | 17:00 |
| Matrícula do Discente: | 12022QMI014 | | | | |
| Nome do Discente: | MAYNNE DUARTE SURIANI FRANCO | | | | |
| Título do Trabalho: | "Derivados de Protoporfirina IX funcionalizadas com piperazina e morfina visando potencializar a atividade fotodinâmica." | | | | |
| Área de concentração: | Química | | | | |
| Linha de pesquisa: | Química Medicinal e Fotobiologia | | | | |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | "Avaliação da estrutura-atividade de novos fotossensibilizadores visando aplicação em Terapia Fotodinâmica" | | | | |

Reuniu-se por meio de webconferência link: <https://meet.google.com/zvc-hjfv-cde>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Thiago Teixeira Tasso, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) do Departamento de Química; Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, Universidade Federal de Uberlândia (UFU)/Instituto de Biotecnologia e Tayana Mazin Tsubone, orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dra. Tayana Mazin Tsubone, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Tayana Mazin Tsubone, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/04/2023, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

https://www.sei.ufu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=4934991&infra_siste... 1/2
 14/04/2023, 08:20 SEI/UFU - 4406871 - Ata



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/04/2023, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Teixeira Tasso, Usuário Externo**, em 13/04/2023, às 18:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4406871** e o código CRC **4DDE4A16**.

Dedico este trabalho à Deus,
meu esposo e filho, meus pais,
familiares e amigos,
pelo estímulo, carinho e orações.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela vida, saúde e por todo o bem que tem feito na minha vida, sem Ele não sou nada.

Agradeço ao meu esposo, Matheus, que sempre me incentivou e sempre teve palavras de ânimo para que eu alcançasse os meus objetivos; ao meu filho Benjamin que é meu refúgio, seu abraço tem me dado forças para continuar buscando o melhor, obrigada aos dois pela paciência e compreensão.

Aos meus pais, aos meus irmãos, cunhada, avós, tios e primos por sempre se disponibilizarem para me ajudar no que fosse preciso e sempre orarem e torcerem por mim.

Agradeço a minha orientadora, Tayana Mazin, que sempre esteve buscando recursos para nos ajudar, com você aprendi que o esforço sempre valerá a pena, obrigada pela compreensão e por permitir fazer parte de um grupo que sempre vou levar no meu coração. Agradeço também ao meu coorientador, Celso Rezende, por todo aprendizado, compreensão, confiança e por vibrar em cada conquista. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento profissional.

As companheiras de mestrado e amigas que fiz, Tayná e Patricia, sem vocês a pesquisa não teria sido tão divertida! Compartilhamos nossas dificuldades, inseguranças, várias horas de trabalho e com certeza, o trabalho em grupo ficou mais leve junto com vocês.

Agradeço também pela amizade e companheirismo de Ieda, Raphael, Douglas, Meire, Mayara, Nayara e aos colegas de laboratório, Larissa, Victor, Thibault, Nelsa e tantos outros que trouxeram leveza para o dia a dia e me ajudaram de alguma forma.

Aos meus amigos de longa data e as amigas da graduação que sempre estiveram presentes na minha vida.

A Prof. Renata Galvão, e as mestres Mayara Caetano e Nayara Bessas, que me receberam com tanto carinho e disposição em Ituiutaba.

Ao Prof. Dr. Marcelo Belletti e Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva por ceder a sala para o cultivo celular.

Ao Prof. Dr. Maurício Baptista (Instituto de Química da USP) por ter cedido as células de carcinoma do colo do útero humana (HeLa).

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Química e seus

funcionários.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A agência de fomento FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa (Projeto Universal APQ-00704-21).

Ao PROAP pelo auxílio para participar do 51º Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology junto ao 46º Congress of the Brazilian Biophysical Society.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida (Processo 130836-2022-2).

RESUMO

No presente trabalho, investigou-se as propriedades fotofísicas, a interação com a proteína Albumina Sérica Humana (HSA), incorporação, citotoxicidade e fototoxicidade em células tumorais do tipo HeLa de dois derivados inéditos da Protoporfirina IX (PpIX) para a aplicação na Terapia Fotodinâmica (TFD). A modificação da estrutura ocorreu nas ramificações da PpIX onde foi adicionado porções de piperazina ou morfolina a fim de promover efeito sinérgico, aumentando sua fotoatividade e, conseqüentemente sua fototoxicidade. Para isso, os derivados nomeados PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina foram caracterizados por técnicas espectroscópicas e estudos fotofísicos como, a determinação do coeficiente de absorvidade molar, rendimento quântico de fluorescência e oxigênio singlete, assim como também, foram avaliadas possíveis reações de fotobranqueamento com uso do LED. Em comparação com a molécula precursora PpIX, foi possível observar que as modificações estruturais realizadas não trouxeram grandes variações nas características espectroscópicas e fotofísicas dos novos derivados da PpIX. Estudos de agregação em misturas de água/metanol e água/DMSO também foram explorados, para fim de compreender o comportamento destas moléculas em meio aquoso, ambiente majoritário de células vivas, onde foi possível perceber que as mudanças nas ramificações da PpIX trouxeram melhora na solubilidade da PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina em meio aquoso comparado a PpIX. Também foi estudado o grau de interação da HSA junto dos compostos porfirínicos, já que ela permite a ligação de uma ampla gama de compostos endógenos e exógenos e possibilita o transporte de moléculas dentro do corpo humano onde observou-se uma interação apenas com a PpIX-Metil-Piperazina. E ainda, realizou-se um estudo de incorporação, citotoxicidade e fototoxicidade em células tumorais do tipo HeLa para avaliar a aplicabilidade destes novos compostos na TFD, onde foi possível observar uma maior fototoxicidade de ambas as moléculas em comparativo com a PpIX, tornando as novas moléculas excelentes candidatos a Terapia Fotodinâmica.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, porfirinas, fototoxicidade, células tumorais.

ABSTRACT

In the present work, we investigated the photophysical properties, the interaction with the Human Serum Albumin (HSA) protein, incorporation, cytotoxicity and phototoxicity in HeLa-type tumor cells of two novel derivatives of Protoporphyrin IX (PpIX) for application in Photodynamic Therapy (PDT). The modification of the structure occurred in the ramifications of PpIX where portions of piperazine or morpholine were added in order to promote a synergistic effect, increasing its photoactivity and, consequently, its phototoxicity. For this, the derivatives named PpIX-Methyl-Piperazine and PpIX-Morpholine were characterized by spectroscopic techniques and photophysical studies such as the determination of the molar absorptivity coefficient, quantum yield of fluorescence and singlet oxygen, as well as possible reactions of photobleaching using LED performing the comparison with the precursor molecule PpIX, where it was possible to observe that the modifications carried out did not bring great variations in the spectroscopic and photophysical characteristics of the new PpIX derivatives. Aggregation studies in water/methanol and water/DMSO mixtures were also explored, in order to understand the behavior of these molecules in aqueous medium, the majority environment of living cells, where it was possible to perceive that changes in the ramifications of PpIX brought improvement in solubility of PpIX-Methyl-Piperazine and PpIX-Morpholine in aqueous media compared to PpIX. The degree of interaction of HSA with porphyrin compounds was also studied, since it allows the binding of a wide range of endogenous and exogenous compounds and allows the transport of molecules within the human body where an interaction was observed only with PpIX- Methyl-Piperazine. Furthermore, a study of incorporation, cytotoxicity and phototoxicity in HeLa-type tumor cells was performed to evaluate the applicability of these new compounds in PDT, where it was possible to observe a larger phototoxicity of both molecules in comparison with PpIX, making the new molecules excellent candidates for Photodynamic Therapy.

Keywords: Photodynamic Therapy, porphyrins, phototoxicity, tumor cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Diagrama de Jablonski. | 2 |
| Figura 2 - Estrutura do anel macrociclo básico de porfirinas. | 6 |
| Figura 3 - Estrutura do oligômero do Photofrin®..... | 7 |
| Figura 4- Estrutura da piperazina..... | 8 |
| Figura 5- Estrutura da morfolina..... | 9 |
| Figura 6 - Aspecto geral do espectro de absorção de uma porfirina base livre em etanol. | 11 |
| Figura 7 - Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) dos estados singlete fundamental e excitado e do estado tripleto fundamental..... | 14 |
| Figura 8 - (A) A relação entre o tempo de vida, o nível de reatividade e a distância de difusão para EROs comuns nas células. (B) Ilustração das dimensões das células, organelas e membranas. | 15 |
| Figura 9 - Representação da estrutura proteica da Albumina do Soro Humano em laranja e do resíduo de aminoácido Trp ²¹⁴ em verde no subdomínio IIA..... | 18 |
| Figura 10 - Representação esquemática de uma micela esférica de copolímero em bloco (Pluronic®)..... | 22 |
| Figura 11 - (A) Estrutura da PpIX comercial; (B) Estrutura da PpIX-Metil-Piperazina e (C) Estrutura da PpIX-Morfolina..... | 25 |
| Figura 12 - Espectrofotômetro portátil - Oceanoptics. | 28 |
| Figura 13 - LED verde utilizado como sistema de irradiação..... | 30 |
| Figura 14 - Sobreposição dos espectros de absorção do derivado de PpIX e emissão do LED verde..... | 31 |
| Figura 15 - Reação do $^1\text{O}_2$ com o DPBF. | 32 |
| Figura 16 - Representação de microplaca para cultivo celular de 12 poços. | 36 |
| Figura 17 - Representação de microplaca para cultivo celular de 48 poços. | 37 |
| Figura 18 - Síntese da PpIX-Metil-Piperazina realizada no LasFar. | 42 |
| Figura 19 - ^1H RMN da PpIX-Metil-Piperazina (400 MHz, CDCl_3)..... | 43 |
| Figura 20 - ^{13}C RMN da PpIX-Metil-Piperazina (101 MHz, CDCl_3)..... | 44 |
| Figura 21 - Espectro obtido referente a técnica de electrospray da PpIX-Metil-Piperazina. | 44 |
| Figura 22 - Síntese da PpIX-Morfolina realizada no LasFar. | 45 |
| Figura 23 - ^1H RMN da PpIX-Morfolina. (400 MHz, CDCl_3)..... | 46 |

| | |
|---|----|
| Figura 24 - ^{13}C RMN da PpIX-Morfolina. (100 MHz, CDCl_3). | 47 |
| Figura 25 - Espectros obtidos pelo método MALDI-TOF para PpIX-Morfolina. | 47 |
| Figura 26 - Espectros de absorção eletrônica (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina em diferentes solventes. | 48 |
| Figura 27 - Espectros de absorção eletrônica de UV-vis com intensidades normalizadas, obtidos em diferentes solventes orgânicos: (A) Pp IX -Metil -Piperazina e (B) PpIX-Morfolina..... | 51 |
| Figura 28 - Espectro de absorção da PpIX em DMSO em dias diferentes..... | 53 |
| Figura 29 - Espectros de absorção UV-Vis da (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina em diferentes concentrações em metanol. | 54 |
| Figura 30 – Representação gráfica dos valores de absorbância em função da concentração da (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina no comprimento de onda máximo da banda Soret ($\approx 400\text{ nm}$). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo cada ponto o valor da média e a barra de erro o desvio padrão..... | 55 |
| Figura 31 - Espectros de emissão de fluorescência da (A) PpIX, (B) PpIX-Metil-Piperazina e (C) PpIX-Morfolina em metanol ($\lambda_{\text{exc}} = 408\text{ nm}$, fenda de excitação 5 nm e fenda de emissão 10 nm)..... | 57 |
| Figura 32 - Representação gráfica da integral da área do espectro de emissão em função da absorbância em 408 nm para PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina em metanol..... | 58 |
| Figura 33 - Espectro de absorção UV-Vis da (A) 10 μM PpIX-Metil-Piperazina e (B) 9 μM PpIX-Morfolina em metanol sob irradiação com LED Verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$), potência 2,266 mW à 0,2 cm de distância da amostra..... | 60 |
| Figura 34 - Representação gráfica do espectro de absorção UV-Vis em torno de 400,0 nm da (A) 10 μM PpIX-Metil-Piperazina e (B) 9 μM PpIX-Morfolina em metanol sob irradiação com LED Verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522\text{ nm} \pm 10\text{ nm}$), potência 2,266 mW à 0,2 cm de distância da amostra..... | 60 |
| Figura 35 - Espectros de fluorescência do decaimento da sonda DPBF em metanol e para (A) PpIX-Metil-Piperazina (0,8 μM) e (B) PpIX-Morfolina (0,7 μM) em metanol em 32 segundos. | 62 |
| Figura 36 - Representação gráfica dos valores do logaritmo em função do tempo em segundos para (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina. | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 37 - Decaimento da sonda DPBF com o corante RB e regressão linear do decaimento do oxigênio singleto para o corante RB. | 63 |
| Figura 38 - Espectros de absorção da (A) 11 μM de PpIX, (B) 10 μM de PpIX-Metil-Piperazina e (C) 8 μM de PpIX-Morfolina em diferentes proporções água/metanol (v/v). | 66 |
| Figura 39 - Variação da absorbância da (A) PpIX, (B) PpIX-Metil-Piperazina e (C) PpIX-morfolina em 400nm em diferentes % água/metanol. | 66 |
| Figura 40 - Espectros de absorção da (A) PpIX, (B) PpIX-Metil-Piperazina e (C) PpIX-Morfolina em diferentes proporções água/DMSO (v/v). | 68 |
| Figura 41 - Variação da absorbância em 407 nm da (A) PpIX, (B) PpIX-Metil-Piperazina e (C) PpIX-Morfolina em diferentes % água/DMSO. | 69 |
| Figura 42 - Espectros de absorção eletrônica e fluorescência da HSA (100 μM) em tampão PBS, pH 7.4. | 70 |
| Figura 43 - Espectro de fluorescência da solução de HSA (100 μM) em PBS pH 7,4 sob adições sucessivas de (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina. Temperatura = 35°C, λ_{exc} = 280nm, fendas de excitação e emissão de 5 nm e 20 nm. | 70 |
| Figura 44 - Gráficos de Stern-Volmer da interação (A) [PpIX-Metil-Piperazina] - HSA e (B) [PpIX-Morfolina] -HSA, em tampão PBS pH 7,4, temperatura = 35°C, λ_{exc} = 280 nm, fendas de excitação e emissão de 5 nm e 20 nm. | 72 |
| Figura 45 - Gráficos de $\log[(F_0/F) / F]$ em função de (A) \log [PpIX-Metil-Piperazina] e (B) \log [PpIX-Morfolina]. HSA 100 μM em tampão PBS pH 7.4; λ_{exc} = 280nm, fendas de excitação e emissão de 5 nm e 20 nm, respectivamente. | 72 |
| Figura 46 - Espectros de absorção eletrônica da HSA (100 μM) em tampão PBS em presença de (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina em DMSO. | 74 |
| Figura 47 - Fluorescência da solução de HSA (100 μM) em PBS e (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina, λ_{exc} = 408 nm, fendas excitação e emissão de 5 nm e 10 nm, respectivamente. | 75 |
| Figura 48 - Representação gráfica da intensidade em determinado comprimento de onda em razão da concentração de (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina em presença de HSA (100 μM), λ_{exc} = 408 nm, fendas excitação e emissão de 5 nm e 10 nm, respectivamente. | 75 |

Figura 49 - % Incorporação celular das porfirinas 10 μ M incubados por 24 horas em células HeLa. As barras representam a média \pm desvio médio de dois experimentos independentes com 4 repetições em cada experimento (n = 8). 76

Figura 50 - % Viabilidade celular em função da concentração (μ M) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina após 24 hs de incubação no escuro em HeLa. As barras representam a média \pm desvio médio de três experimentos independentes com repetições em cada experimento (n=7). 78

Figura 51 - % Viabilidade celular em função da concentração (nM) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina após 24 hs de incubação e irradiação com LED verde ($\lambda_{\text{máx}}$ = 522 nm \pm 10 nm, dose de luz \approx 2 J/cm²) em HeLa e viabilidade celular versus log [concentração] da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina para determinação do IC₅₀ com irradiação em HeLa. As barras representam a média \pm desvio médio de quatro experimentos independentes com repetições em cada experimento (n=11). 79

Figura 52 - % Viabilidade celular em função da concentração (nM) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina após 24 hs de incubação no escuro em HeLa. (A) Formulado P407 e (B) Formulado P407-CMC. As barras apresentam a média \pm desvio médio de dois experimentos independentes com repetições em cada experimento (n = 6). 81

Figura 53 - % Viabilidade celular em função da concentração (nM) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina após 24 hs de incubação e irradiação com LED verde ($\lambda_{\text{máx}}$ = 522 nm, dose \approx 2 J/cm²) em HeLa. (A) Formulado P407 e (B) Formulado P407-CMC. As barras representam a média \pm desvio médio de dois experimentos independentes com repetições em cada experimento (n=6). 82

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Reações que ocorrem durante a ação fotodinâmica. | 3 |
| Tabela 2 - Proporção para solubilização dos formulados. | 41 |
| Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos dos solventes. | 49 |
| Tabela 4 - Valores máximos de absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$) e do coeficiente de absortividade molar (ϵ) obtidos para as porfirinas em metanol. | 55 |
| Tabela 5 - Valores de máximos de emissão de fluorescência dos derivados de PpIX em metanol. | 57 |
| Tabela 6 – Rendimento quântico de fluorescência dos FSs em metanol. | 58 |
| Tabela 7 - Rendimento quântico de oxigênio singleto ($\phi\Delta$) dos FSs em metanol. | 63 |
| Tabela 8 - Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante associação (K_b) e número de sítios de ligação (n) dos derivados de PpIX com HSA (solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HSA em tampão PBS, pH 7.4). | 73 |
| Tabela 9 - Valores de IC_{50} (nM) com irradiação de LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 2 \text{ J/cm}^2$) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina na linhagem celular HeLa. | 80 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FS - Fotossensibilizador

TFD - Terapia Fotodinâmica

EROs - Espécies reativas de oxigênio

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio singleto

S – Substrato

$\text{O}_2^{\bullet-}$ - Ânion superóxido

$^3\text{O}_2$ - Oxigênio no estado fundamental

Hp IX - Hematoporfirina IX

PpIX - Protoporfirina IX

PpIX-Metil-Piperazina - Protoporfirina IX-Metil-Piperazina

PpIX-Morfolina - Protoporfirina IX-Morfolina

LEDs - Diodos emissores de luz

DMF - Dimetilformamida

EDC - 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

HOBt – Hidroxibenzotriazol

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

DCM - Diclorometano

MeOH - Metanol

DMSO – Dimetilsulfóxido

HSA - do inglês, Human Serum Albumin

Trp₂₁₄ -Triptofano

CMC - carboximetilcelulose

P407 - poloxâmero 407

DPBF - 1,3-difenilisobenzofurano

RB - Rosa de Bengala

PBS - Tampão Fosfato

MTT – do inglês, 3-(4,5- dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | Terapia Fotodinâmica (TFD) | 1 |
| 1.2 | Porfirinas como fotossensibilizadores | 5 |
| 1.3 | Propriedades fotofísicas dos FSs..... | 9 |
| 1.3.1 | Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis..... | 9 |
| 1.3.2 | Rendimento quântico de fluorescência | 12 |
| 1.3.3 | – Rendimento quântico de oxigênio singlete | 13 |
| 1.4 | Fontes de luz..... | 16 |
| 1.5 | Interação do FS com HSA..... | 17 |
| 1.6 | Toxicidade dos derivados de PpIX em células tumorais | 19 |
| 1.7 | Encapsulamento dos derivados de PpIX..... | 20 |
| 2 | Objetivos | 24 |
| 2.1 | Objetivo geral | 25 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 25 |
| 3 | Materiais e métodos | 26 |
| 3.1 | Síntese dos derivados da PpIX | 26 |
| 3.2 | Caracterização dos derivados da PpIX | 26 |
| 3.2.1 | Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) | 27 |
| 3.2.2 | Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS) | 27 |
| 3.2.3 | Espectroscopia de absorção UV-Visível | 28 |
| 3.2.4 | Espectroscopia de emissão e rendimento quântico de fluorescência | 29 |
| 3.2.5 | Avaliação da fotoestabilidade dos derivados da PpIX..... | 30 |
| 3.2.6 | Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete $^1\text{O}_2$ (ϕ_Δ) | 31 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.7 | Avaliação da interação da HSA com as porfirinas..... | 33 |
| 3.3 | Ensaio biológicos..... | 35 |
| 3.3.1 | Linhagem celular e cultivo | 35 |
| 3.3.2 | Incorporação dos FSs em células HeLa | 35 |
| 3.3.3 | Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT | 37 |
| 3.3.4 | Ensaio de viabilidade pelo método MTT com formulados (FS-Polímero) em células HeLa | 40 |
| 4 | Resultados e discussão | 42 |
| 4.1 | Síntese e caracterização..... | 42 |
| 4.2 | Espectroscopia de absorção UV-Visível dos derivados da PpIX | 48 |
| 4.3 | Estabilidade dos FSs em solvente orgânico..... | 52 |
| 4.4 | Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) | 53 |
| 4.5 | Espectroscopia de emissão e rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) 56 | 56 |
| 4.6 | Avaliação da fotoestabilidade dos derivados da PpIX..... | 59 |
| 4.7 | Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete (ϕ_Δ)..... | 61 |
| 4.8 | Estudo de auto-agregação dos FSs em misturas água/metanol ou água/DMSO | 65 |
| 4.9 | Avaliação da interação da HSA com derivados da PpIX..... | 69 |
| 4.10 | Incorporação dos FSs em células HeLa | 75 |
| 4.11 | Citotoxicidade e Fototoxicidade dos FSs em células HeLa..... | 77 |
| 4.12 | Citotoxicidade e Fototoxicidade dos FSs encapsulados em sistemas poliméricos..... | 81 |
| 5 | Conclusão | 83 |
| 6 | Referências Bibliográficas..... | 84 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A interação da luz com a matéria é a base das reações de fotossensibilização, que ocorrem após a absorção de fótons de luz por compostos fotossensíveis e transferência desta energia absorvida para moléculas vizinhas, transformando a energia originada da luz em energia química (FOOTE, 1968). Na natureza a utilização de tais reações de fotossensibilização podem ser benéficas e/ou essenciais, como por exemplo o processo de fotossíntese nas plantas que utiliza a clorofila como fotossensibilizador (FS) que capta a energia luminosa, converte em energia química e armazena como carboidratos e outros constituintes dos tecidos vegetais (GEROLA, 2013). Mas também podem estar associadas a efeitos prejudiciais nos organismos vivos, tais como a perda de homeostase das células da camada basal e derme levando ao foto-envelhecimento e câncer de pele (BATTIE et al., 2014; ICHIHASHI et al., 2003).

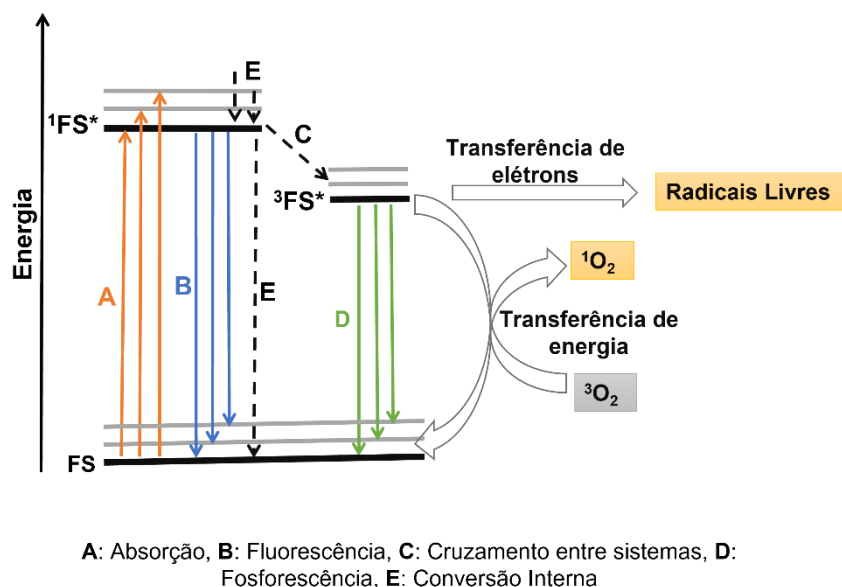
Há relatos históricos do uso de tratamento com luz desde as civilizações antigas gregas e egípcias, nos quais se usavam tais reações de fotossensibilização através da ingestão de plantas que continham psoralenos seguidas da exposição à luz solar para tratar doenças como o vitiligo. No século XX as primeiras experiências foram realizadas visando à aplicação da fotossensibilização da eosina no tratamento de tumores em humanos (STERNBERG; DOLPHIN; BRICKNER, 1998). A partir de então, surgiu um procedimento denominado Terapia Fotodinâmica (TFD), cujo conceito é baseado na ativação de fotossensibilizadores (FS) por energia luminosa na presença de oxigênio. O FS, ao absorver a energia de luz é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam assim, danos a biomoléculas resultando na morte de células indesejadas, como células tumorais ou de microorganismos (UCHOA-FERNANDES, 2007).

Clinicamente, a TFD ocorre com a administração de um FS ou o seu precursor por diferentes vias (tópica, oral, intravascular ou injeção local intra-tumoral), seguida por um intervalo de tempo que permita a distribuição, localização e acúmulo do FS no tumor. Após esse período, a região a ser tratada

é exposta a luz em comprimento de onda adequado (ROSSETTI, 2010). Ou seja, a TFD pode ser considerada como um tratamento de dupla seletividade, pois traz a possibilidade de acúmulo do FS majoritariamente nas células alvo e por ser necessária a iluminação direcionada somente ao tecido afetado (ANTONANGELO, 2012), e ainda, traz vantagens como modalidade não invasiva, alta precisão espaço-temporal e boa controlabilidade (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Quando uma molécula recebe radiação eletromagnética em comprimento de onda em que a molécula absorve, ocorre a absorção de luz que promove a molécula para um estado excitado. O retorno subsequente da molécula ao seu estado fundamental ocorre por algumas vias: o elétron retorna para o estado fundamental liberando energia em forma de calor, pode ser liberado de forma luminosa (fluorescência) ou ainda realizar o cruzamento intersistemas, onde atinge o estado excitado tripleto e pode ser desativado por fosforescência como descrito pelo Diagrama de Jablonski apresentado na Figura 1 (BUK, 2018).

Figura 1 - Diagrama de Jablonski.



Fonte: Adaptado de (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

Na Figura 1, temos os estados eletrônicos S_0 , S_1 e S_n que representam o estado fundamental da molécula (S_0), o primeiro estado excitado (S_1) e os estados excitados subsequentes (S_n), respectivamente (BUK, 2018) e ainda, T_1 e

T_n que são os estados tripletos excitados.

A transição de $S_1 \rightarrow T_1$ ou $T_1 \rightarrow S_0$ envolve uma mudança de spin eletrônico, tornando um evento pouco provável, assim, o tempo de vida médio de um estado S_1 é de aproximadamente 10^{-8} s e para o estado T_1 varia de 10^{-4} s a vários segundos, ou seja, o FS no estado excitado tripleto pode interagir fotoquimicamente com as moléculas de oxigênio ou substratos, gerando EROs que oxidam as biomoléculas e danificam o tecido irradiado (ANTONANGELO, 2012).

Importante ressaltar que os processos são simultâneos e competitivos entre si. Após a excitação eletrônica, podem ocorrer dois mecanismos de reação:

- A. Tipo I – onde ocorre a transferência de elétrons entre o FS no estado tripleto excitado e componentes do sistema, gerando íons-radicais que reagem com o oxigênio no estado fundamental, gerando EROs;
- B. Tipo II – onde ocorre a transferência de energia do FS no estado tripleto para o oxigênio no estado tripleto (fundamental), com a geração de oxigênio singlete (1O_2), que é altamente citotóxico (MACHADO, 1997).

Tabela 1 - Reações que ocorrem durante a ação fotodinâmica.

| Excitação | $FS + h\nu \longrightarrow {}^1FS^* \longrightarrow {}^3FS^*$ | |
|-----------|---|------------------------------|
| Mecanismo | Reação | Produto |
| Tipo I | ${}^3FS^* + FS$ | $FS^{\cdot-} + FS^{+\cdot}$ |
| | ${}^3FS^* + S$ | $FS^{\cdot-} + S^+$ |
| | $FS^{\cdot-} + O_2$ | $FS + O_2^{\cdot-}$ |
| | ${}^3FS^* + O_2$ | $FS^{+\cdot} + O_2^{\cdot-}$ |
| | $2O_2^{\cdot-} + 2H^+$ | $O_2 + H_2O_2$ |
| Tipo II | ${}^3FS^* + O_2$ | $FS + {}^1O_2$ |

*S = substrato

Fonte: Adaptado de (ORMOND; FREEMAN, 2013).

No mecanismo do Tipo I podem ocorrer diferentes reações como descritas na Tabela 1. A reação entre o ${}^3FS^*$ e o próprio FS no estado fundamental provoca uma fotodegradação que formam os ânions e cátions radicais do FS, $FS^{\cdot-}$ e $FS^{+\cdot}$,

respectivamente. O substrato (S) é uma molécula doadora de elétrons que pode reagir com o $^3\text{FS}^*$ produzindo substrato oxidado (S^+) e FS^- . O ânion superóxido (O_2^-) pode ser formado em mecanismos do Tipo I por duas maneiras: uma em que o ânion radical do FS (FS^-) pode reagir com o oxigênio molecular e outra em que ocorre transferência de elétron do $^3\text{FS}^*$ com o oxigênio. Neste último caso, no entanto, ocorre competição com a produção de oxigênio singlete (mecanismo do Tipo II). Também pode ocorrer a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através da combinação de duas moléculas de ânion superóxido (O_2^-) com íons hidrogênio. Já no mecanismo Tipo II (Tabela 1), o FS no estado excitado tripleto interage com o oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$) por transferência de energia, gerando o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que é uma espécie altamente reativa e citotóxica. Os mecanismos fotoquímicos tipo I e tipo II podem ocorrer simultaneamente (BACELLAR et al., 2018; BAPTISTA et al., 2017) causando danos em alvos biológicos como membranas, proteínas, DNA, mitocôndria e lisossomos, comprometendo a homeostase celular e induzindo a morte das células (TSUBONE, 2017; TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é muito mais reativo que o oxigênio molecular, devido a configuração do spin favorecendo o ataque de substratos doadores de pares de elétrons (FOOTE, 1968).

A importância relativa de um mecanismo em relação ao outro dependerá, entre outros fatores, do substrato, da distância entre o FS e o alvo, bem como da concentração de oxigênio (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019). As espécies reativas de oxigênio são quimicamente muito ativas e possuem uma ampla gama de efeitos em biomoléculas, promovendo danos e destruição de tecidos. EROs são moléculas de sinalização chave que desempenham um papel importante na progressão de doenças inflamatórias, que em concentrações baixas e moderadas, funcionam em processos fisiológicos como regulação do crescimento celular, adesão de células a outras células, diferenciação, senescência e apoptose, mas que em altas concentrações, produzem modificações adversas nos componentes celulares (SANTOS, 2020).

Geralmente, os principais sítios de reação das espécies reativas de oxigênio são moléculas doadoras de elétrons, ou seja, ligações carbono-carbono duplas mais alquiladas, aminas, sulfetos, ânions e nucleófilos neutros (DI MASCIO et al, 2014). Por isso que tais mecanismos de fotossensibilização (Tipo

I e Tipo II) podem causar danos em estruturas e funções de alvos biológicos tais como membranas, proteínas e DNA; comprometendo a homeostase das células (BACELLAR et al., 2015; TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

1.2 Porfirinas como fotossensibilizadores

Além de luz e oxigênio, os fotossensibilizadores são de fato um dos três fatores importantes em todo processo da TFD, devido a capacidade de absorver luz com um comprimento de onda específico, gerando um estado excitado tripleto que leva a formação de EROs. Vários estudos foram realizados nas últimas décadas com o objetivo de melhorar a eficácia e seletividade do fotossensibilizador. Idealmente, espera-se que um FS tenha a capacidade de se acumular preferencialmente no tecido do tumor e ser eliminado rapidamente do tecido normal (SANTOS, 2020).

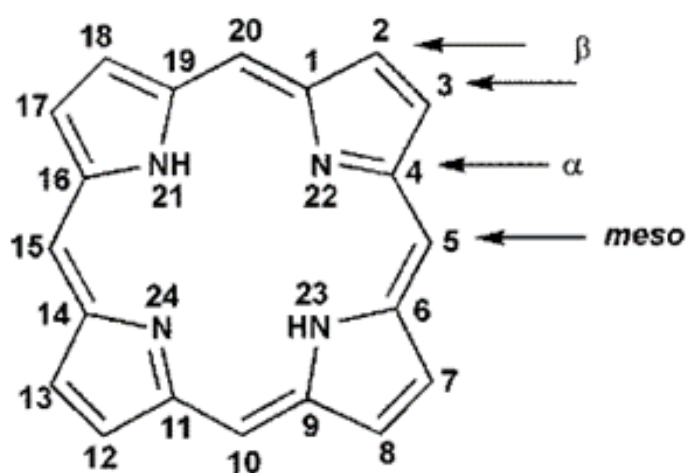
As porfirinas são metabólitos naturais ou derivados de metabólitos naturais, que são intermediários na biossíntese do *heme* em organismos mamíferos (BOHM et al., 2001) por estar presente na hemoglobina, mioglobina, peroxidases, citocromos entre outras metaloproteínas (IGLESIAS, 2012). *Heme* é o grupo prostético para várias proteínas, como por exemplo, os citocromos, que participam de reações de transferência de elétrons (ANTONANGELO, 2012). As porfirinas são compostos com muitas funções importantes e são amplamente utilizados em biocatálise, medicina e biônica. Muito do entusiasmo na pesquisa da porfirina reside em sua síntese modular, alta solubilidade em solventes orgânicos, cores características, rigidez, estabilidade térmica e afinidade por metalação (MCHIRI et al., 2019). Uma das vantagens proeminentes da maioria das porfirinas é que elas têm afinidade especial por células, o que lhes permite permanecer seletivamente em células cancerosas, proporcionando viabilidade para a pesquisa de drogas antitumorais (ZHANG et al., 2020).

As porfirinas são caracterizadas por uma estrutura macrocíclica da união de quatro anéis pirrólicos por meio de pontes metenil (indicadas pelos números 5,10,15,20) nas posições α (indicadas pelos números 1,4,6,9,11,14,16,19), como mostrado na Figura 2. O macrociclo porfirínico é essencialmente plano, onde seu centro é um ligante tetradentado que pode coordenar-se a um íon metálico,

podendo levar a uma distorção na planaridade do anel porfirínico, influenciando na distorção e consequentemente na estabilidade da porfirina (ANTONANGELO, 2012).

A porfirina pode sofrer diversos tipos de reações (substituição eletrofílica, substituição nucleofílica, adição radicalar ou nucleofílica, dentre outras), onde os carbonos meso-(5,10,15,20) e beta-pirrólicos (2,3,7,8,12,13,17,18) participam das reações (IGLESIAS, 2012).

Figura 2 - Estrutura do anel macrociclo básico de porfirinas.



Fonte: Adaptado de (IGLESIAS, 2012).

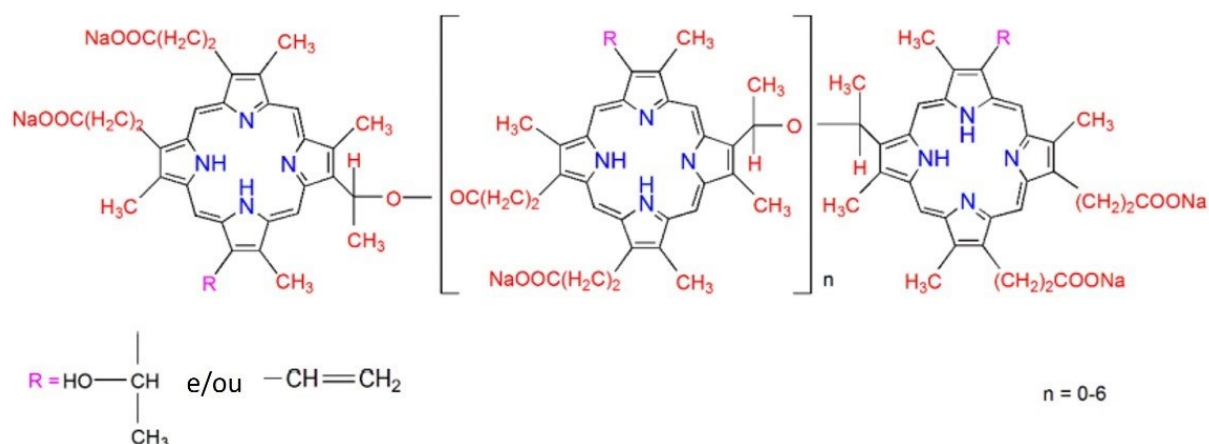
A hematoporfirina foi isolada da hemoglobina dos glóbulos vermelhos através do tratamento com ácido sulfúrico concentrado em 1841 por Schafer (SANTOS, 2020) e, trata-se de um derivado da Protoporfirina IX (PpIX) (UCHOA-FERNANDES, 2007).

O primeiro fotossensibilizador aprovado pelas autoridades de saúde na TFD para tratamento de câncer foi o Photofrin® -Porfímero sódico - (Figura 3), que possui constituição indefinida polimérica da Hematoporfirina IX (Hp IX) e foi utilizado visando a aplicação em lesões malignas no esôfago, pulmão e bexiga. Hoje tem aprovação em mais de 40 países (SANTOS, 2020).

Os macrociclos de porfirina baseados em hematoporfirina e seus derivados apresentam características negativas, pois cada formulação é uma mistura de oligômeros, solubilidade muito baixa em solventes polares e dão origem a fotossensibilidade prolongada do paciente (GOMES; NEVES;

CAVALEIRO, 2018).

Figura 3 - Estrutura do oligômero do Photofrin®.



Fonte: Adaptado de (MYRZAKHMETOV et al., 2021).

A PpIX, por sua vez, é um derivado de porfirina e um FS bastante utilizado topicamente ou oralmente em muitas aplicações clínicas (SANTOS, 2020). Apresenta como principal vantagem o curto tempo de meia-vida que não duram mais de 48h no corpo (CASAS et al., 2001), além de ser um marcador devido sua fluorescência. Para que ocorra seu acúmulo celular, porém, costuma-se induzir sua produção utilizando a aplicação tópica de precursores, como o ácido aminolevulínico (ALA) e aminolevulinato de metila (M-ALA) (PEREZ, 2022).

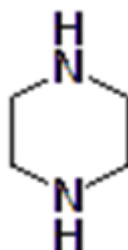
A PpIX possui uso prático limitado devido a sua baixa solubilidade em ambientes fisiológicos e sua alta tendência à formação de agregados (UCHOA; OLIVEIRA; BAPTISTA, 2010) que podem promover alterações nos estados eletrônicos e, conseqüentemente, em suas características como, por exemplo, na capacidade de gerar oxigênio singlete, que é uma das espécies responsáveis pela morte celular.

A proposta de aprimoramento para fármacos fotossensíveis parte do princípio de utilizar uma substância ou grupo funcional, com uma estrutura semelhante ao composto ativo e combinar com vários fragmentos farmacologicamente ativos para produzir um efeito sinérgico (ZHANG et al., 2020). A inclusão de grupos funcionais com bioatividade em porfirinas tem um efeito promissor nas propriedades das porfirinas na TFD (GUO; TONG; LI, 2004).

Neste contexto, piperazinas (Figura 4) são compostos heterocíclicos

amplamente utilizados nos fármacos, especialmente em fármacos anticancerígenos e algumas apresentam atividade distinta (GUO; LI; ZHANG, 2003).

Figura 4- Estrutura da piperazina.



Fonte: A autora (2023).

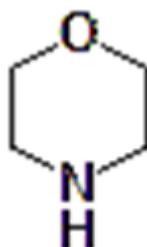
Liu et al. (2017) traz um estudo sobre um pigmento orgânico produzido em massa conhecido com Quinacridona (QA) e alguns derivados que apresentaram interação com diferentes formas de DNA e células cancerosas. O grupo funcional da classe da piperazina foi adicionado ao pigmento, e o derivado obtido N,N'-bis(metilpiperazinilpentil)quinacridona (QAP) foi submetido à vários testes, onde foi observado a geração de EROs em solução e também em células, e juntamente a estes resultados, nos experimentos *in vivo*, sob irradiação com laser de 532 nm, inibiu o crescimento tumoral em 30% comparado ao QA (LIU et al., 2017).

Zhang et al. (2020) traz uma revisão sobre o desenvolvimento clínico de FSs de porfirina com vários grupos funcionais. Os conjugados porfirina-piperazina foram comparados com conjugados de porfirina-cisplatina e porfirina-(5-fluorouracil), onde os conjugados porfirina-piperazina apresentaram maiores taxas de inibição em células de hepatoma Bel-7404, células de câncer nasal MCG e células de câncer gástrico NHE1 (ZHANG et al., 2020).

O grupo funcional da classe da morfolina (Figura 5) também apresenta contribuição para a atividade anticancerígena contra uma variedade de linhagens celulares (AL-GHORBANI et al., 2017). Além disso, os heterociclos como a morfolina tem atraído a atenção devido ao seu uso como antimicrobiano, anti-inflamatório, terapêutico, entre outros usos e tem sido usado em mais de 100 medicamentos que apresentam o sistema de anéis de morfolina como uma

estrutura de acesso, uma cadeia lateral ou um componente dos sistemas de anéis fundidos (YALAZAN et al., 2020).

Figura 5- Estrutura da morfolina.



Fonte: A autora (2023).

O grupo morfolina também apresenta inibição da enzima fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (FIOROT et al., 2019) e atua na ativação da cascata de sinalização intracelular da proteína cinase Akt específica de serina/treonina controlando o crescimento e a proliferação celular (BALISTA, 2010).

Mchiri, et. al. (2019) relata um comparativo entre três moléculas e atribuiu o aumento do rendimento quântico tripleto à adição da morfolina e um metal pesado de cádmio a estrutura de uma porfirina, que possivelmente favoreceu a taxa de cruzamento intersistemas por meio de acoplamento spin-órbita (MCHIRI et al., 2019).

1.3 Propriedades fotofísicas dos FSs.

1.3.1 Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis

A interação da radiação eletromagnética com a matéria é um tema que engloba reflexão, onde essas interações radiação-matéria ocorrem em ampla faixa do espectro eletromagnético, sendo responsável por muitos fenômenos ópticos. Em escala microscópica, as excitações vibracionais e eletrônicas ocorrem devido as interações moleculares com a radiação de energia equivalente aquela da região entre o infravermelho e o ultravioleta do espectro eletromagnético (RAMOS, 2020).

A maioria das aplicações da espectroscopia de absorção de compostos orgânicos é baseada nessas transições eletrônicas pois, a energia necessária

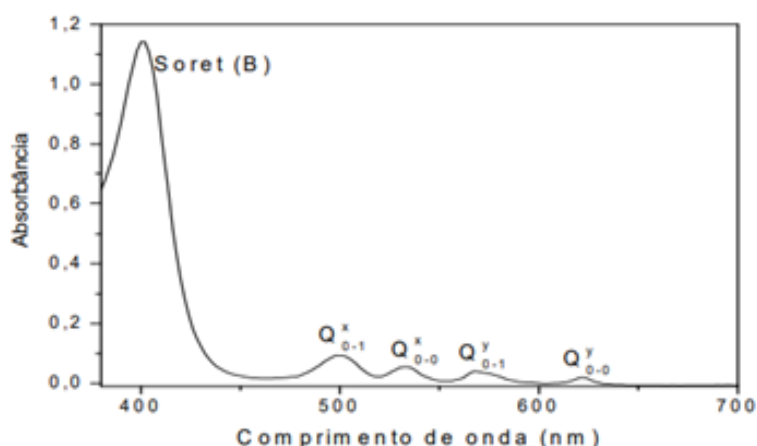
nesse processo se situa na região espectral de 200 a 700 nm (ANTONANGELO, 2012). Quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior é o seu grau de penetração no tecido, promovendo assim maior eficiência no combate ao tecido doente, e assim, podendo ser utilizado em tratamento de tumores maiores. Por isso, os cromóforos desenvolvidos para uso na TFD precisam apresentar absorção na região próxima ao vermelho ou infravermelho próximo (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis) utiliza luz na faixa do visível e ultravioleta próximo (200 a 700 nm) e a absorção de luz nessa região depende da estrutura eletrônica da molécula que provoca transições dos elétrons de valência do estado fundamental para os estados excitados (ANTONANGELO, 2012).

Uma das caracterizações de porfirinas é realizada por meio da técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis já que os compostos possuem absorção nessa faixa de comprimento de onda (ANTONANGELO, 2012). As bandas observadas são resultantes das transições eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$ no anel porfirínico entre dois orbitais HOMO e dois orbitais LUMO (ACUNHA, 2017). A banda Soret na região do azul advém da transição S_0-S_2 , enquanto a banda Q na região do vermelho da transição S_0-S_1 (GEROLA, 2013), como pode ser observado na Figura 6.

Porfirinas e seus similares possuem a característica de absorver luz na região do visível e a excitação é realizada através da banda Q (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Figura 6 - Aspecto geral do espectro de absorção de uma porfirina base livre em etanol.



Fonte: Reproduzido de (GEROLA, 2013).

A banda Soret, na região de 400 nm, apresenta uma absorvidade molar da ordem de $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e as quatro bandas na região do visível, entre 500 e 700 nm, denominadas bandas Q, apresentam absorvidade molar da ordem de $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ANTONANGELO, 2012).

O espectro de absorção pode apresentar alterações devido a algumas condições experimentais como concentração, o solvente utilizado e o pH do meio e assim podem influenciar no processo de autoagregação dos compostos. A agregação é definida como a aglomeração ou associação de moléculas em solução e reduz drasticamente a eficiência fotodinâmica de um fotossensibilizador (DA SILVA, 2015), trazendo limitação na capacidade de absorver luz (GEROLA, 2013).

A hidrofobicidade dos compostos está associada a interação e incorporação de um fotossensibilizador em membranas biológicas. Entretanto, essa propriedade em meio aquoso pode levar ao processo de autoagregação. Esses fatores demonstram a importância de uma formulação adequada do medicamento que mantenha o composto na forma monomérica (DA SILVA, 2015).

As modificações apresentadas nos espectros de absorção de espécies agregadas, como os deslocamentos ou a presença de bandas adicionais, são explicadas pela Teoria do Exciton (KASHA; RAWLS; ASHRAF EL-BAYOUMI, 1965). De acordo com essa teoria, o momento dipolar da transição das unidades

monoméricas indica as diferenças de energia dos possíveis dímeros e consequentemente explica os deslocamentos espectrais.

Em agregados do tipo J, a transição permitida possui menor energia e, portanto, sua banda se forma em comprimentos de onda maiores que a do monômero (deslocamento batocrômico) (DA SILVA, 2015) e demonstram bandas de absorção bem definidas e estreitas, cuja posições são facilmente previstas teoricamente ignorando vibrações intramoleculares (ROCHA, 2018). Já em agregados do tipo H, a transição permitida possui energia maior e sua banda surge em comprimentos de onda menores (deslocamento hipsocrômico) (DA SILVA, 2015) apresentando um deslocamento de banda com uma estrutura vibracional rica e larga (ROCHA, 2018). Existe ainda um caso especial onde a banda do agregado e a do monômero coincidem no espectro. O ângulo necessário para que esse fenômeno ocorra é denominado ângulo mágico ($54,7^\circ$) (DA SILVA, 2015).

1.3.2 Rendimento quântico de fluorescência

A luminescência é a emissão de luz de uma substância e ocorre a partir de um estado eletronicamente excitado, dependendo da natureza do estado excitado é dividido em duas categorias, fluorescência e fosforescência (VASCONCELOS, 2019).

A fluorescência é uma transição radiativa, na qual a molécula excitada retorna ao estado fundamental pela emissão de um fóton. Essa transição ocorre entre estados de mesma multiplicidade de spin (permitida por spin) e ocorrem na escala de tempo de $10^{-10} - 10^{-7}$ s. Normalmente, a emissão de fluorescência ocorre do primeiro estado excitado para o estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), mesmo para as moléculas que vão para o segundo estado excitado ao absorver radiação. Isso ocorre devido ao processo de conversão interna ($S_2 \rightarrow S_1$) antes da emissão (GEROLA, 2013).

A menor energia de emissão ($S_1 \rightarrow S_0$, que ocorre a partir do nível vibracional de menor energia do estado S_1) em relação à absorção ($S_0 \rightarrow S_1$) deve-se à perda de energia do estado excitado por relaxação vibracional. Essa diferença de energia, dependente do meio e, pode ser avaliada pelo deslocamento de Stokes dado pela diferença entre os máximos de absorção

($S_0 \rightarrow S_1$) e emissão de fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$), em número de onda (GEROLA, 2013).

A fluorescência é uma ferramenta importante na TFD por ser uma técnica empregada para o estudo de parâmetros físico-químicos e também, permite o monitoramento e avaliação da produção e consumo do FS (PEREZ, 2022). A maioria dos FSs possuem a capacidade de fluorescer, atuando como agentes de contraste de imagem e agentes terapêuticos ao mesmo tempo, possibilitando a identificação e monitoramento de tumores com precisão durante o tratamento (SANTOS, 2020).

O rendimento quântico de fluorescência experimental é normalmente determinado por comparação com um padrão de fluorescência, ou seja, um composto de rendimento quântico conhecido (LIMA, 2015). A perda de fluorescência de um fluoróforo pela interação com um supressor é denominada de supressão de emissão de fluorescência e esse processo requer contato molecular entre o fluoróforo e o supressor. Para explicar o processo de supressão de emissão de fluorescência, dois mecanismos são tidos como os principais, os processos de supressão de emissão dinâmico e estático. O mecanismo que descreve essa supressão de fluorescência é descrito pela equação de Stern-Volmer (SV) (ROCHA, 2018).

A determinação dos agregados pode também ser realizada através da espectroscopia de fluorescência, e neste caso, a agregação das moléculas também trará desvantagens no rendimento quântico de fluorescência uma vez que nessas condições os compostos não emitem luz em função da auto-supressão de energia dos estados excitados e desta forma, os estudos voltados à formulação dos fármacos são fundamentais, de modo que os FSs sejam mantidos sob a forma monomérica (DA SILVA, 2015).

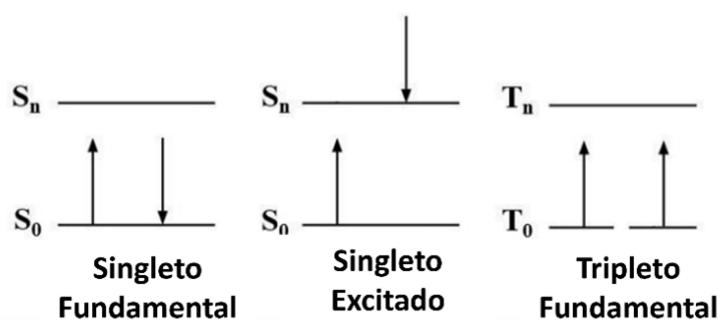
1.3.3 – Rendimento quântico de oxigênio singleto

Como já mencionado anteriormente, o processo da TFD envolve a administração de um FS, seguido por irradiação de luz visível ou no infravermelho próximo em um comprimento de onda específico ou faixa de comprimento, e sob a ação da radiação utilizada, o FS eletronicamente excitado reage com o oxigênio promovendo espécies reativas que promovem danos nas

biomoléculas.

O oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 em organismos vivos (SANTOS, 2020). Através do diagrama de orbital molecular (Figura 7), o oxigênio no estado fundamental apresenta o estado fundamental tripleto, onde seu HOMO possui dois elétrons com momento de spins paralelos ($+\frac{1}{2}$ e $+\frac{1}{2}$), ocupando dois orbitais π^* de mesma energia, chamados de degenerados, constituindo um biradical representado por $^3\text{O}_2$, portanto, um estado tripleto (multiplicidade igual a 3). Esta configuração eletrônica confere ao oxigênio molecular, propriedades paramagnéticas sendo estável de maneira incomum no estado tripleto (ROCHA, 2018).

Figura 7 - Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) dos estados singleto fundamental e excitado e do estado tripleto fundamental.



Fonte: Adaptado de (ROCHA, 2018).

Existem duas formas de oxigênio singleto, a $^1\Sigma_g^+$ e a $^1\Delta_g$, sendo a primeira menos estável, com nível energético maior, e a segunda com energia menor conferindo maior estabilidade. Seus níveis energéticos são 37,5 kcal/mol e 22 kcal/mol mais elevados que o estado fundamental, respectivamente. Em condições experimentais normais, o estado menos estável tende a decair rapidamente para o estado $^1\Delta_g$ que apresenta tempo de vida-média alta (2-4 μs em H_2O) (ROCHA, 2018).

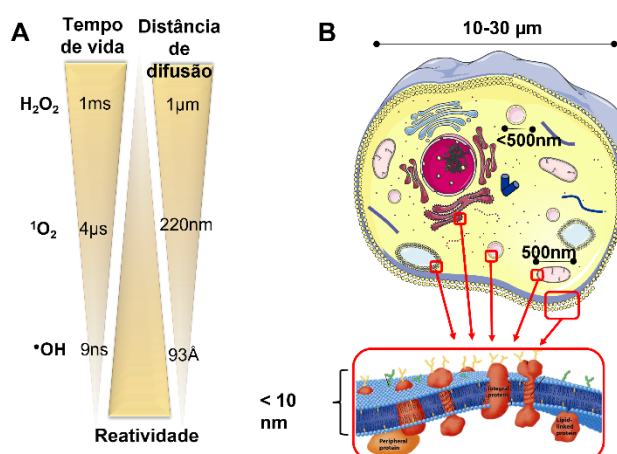
Assim, a forma de oxigênio singleto que apresenta interesse para aplicabilidade em sistemas biológicos é a forma $^1\Delta_g$, que será denotado por $^1\text{O}_2$ (ROCHA, 2018) por garantir um caráter eletrofílico e permitir a adição mais efetiva de substratos nucleofílicos (sítios ricos em elétrons). Essas características os tornam espécies mais reativas, interagindo com biomoléculas,

oxidando-as e assim, perdendo as funções biológicas (SANTOS, 2020).

O tempo de meia-vida do $^1\text{O}_2$ depende muito do meio onde se encontra, como por exemplo, em meio aquoso, sua meia-vida é cerca de 3,5-4,0 μs , pois ele se choca com as moléculas de água - H_2O - transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio tripleto. Já em água deuterada - D_2O - o tempo é de 68 μs . Porém, em meio orgânico, a meia-vida do oxigênio singlete é maior, tendo sua vida útil de até 100 μs e em lipídios de 50–100 μs . O tempo de vida diminui drasticamente para 0,2 μs dentro das células, devido à alta reatividade com substâncias biológicas (SANTOS, 2020).

O tempo de vida das espécies reativas de oxigênio gerados tanto *via* mecanismo Tipo I quando *via* mecanismo Tipo II depende do meio onde se encontra, o que implica que tais espécies possuem distância de difusão limitada dentro da célula. Portanto, sua alta reatividade e vida curta são fatores limitantes para a distribuição de EROs dentro das células. A relação entre o tempo de vida, a reatividade de EROs e a distância de difusão para essas espécies em células está ilustrada na Figura 8.

Figura 8 - (A) A relação entre o tempo de vida, o nível de reatividade e a distância de difusão para EROs comuns nas células. (B) Ilustração das dimensões das células, organelas e membranas.



Fonte: Adaptado de (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

O valor estimado do tempo de vida do $^1\text{O}_2$ na água é de aproximadamente 4 μs , o que resulta em uma distância de difusão de ~220 nm, pois ele se choca com as moléculas de H_2O transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio tripleto (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). No citoplasma,

o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é ainda menor, de 10 - 40 ns o que corresponde a uma distância de difusão de 10 – 20 nm (espessura de uma membrana celular) (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019).

A determinação do rendimento quântico de geração de oxigênio singleto ($\Phi\Delta$), pode ser feita através da oxidação de substratos que apresentam resposta à radiação eletromagnética (e.g. absorbância e fluorescência), formando produtos não responsivos. Assim, através do monitoramento do consumo destes compostos, utilizando técnica espectroscópica de estado estacionário, é possível determinar a produção de $^1\text{O}_2$ (ROCHA, 2018).

1.4 Fontes de luz

Diferentes fontes de luz diferem-se pelo seu espectro de emissão e o processo pelo qual emitem luz. Na irradiação em TFD uma fonte de luz ideal pode ser descrita como aquela que por um baixo custo forneça a maior quantidade de luz possível no máximo de absorção do FS, sem efeitos térmicos significativos (PEREZ, 2022).

A seleção da fonte de luz depende da localização do tumor, do fotossensibilizador e do tempo a ser administrada (SANTOS, 2020). Os fótons da radiação aplicada devem ser eficientemente absorvidos pelas moléculas de FS, contudo, algumas radiações têm comprimentos de onda cujos fótons são absorvidos pelo sangue ou outros pigmentos do corpo, ou são espalhados por células ou materiais particulados, fato que diminui a penetração em tecidos biológicos (GEROLA, 2013).

Fótons na região do visível de baixa energia, ou seja, de comprimentos de onda maiores (vermelho do espectro eletromagnético) são os mais efetivos para essa penetração, enquanto as radiações de comprimentos de onda menores apresentam baixas penetrações (GEROLA, 2013).

As fontes de luz mais utilizadas são lasers, LED e lâmpadas, tendo os lasers com o espectro de emissão mais estreito em comparação com outras fontes de luz citadas. O feixe considerado altamente monocromático, devido ao processo de emissão estimulada de luz, que permite que os fótons de energia muito bem determinada sejam emitidos pelo dispositivo laser (PEREZ, 2022). Porém, o laser possui um alto custo, o que se torna inconveniente para aplicação

como fonte de luz em TFD (ANTONANGELO, 2012).

Os diodos emissores de luz (LEDs) de cores definidas possuem um espectro de emissão mais amplo em relação a lasers, emitindo luz em uma faixa de comprimentos de onda (aproximadamente 50 nm de largura) e seguem o mesmo mecanismo básico de produção da luz pelos lasers.

Os LEDs são dispositivos bastante utilizados principalmente em tumores superficiais, mas que podem ser adaptados para aplicação endoscópica e intersticial (SANTOS, 2020), e também podem ser indicados e usados em casos de tratamento em regiões extensas, pois há a vantagem do custo reduzido (PEREZ, 2022), já que podem ser acoplados em série, aumentando sua superfície de contato (ANTONANGELO, 2012).

1.5 Interação do FS com HSA

Levando em consideração a importância da ação do FS próximo ao alvo que se deseja causar danos, o estudo da interação entre FS e biomoléculas pode fornecer informações importantes sobre a farmacocinética dos compostos, bem como sua fototoxicidade, fornecendo informações fundamentais para o desenvolvimento racional de novos FS (PEREIRA-LEITE; NUNES; REIS, 2013).

Sendo biomoléculas de maior diversidade estrutural e funcional nos seres vivos, as proteínas são frequentemente alvos de estudos. Entre estas, destacamos a albumina, devido ao importante papel que desempenha no transporte de ácidos graxos, metabólitos e de uma grande variedade de drogas (VASCONCELOS, 2019).

O grau de ligação das porfirinas às proteínas séricas pode afetar a biodistribuição e a farmacocinética do FS e, por consequentemente ter forte influência na localização intracelular final (MALATESTI; MUNITIC; JURAK, 2017), desempenhando um papel importante na determinação da dosagem terapêutica dos fármacos (SUN et al., 2015).

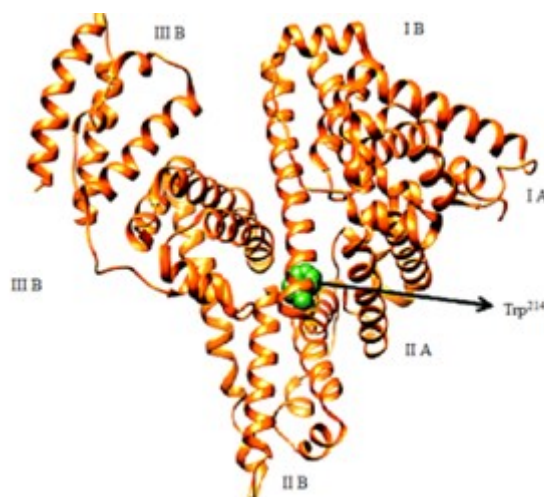
As albuminas séricas têm sido uma das proteínas mais estudadas por muitos anos. São as proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo, correspondendo a cerca de 60% da proteína total e fornecendo cerca de 80% da pressão osmótica do sangue (SUN et al., 2015). Devido a essa abundância, o transporte de FS até as células é feito por proteínas presentes no plasma, onde

após a administração do FS na corrente sanguínea, ele irá se associar com proteínas, incluindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e albumina. A relação entre o caráter hidrofílico e hidrofóbico do FS influencia no seu transporte e localização nas células (ANTONANGELO, 2012).

Por isso, neste trabalho utilizamos a HSA (do inglês, *Human Serum Albumin*) como modelo de proteína para se avaliar a interação dos FS derivados de PpIX com uma biomolécula. O intuito é compreender qual a relação entre estrutura química do FS e a fotoatividade em proteína, e comparar com a incorporação e fototoxicidade em células tumorais (HeLa).

A HSA é constituída por cadeias polipeptídicas compostas por 585 aminoácidos, sendo 17 grupos de tirosina, um resíduo de triptofano (Trp²¹⁴) e um resíduo de cisteína livre, além de 17 ligações de dissulfeto formadas por 34 resíduos de cisteína que auxiliam a manter a estrutura terciária, 6 grupos de metionina e 59 grupos de lisina (MENEZES, 2019; VASCONCELOS, 2019). Sua estrutura é dividida em três domínios homólogos (I, II e III) e cada domínio contém dois subdomínios A e B. No subgrupo IIA está localizado o resíduo de Trp²¹⁴ (MENEZES, 2019).

Figura 9 - Representação da estrutura proteica da Albumina do Soro Humano em laranja e do resíduo de aminoácido Trp²¹⁴ em verde no subdomínio IIA.



Fonte: Reproduzido de (MENEZES, 2019).

Menezes (2019) reforça que os parâmetros termodinâmicos, como variação de entropia (ΔS) e variação de entalpia (ΔH) com diferentes tipos de forças intermoleculares vão reger a inserção de moléculas na estrutura das

proteínas e a interação proteína-complexo pode ser regida por interações hidrofóbicas (no caso de $\Delta S > 0$ e $\Delta H > 0$), ligações de hidrogênio ou van der Waals (se $\Delta < 0$ e $\Delta < 0$) ou atrações eletrostáticas (se $\Delta S < 0$ e $\Delta H > 0$).

Depois do FS ser carregado pela corrente sanguínea com auxílio de biomoléculas como a proteína albumina, o FS terá de ser incorporado nas células. Por isso, as interações FS-membrana são inevitáveis, uma vez que a maioria das moléculas precisa de atravessar ou se ligar a membranas lipídicas para exercer sua atividade terapêutica (ANDRADE et al., 2021).

O HSA apresenta fluorescência intrínseca devido à presença do resíduo de aminoácido Trp²¹⁴, fenilalanina e tirosina ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 350 - 500$ nm).

A supressão de fluorescência é uma ferramenta muito importante que permite obter informações sobre processos bioquímicos envolvendo moléculas, macromoléculas e agregados supramoleculares. O *quenching* ou supressão de fluorescência é a redução da intensidade de fluorescência, que pode resultar de vários processos, supressão colisional ou dinâmica, supressão estática, transferência de energia, transferência de elétrons, etc (VASCONCELOS, 2019).

Através da supressão da fluorescência do resíduo Trp²¹⁴, é possível avaliar as interações e obter informações dos seus possíveis sítios de ligação utilizando as equações de Stern-Volmer (MENEZES, 2019). O triptofano é o aminoácido mais reativo que desativando o ¹O₂, causa danos e potencial destruição para membranas celulares e desativação enzimática, levando à morte celular (ANTONANGELO, 2012).

Fatores como a natureza química dos grupos laterais dos FS, agregação e distribuição de carga desempenham um papel importante para a interação da HSA com os FSs (ANTONANGELO, 2012).

1.6 Toxicidade dos derivados de PpIX em células tumorais.

Células doentes, com um distúrbio genético, passam a se reproduzir mais rapidamente do que as células normais levando à formação do tumor que é o crescimento anormal de tecidos, podendo este ser benigno ou maligno (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A avaliação das interações de fármacos-membranas tem sido facilitada por sua simulação *in vitro* usando sistemas miméticos de membrana e/ou

culturas de células e uma ampla gama de técnicas experimentais. A simulação em condições *in vitro* são as mais próximas possíveis daquelas encontradas pelos FSs ao longo da sua via *in vivo*, sendo importante, levar em consideração a preparação experimental dos estudos realizados (PEREIRA-LEITE; NUNES; REIS, 2013).

Gomes et. al. (2018) relata que iniciaram um programa de síntese e avaliação biológica de dímeros Dim 1-4 de porfirinas ligados a uma ligação amida. Nestes estudos, o comportamento farmacocinético de todos os dímeros foi examinado *in vivo* usando camundongos Balb/c portadores de fibrossarcomas MS-2 onde em todos os casos, a máxima eficiência e seletividade do acúmulo de FS em cada tecido tumoral ocorreu 24 h após a administração da droga (GOMES; NEVES; CAVALEIRO, 2018).

Zhang, et. al. (2020) relata resultados do uso de derivados de porfirina-cisplatina que apresentou notável fototoxicidade, com um valor menor de IC₅₀ (Cólon 26: 0,12 µM; Sarcoma 180: 0,08 µM) sob 90 J/cm² de dose de luz em 427 nm (ZHANG et al., 2020).

Rose et. al. (2021) traz um estudo com porfirinas contendo sais de imidazólio e complexos NHC-ouro(I), onde 2 compostos induziram morte celular sob irradiação a laser em 450 e 545 nm. O composto nomeado 6 demonstrou maior eficiência a 0,5 µM com ~86% de morte celular em células humanas de câncer de mama (MCF-7) em 545 nm sob 19,5 J/cm² de dose de luz (ROSE et al., 2021).

1.7 Encapsulamento dos derivados de PpIX.

Solubilidade é uma propriedade físico-química, definida pela composição exata de uma solução saturada de um soluto em um determinado solvente, temperatura, pressão e pH, que está fortemente atrelada aos fenômenos de adsorção, miscibilidade, condutância, viscosidade, entre outros (PITTOL, 2016).

Consequentemente, é de fundamental importância para a concepção de medicamentos, sobretudo daqueles preparados a base de fármacos pouco ou escassamente solúveis. Estima-se que, aproximadamente, 40% dos medicamentos comercializados e 80% das substâncias em processo de desenvolvimento correspondam a moléculas com limitada solubilidade aquosa

(PITTOL, 2016).

Fármacos com solubilidade limitada em meio aquoso, frequentemente, representam desafios para a indústria farmacêutica, uma vez que essa característica é reiteradamente o principal fator limitante da dissolução e absorção desses, levando a uma biodisponibilidade inadequada (PITTOL, 2016).

A grande hidrofobicidade de FSs leva ao fenômeno de autoagregação em meio aquoso. O estado de agregação de moléculas fotoativas é prejudicial na eficácia fotodinâmica do fármaco *in vivo* pelo decréscimo de biodisponibilidade e limitação da capacidade de absorver luz. Além do que as formas monoméricas de fármacos são apreciavelmente mais fotoativas e capazes de gerar oxigênio singlete em relação à eficiência baixa observada para as moléculas empilhadas face a face (autoagregados do tipo H) (GEROLA, 2013).

Uma alternativa em busca da estabilização dessas moléculas no estado monomérico são os sistemas nanoestruturados coloidais, onde a indústria farmacêutica tem utilizado as micelas poliméricas e os lipossomos para maior solubilização e prevenção da autoagregação (GEROLA, 2013).

Os nanoestruturados precisam cumprir critérios de biocompatibilidade, estabilidade e seletividade, para garantir uma entrega eficiente dos fotossensibilizadores usados nas aplicações voltadas à TFD, onde a entrega específica do FS ao tecido alvo é um dos principais objetivos da nanotecnologia no campo biomédico e pode trazer vantagens em alguns aspectos, como o direcionamento específico para a região desejada, aumento da sua biodisponibilidade, conferir anfifilicidade à substância, o que permite o transporte por meio da corrente sanguínea e nos tecidos (SANTOS, 2020).

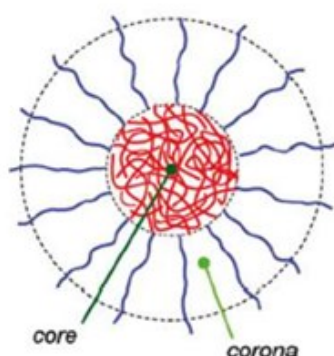
O *drug delivery* é um sistema de liberação que utiliza as micelas poliméricas do tipo Pluronic® (ou poloxâmeros), constituído de monômeros hidrofílicos (EO – óxido de etileno) e hidrofóbicos (PO – óxido de propileno) (GEROLA, 2013).

As micelas poliméricas de Pluronic constituídas por copolímeros em três blocos possuem grupos PO na parte interna mais hidrofóbica (core) e EO nas extremidades mais hidrofílicas (corona) (Figura 10). Essas micelas possuem ampla aplicabilidade na solubilização de moléculas lipofílicas ligadas covalentemente ao bloco hidrofóbico das micelas formadas, ou os substratos são mantidos na micela por interações hidrofóbicas e de van der Waals (GEROLA,

2013).

O balanço de hidrofobicidade das micelas poliméricas é controlado pela combinação da quantidade de monômeros hidrofílicos (EO) e hidrofóbicos (PO), resultando em grande versatilidade desses compostos devido ao número de copolímeros comercialmente disponíveis para usos distintos em diferentes áreas, que incluem a solubilização de fármacos e a liberação controlada (GEROLA, 2013).

Figura 10 - Representação esquemática de uma micela esférica de copolímero em bloco (Pluronic®).



Fonte: Reproduzido de(GEROLA, 2013).

A micelização é governada por duas forças opostas de atração e repulsão. As forças hidrofóbicas favorecem a expulsão das cadeias hidrofóbicas do ambiente aquoso, com a formação de uma região interna hidrofóbica que constitui o core da micela, enquanto os grupos polares voltam-se para o meio aquoso a partir do core e formam a corona. A força de repulsão entre as cadeias hidrofílicas limita a autoassociação dos copolímeros para agregados relativamente pequenos. Assim, a principal força dirigente para micelização em ambiente aquoso é a interação efetiva entre as partes hidrofóbicas das moléculas de surfactantes, enquanto as interações repulsivas são as forças opostas a micelização (GEROLA, 2013).

Por exemplo, o aumento da porção hidrofóbica favorece a micelização pelo aumento das interações hidrofóbicas e diminui a concentração micelar crítica (CMC). Por outro lado, o aumento de grupos polares em surfactantes não-iônicos aumenta a repulsão osmótica entre as cadeias polares vizinhas e tende a distribuí-las nos agregados micelares, resultando em micelas menores e mais

esféricas. Assim, as forças que dirigem a micelização envolve um balanço delicado entre essas forças atrativas e repulsivas, e são afetadas por fatores como tamanho da região hidrofóbica, natureza do grupo polar, co-solutos (compostos hidrofóbicos – favorecem a micelização, sal, álcool, etc.), pH e temperatura (GEROLA, 2013).

O poloxâmero 407 (P407) vem sendo amplamente estudado como solubilizante, sendo reconhecido por agências reguladoras, como o FDA (Food and Drug Administration), e utilizado na formulação de formas farmacêuticas de uso oral, tópico e oftálmico (PITTOL, 2016).

A carboximetilcelulose sódica (CMC) é um polímero biodegradável, renovável de origem vegetal e atóxico, derivado da celulose, um dos polímeros mais abundantes, onde o substituinte hidroxila - OH - é substituído por um grupo carboximetil - OCH_2COOH (KEMPER, 2022), tem aspecto de pó branco finamente dividido, possui hidrofilicidade, material não tóxico, boa capacidade de formação de filmes e possui características aniônicas, isto é, possui uma densidade de carga negativa em sua estrutura podendo ser atraída fortemente por uma substância positiva (um cátion, por exemplo) (BARBOSA, 2015).

Nesse sentido, a CMC é um derivado hidrossolúvel que industrialmente é obtido a partir da reação em suspensão (“slurry process”) de celulose, hidróxido de sódio e ácido monocloroacético (BARBOSA, 2015). A CMC ainda é um desafio, pois possui estrutura muito rígida, impedindo a formação de cadeias emaranhadas, por isso, para aplicação na formação de fibras eletrofiadas, geralmente é utilizado outro polímero junto a CMC, garantindo a formação de emaranhados e acentuando as propriedades físico-químicas através da formação de blendas poliméricas (KEMPER, 2022).

As blendas poliméricas são sistemas em misturas, compostos por dois ou mais polímeros e são consideradas um método alternativo na obtenção de novos materiais poliméricos, com diversos custos-benefícios, como, a combinação de diferentes propriedades físicas, químicas, mecânicas e térmicas, além da facilidade e o custo de obtenção de uma blenda ser muito vantajoso em relação ao desenvolvimento de um novo polímero, sendo possível reutilizar outros materiais e ser capaz de ajustar a sua composição de acordo com as necessidades (KEMPER, 2022).

Blendas poliméricas têm sido consideradas interessantes estratégias para

produção de sistemas carreadores de fármacos, pois é possível combinar as propriedades dos polímeros individuais e assim obter características melhoradas/diferenciadas. Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido publicados utilizando blendas poliméricas para produção de nano e micropartículas para liberação sustentada de diferentes fármacos (SANTOS et al., 2015a).

O método para produção de blendas são fusão e evaporação do solvente, onde as interações entre as cadeias poliméricas dos polímeros na blenda ocorrem através de forças não covalentes como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e complexo de transferência de cargas para homopolímeros (DA SILVA, 2016).

Li (2014) relata o estudo do composto hexadecafluoro zinco ftalocianina, que foi formulado em nanopartículas de PLA revestidas com PEG pela técnica de salting out com uma carga de droga de 0,61%. Conforme testado em camundongos com tumor EMT-6 em uma dose de 5 $\mu\text{mol/kg}$, as nanopartículas carregadas com FS causaram regressão do tumor em 100% dos camundongos em comparação com apenas 60% com a emulsão Cremophor EL. Os resultados indicaram que a formulação na nanopartícula biodegradável melhorou a resposta TFD do tumor em comparação com a emulsão Cremophor EL convencional, ao mesmo tempo em que fornece sensibilidade prolongada do tumor à TFD(LI; HUH, 2014).

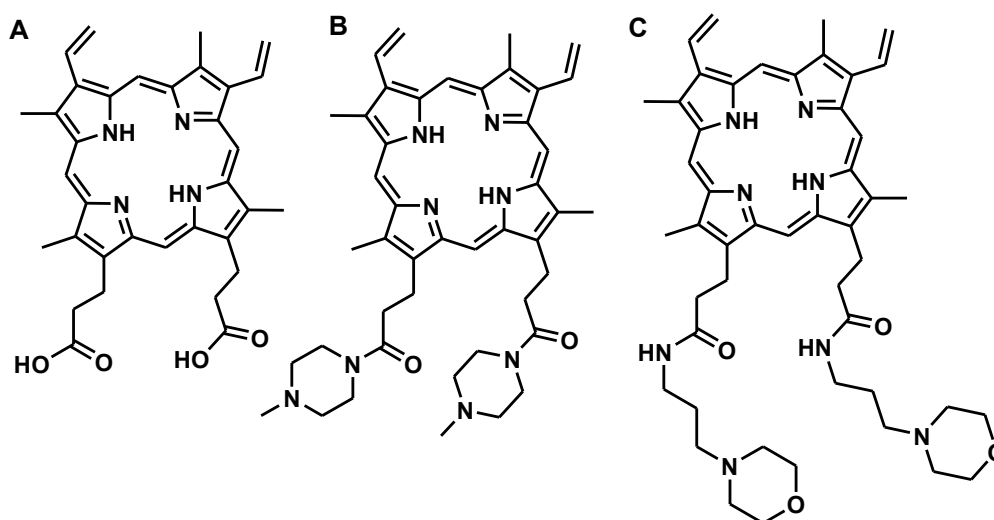
Li et. al. (2007) relataram uma formulação de micela de PEG b-poli (caprolactona) (PEG-PCL) incorporada com PpIX. As micelas têm uma alta eficiência de carregamento de PpIX de 82,4% e uma distribuição de tamanho estreita com um diâmetro médio de 52 nm. Em comparação com o fármaco livre, a formulação de PpIX em micelas aumentou o acúmulo intracelular total do agente e, assim, aumentou acentuadamente a fototoxicidade de PpIX. Portanto, a formulação de PpIX em micelas de copolímero em bloco pode permitir que a eficiência desejada da TFD seja alcançada com uma dose reduzida de fármaco e/ ou luz (LI et al., 2007).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Estudar as propriedades de dois novos fotossensibilizadores derivados da PpIX (Figura 11), correlacionando a estrutura química dos FS com sua capacidade de interagir com uma proteína, de incorporarem em células tumorais e, conseqüentemente de serem fototóxicas.

Figura 11 - (A) Estrutura da PpIX comercial; (B) Estrutura da PpIX-Metil-Piperazina e (C) Estrutura da PpIX-Morfolina.



Fonte: A autora (2023).

2.2 Objetivos específicos

- Funcionalizar PpIX com fragmentos da classe de piperazina e morfolina,
- Analisar as propriedades fotofísicas das moléculas (ϵ , ϕ_f , ϕ_Δ),
- Avaliar fotoestabilidade dos FSs,
- Estudar efeito de auto-agregação dos compostos em meio aquoso,
- Investigar como essas diferentes estruturas químicas dos FS interagem com proteína (HSA),
- Avaliar a taxa de incorporação dos FS e fototoxicidade dos compostos em células tumorais (HeLa),
- Avaliar a fototoxicidade do FS-polímero em células tumorais (HeLa).

3 Materiais e métodos

3.1 Síntese dos derivados da PpIX

A síntese dos derivados da PpIX ocorreu no Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LasFar) pela Mestre Ana Clara Cassiano e Doutorando Thibault Joseph William Jacques Dit Lapierre, sob orientação do Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.

Para a síntese da Protoporfirina IX–Metil-Piperazina (PpIX-Metil-Piperazina) foram adicionados em um balão volumétrico 52 mg (0,09 mmol) de PpIX em 1 mL de Dimetilformamida (DMF), e após solubilização, 53 mg (0,28 mmol) de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), 12 mg (0,09 mmol) de Hidroxibenzotriazol (HOBt) e 28 mg (0,28 mmol) de N-metilpiperazina foram adicionados à temperatura ambiente. A solução permaneceu sob agitação e em ambiente protegido por 95 horas, e a reação foi acompanhada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (eluente: 4 Diclorometano (DCM): 1 Metanol (MeOH)). Após o término, foi adicionado água destilada (5 mL) e foi extraída com DCM (2 x 10 mL). A fase orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida. O material gerado foi secado em uma bomba de alto vácuo por 12h, gerando o produto sólido de cor violeta e em 93% de rendimento.

Para obtenção da Protoporfirina IX-Morfolina (PpIX-Morfolina) em uma mistura reacional contendo 50 mg (0,089 mmol) de PpIX, 68 mg (0,36 mmol) de EDC e 1 mg (10 mol) de HOBt em 1,5 mL de DMF, foi adicionado 38 mg (0,27 mmol) de N – (3-aminopropil) morfolina sob agitação constante por 89 horas com acompanhamento por CCD à temperatura ambiente. Em seguida, foi tratada com água destilada e extraída por 5 vezes com DCM. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi submetido à purificação por coluna cromatográfica *flash* utilizando uma mistura de 90% diclorometano e 10% metanol, gerando o composto esperado em 39% de rendimento.

3.2 Caracterização dos derivados da PpIX

3.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono 13 (RMN de ^{13}C) foram obtidos no aparelho Bruker Ascend 400 (400 MHz para RMN de ^1H e 101 MHz para RMN de ^{13}C) do Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da UFU - Campus Santa Mônica. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo como referência interna, resíduos de solvente não deuterado: clorofórmio (7,25 ppm para RMN de ^1H ; 77,0 ppm para RMN de ^{13}C). Os valores das constantes de acoplamento foram medidos diretamente nos espectros de RMN de ^1H utilizando o programa MestReNova.

PpIX-Metil-Piperazina: **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 10.21 (s), 10.15 (s), 10.06 (s, 1H), 10.02 (s), 8.28 (dd, $J = 17.8, 11.5$ Hz, 2H), 6.38 (ddd, $J = 17.8, 3.2, 1.6$ Hz, 2H), 6.20 (dt, $J = 11.5, 1.8$ Hz, 2H), 4.42 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 3.71 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.60-3.64 (m, 10H), 3.27 (td, $J = 7.7, 2.3$ Hz, 4H), 3.15 – 3.09 (m, 4H), 2.09 (dd, $J = 9.8, 4.8$ Hz, 4H), 1.78 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 1.63 (dd, $J = 9.9, 4.9$ Hz, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 171.11, 139.22, 136.77, 130.42, 120.90, 98.07, 97.43, 97.10, 96.22, 54.49, 45.60, 45.49, 41.68, 35.79, 22.49, 12.81, 12.78, 11.85, 11.82.

PpIX-Morfolina: **RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3)** δ 9.98 (s, 1H), 9.94 (s, 1H), 9.90 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.24-8.14 (m, 2H), 7.43-7.39 (m, 2H), 6.34 (dd, $J = 17.9, 4.7$ Hz, 2H), 6.18 (dd, $J = 11.2, 3.4$ Hz, 2H), 4.32-4.29 (m, 4H), 3.62 – 3.52 (m, 16H), 3.04 – 3.00 (m, 16H), 2.43 – 2.28 (m, 4H), 1.28-1.23 (m, 4H), 1.07 – 1.03 (m, 4H). **RMN de ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 173.01, 130.39, 127.58, 125.69, 120.94, 97.79, 97.17, 96.93, 96.83, 66.32, 56.29, 52.79, 40.30, 38.52, 24.77, 23.43, 12.79, 12.77, 11.71, 11.67.

3.2.2 Espectrometria de Massas de Alta Resolução (HRMS)

Os espectros de massa para a PpIX-Metil-Piperazina foram realizados em um sistema de cromatográfica líquida de ultra desempenho (UHPLC) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (QqTOF) Impact II (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização do tipo electrospray, operado em modo positivo 1 Hz (MS) na faixa de massas de m/z

50 – 1000. As análises foram realizadas com voltagem do capilar de 3.0kV; temperatura da fonte 180°C; e fluxo do gás de dessolvatação em L min⁻¹.

PplX-Metil-Piperazina: EM/IES [M + H]⁺ calculado para C₄₄H₅₅N₈O₂⁺: 727,4443. Encontrado: 727,4409. Erro 4,67 ppm.

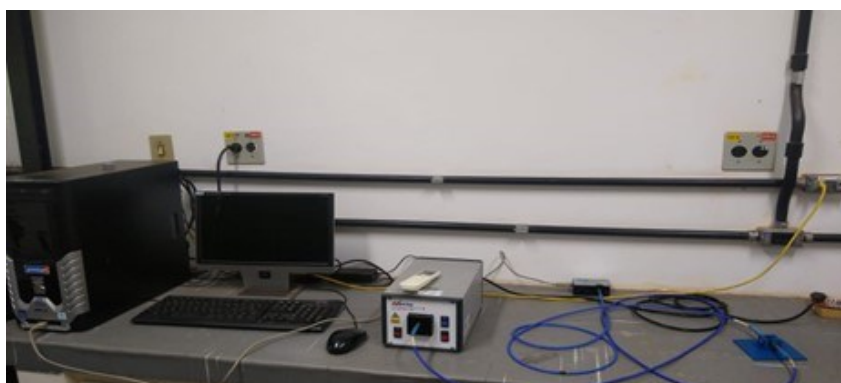
Já os espectros de massa para a PplX–Morfolina foram obtidos em colaboração com o Professor Dr. Thiago Teixeira de Tasso pelo método MALDI-TOF/TOF, Autoflex III Smartbeam – Bruker localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

PplX-Morfolina: EM/MALDI [M + H]⁺ calculado para C₄₈H₆₃N₈O₄⁺: 815,4967. Encontrado: 815,4972. Erro -0,61 ppm.

3.2.3 Espectroscopia de absorção UV-Visível

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis foram obtidos em um espectrofotômetro portátil - Oceanoptics (Figura 12) localizado no Laboratório do grupo de Instrumentação e Separação Analítica (Grisa) do Instituto de Química da UFU, Campus Santa Mônica, um espectrofotômetro UV-Vis, da marca Shimadzu UV-2501 PC, disponível no Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LasFar) do Instituto de Química da UFU, Campus Santa Mônica e um espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary Series, da marca Agilent Technologies® do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU, Campus Pontal. Na leitura dos ensaios foram utilizados cubetas de quartzo no formato retangular com caminho óptico de 1,0 cm.

Figura 12 - Espectrofotômetro portátil - Oceanoptics.



Fonte: A autora (2022).

Para determinação do coeficiente de absortividade molar das porfirinas, foram pesados 1 mg dos compostos sintetizados em balão volumétrico de 25 mL e foram solubilizados em metanol. A partir da solução estoque, foram realizadas diluições. As absortividades molares das moléculas em metanol foram determinadas a partir da Lei de Lambert-Beer como descrito na Equação 1

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

Onde,

A = absorbância,

ϵ = coeficiente de absortividade molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

c = concentração da solução (mol L^{-1}),

b = caminho óptico (cm).

3.2.4 Espectroscopia de emissão e rendimento quântico de fluorescência

Os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofotômetro da Marca Agilent Technologies®, modelo Cary Eclipse, localizado no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU, Campus Pontal com a colaboração da Mestre Mayara Martins e da professora Dra. Renata Galvão. Na leitura dos ensaios foram utilizados cubetas de quartzo no formato retangular com caminho óptico de 1,0 cm.

Para determinar a relação entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos utilizou-se o método de Fery-Forgues e Lavabre (1999) (BUK, 2018), onde relaciona o ϕ_F de um composto descrito na literatura junto com o da amostra. Foram preparadas soluções diluídas utilizando como padrão descrito na literatura a PpIX que possui ϕ_F de 0,07 solubilizada em metanol (MYRZAKHMETOV et al., 2021).

As amostras apresentavam absorbância no máximo em 0,3 em $\lambda = 403 \text{ nm}$, para evitar o efeito de filtro interno nas medidas de fluorescência (LAKOWICZ, 2006). O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 408 nm e emissão entre 420 - 550 nm com fendas de excitação de 5 nm e fenda de emissão de 10 nm.

Para calcular a integral da área de emissão de fluorescência foi utilizado a Equação 2 a seguir:

$$\phi F = \frac{F_a \times A_p \times \eta_a^2}{F_p \times A_a \times \eta_p^2} \phi F_p \quad (2)$$

Onde,

F= Integral da área de emissão de fluorescência;

A= Absorbância no comprimento de onda de excitação;

η = Índice de refração do solvente utilizado;

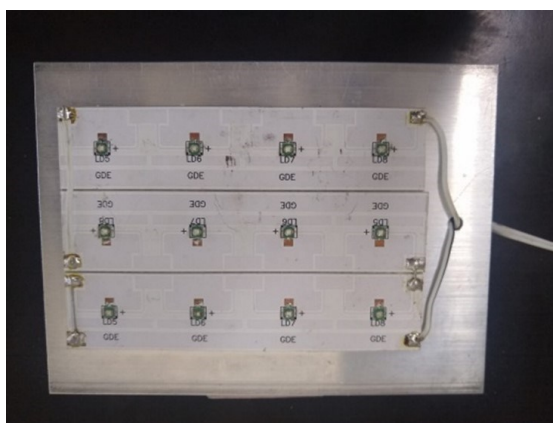
ϕF = rendimento quântico de fluorescência do padrão;

p e a = padrão e amostra, respetivamente.

3.2.5 Avaliação da fotoestabilidade dos derivados da PpIX

O fotobranqueamento ou fotoestabilidade das porfirinas foram estudadas em soluções metanólicas, com iluminação contínua utilizando-se LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$) como fonte de luz (Figura 13), à temperatura ambiente em intervalos de 4 e 8 minutos durante 100 minutos e foi realizado o monitoramento da absorbância na região do UV-Vis em um espectrofotômetro localizado no Laboratório Grisa do Instituto de Química da UFU, Campus Santa Mônica.

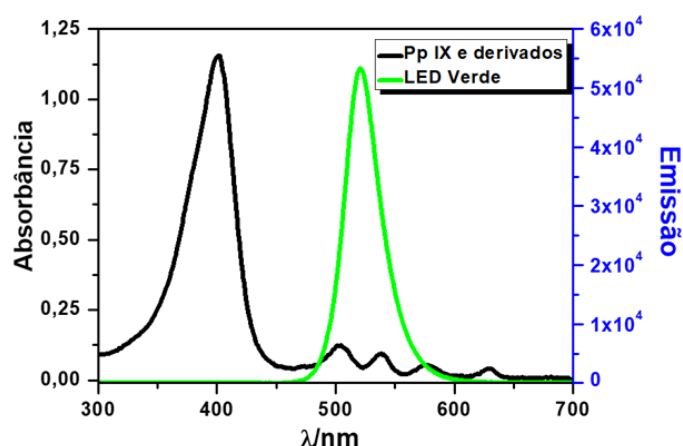
Figura 13 - LED verde utilizado como sistema de irradiação.



Fonte: A autora (2022).

O espectro de emissão do LED verde (Figura 14) utilizado para irradiação das porfirinas, sobreposto ao espectro de absorção das porfirinas, mostra que ao utilizar este sistema de irradiação tem-se fótons absorvidos na região entre 490 nm e 575 nm pela porfirina.

Figura 14 - Sobreposição dos espectros de absorção do derivado de PpIX e emissão do LED verde.



Fonte: A autora (2022).

3.2.6 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete $^1\text{O}_2$ (ϕ_Δ)

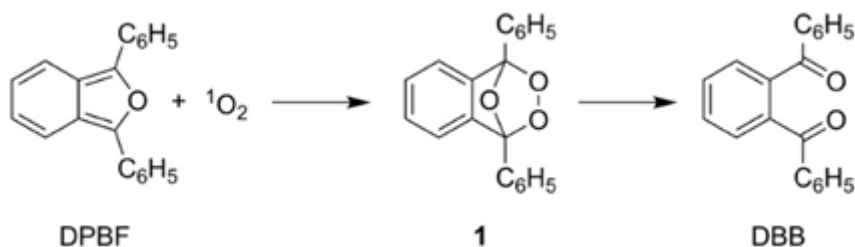
O rendimento quântico de oxigênio singlete pode ser determinado pelo método indireto, onde é realizado o monitoramento da oxidação de substratos específicos que reagem com o oxigênio singlete, ou seja, o método indireto observa a cinética de degradação do substrato junto de um padrão conhecido e tabelado e compara-se com a cinética de degradação do mesmo substrato com a amostra realizando leitura de UV-Vis ou emissão de fluorescência (BUK, 2018).

O 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) é um excelente substrato para $^1\text{O}_2$, sendo assim, a formação de oxigênio singlete pela excitação das porfirinas com luz e transferência de energia para o oxigênio molecular foi quantificada pelo método indireto, utilizando DPBF (CARLONI et al., 1993).

A base da detecção de $^1\text{O}_2$ por DPBF consiste na reação irreversível que ocorre entre ambos ($^1\text{O}_2$ e DPBF), que forma um endoperóxido por meio de uma cicloadição [4 + 2] e se decompõe em 1,2-dibenzoilbenzeno (DBB) (Figura 15),

resultando na diminuição da absorbância DPBF em 410 nm (ENTRADAS; WALDRON; VOLK, 2020).

Figura 15 - Reação do $^1\text{O}_2$ com o DPBF.



Fonte: Reproduzido de (ENTRADAS; WALDRON; VOLK, 2020)

O corante Rosa de Bengala (RB) foi utilizado como padrão, já que apresenta ϕ_Δ (RB) = 0,76 em metanol (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002) sob irradiação em comprimento de onda entre 500 – 580 nm (ENTRADAS; WALDRON; VOLK, 2020).

O DPBF foi dissolvido em metanol e mantido sob refrigeração. As amostras de porfirinas e do padrão (RB) foram solubilizadas em metanol e foi acrescentado a sonda de DPBF com irradiação do LED Verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$), potência 0.002266 W, à 5,2 cm da amostra, sob agitação magnética constante.

As leituras de fluorescência foram realizadas com soluções diluídas, para se evitar o efeito do filtro interno. De tal modo que o DPBF apresentou intensidade de absorbância de 0,3 no $\lambda_{\text{exc}} = 410 \text{ nm}$, a absorbância das porfirinas foi de 0,05 no $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$, enquanto a absorbância do RB (padrão) também foi de 0,05 no $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$. As fendas de excitação e emissão utilizadas foram de 10 nm e 20 nm, respectivamente. Os espectros de emissão de fluorescência foram registrados no espectrofluorímetro, Marca Agilent Technologies®, Modelo Cary Eclipse localizado no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU, Campus Pontal.

A constante cinética de fotodegradação do DPBF (K) foi determinada aplicando a equação de primeira ordem (Equação 3) (Rocha, 2018):

$$Kt = \ln\left(\frac{A_0}{A_t}\right) \quad (3)$$

Onde,

K: constante de velocidade de fotodecomposição do DPBF,

t: tempo de decaimento emissão DPBF em 410 nm

A₀: emissão comprimento de onda máximo de DPBF (410 nm) no tempo zero

A_t: emissão comprimento de onda máximo de DPBF (550 nm) no intervalo de tempo (t) irradiado

Para determinar o rendimento de oxigênio singleto utilizou a equação 4 (OGUNSIPE; CHEN; NYOKONG, 2004; SINDELO et al., 2019:

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta}^{\text{padrão}} \frac{K}{K^{\text{padrão}}} \frac{I^{\text{padrão}}}{I} \quad (4)$$

Onde,

$\phi_{\Delta}^{\text{padrão}}$: rendimento quântico de oxigênio singleto do padrão, neste caso RB, i.e. $\phi_{\Delta}^{\text{RB}} = 0,76$ (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002).

ϕ_{Δ} : rendimento quântico de oxigênio singleto da amostra (PpIX-Metil-Piperazina ou PpIX-Morfolina)

K: constante de velocidade de fotodegradação do DPBF em presença da amostra (PpIX-Metil-Piperazina ou PpIX-Morfolina) sob irradiação ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$)

K^{padrão}: constante de velocidade de fotodegradação do DPBF em presença do padrão (RB) sob irradiação ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$)

I: taxa de absorção de luz da amostra (PpIX-Metil-Piperazina ou PpIX-Morfolina)

I^{padrão}: taxa de absorção de luz do padrão (RB).

3.2.7 Avaliação da interação da HSA com as porfirinas

A Albumina Sérica Humana (HSA) foi preparada para concentração $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. Um dos grandes desafios é das porfirinas se agregarem em soluções aquosas o que atrapalha na interação com as proteínas que interferem fortemente nos experimentos ópticos e dificultam a capacidade de quantificar os

parâmetros de ligação, entre outros problemas (HU et al., 2019).

Foram monitorados no total de 11 pontos, com soluções bem diluídas onde adicionamos 3 mL do tampão PBS e alíquotas das porfirinas diluídas em DMSO de 0 µL até 50 µL, aumentando 5 µL a cada medida, e os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro UV-Vis-NIR Cary Series e os espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofotômetro localizado no Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da UFU, Campus Pontal, com a colaboração da Mestre Nayara Bessas. O experimento foi monitorado em temperatura de 35° C.

A leitura de fluorescência foi realizada com $\lambda_{exc} = 280$ nm para registro do espectro de emissão da HSA e fendas de 5 nm e 20 nm para excitação e emissão, respectivamente. Para obtenção dos espectros de emissão de fluorescência das porfirinas utilizou-se $\lambda_{exc} = 408$ nm, onde apresentam sua banda Soret de absorção, e fendas de 5 nm para excitação e 10 nm para emissão.

As constantes de supressão de fluorescência foram calculadas a partir da Equação 5 de Stern-Volmer (K_{sv}) (VASCONCELOS, 2019) que é razão entre a inclinação e a interceptação da equação da reta

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q t_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (5)$$

Onde,

$[Q]$ = concentração das porfirinas;

F_0 e F = intensidade inicial e final de emissão de fluorescência da HSA, respectivamente;

K_{sv} = constante de supressão de Stern-Volmer,

K_q = constante de supressão bimolecular;

t_0 = tempo de vida sem a supressão.

E assim, como não é um processo dinâmico, mas estático, Stern-Volmer e Scatchard previu a constante de ligação aparente (K_b) e sítio de ligação (n) na proteína HSA (FOLETTTO, 2019) calculado na Equação 6 a seguir:

$$\text{Log} \left\{ \frac{(F_0 - F)}{F} \right\} = \text{Log } K_b + n \text{ Log } [Q] \quad (6)$$

Onde,

F_0 e F = intensidade inicial e final de emissão de fluorescência, respectivamente;

K_b = constante de ligação;

n = número de sítios de ligação;

$[Q]$ = concentração das porfirinas.

3.3 Ensaios biológicos

3.3.1 Linhagem celular e cultivo

As células de carcinoma do colo do útero humano (HeLa) foram cedidas pelo Prof. Dr. Maurício Baptista (Instituto de Química da USP) e foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *high glucose* (4500 mg/L de glicose, L- glutamina, piruvato de sódio, bicarbonato de sódio e vermelho de fenol) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina (10,0 unidades) e estreptomicina (10 mg) a 37°C em uma incubadora de CO₂ (95% em relação umidade, 5% CO₂) e o meio foi trocado três vezes por semana.

O cultivo e manipulação das células tumorais foram realizados no Laboratório de Biologia da Reprodução coordenado pelo professor Dr. Marcelo Emílio Beletti situado na UFU, Campus Umuarama.

O número de células semeadas e utilizadas nos experimentos foram contadas em câmara de Neubauer e avaliadas empregando os cálculos de células viáveis com o método de exclusão de Azul de Tripán 2% (m: v) (SIGMA-ALDRICH CO ST LOUIS, MO, EUA).

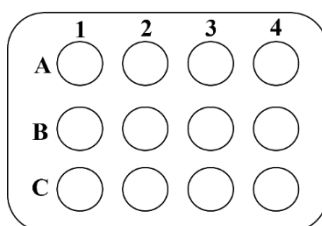
3.3.2 Incorporação dos FSs em células HeLa

As porfirinas foram previamente solubilizadas em DMSO na concentração de 10 µM e diluídas em meio de cultura, de forma a garantir < 1% DMSO na

solução final.

Em placas de 12 poços foram distribuídas 150 000 células em cada poço por 24 horas em uma estufa de CO₂ (5%) a 37 °C. Após o período de aderência das células na placa, foi realizada a lavagem dos poços com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) e, logo em seguida foi adicionado o FS diluído em meio de cultura completo, com incubação por mais 24 horas. A distribuição utilizada na placa pode ser observada na Figura 16.

Figura 16 - Representação de microplaca para cultivo celular de 12 poços.



Fonte: A autora (2023).

Onde, a coluna (1A, 1B, 1C) – Apenas células HeLa para controle, na coluna (2A, 2B, 2C) – PpIX, coluna (3A, 3B, 3C) – PpIX-Metil-Piperazina e coluna (4A, 4B, 4C) – PpIX-Morfolina.

Após a incubação, o DMEM da placa foi retirado e armazenado em eppendorf, realizando diluição na proporção de 1:1 do meio de cultura em DMSO ($Abs_{células}$). E logo em seguida, foi adicionado DMSO diretamente na placa, para lavagem dos poços com as células aderidas e diluídas 1:1 em DMEM ($Abs_{sobrenadante}$).

Foram realizadas leituras de absorção no espectrofotômetro UV-Vis, da marca Shimadzu UV-2501 PC, disponível no Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LasFar) do Instituto de Química da UFU, Campus Santa Mônica.

Para obter a porcentagem de células incorporadas foram realizados cálculos da integral da banda Soret das porfirinas de 325 nm a 440 nm e realizada os cálculos através da Equação 7:

$$\% \text{ Incorporação} = \frac{Abs_{células}}{Abs_{células} + Abs_{sobrenadante}} \times 100 \quad (7)$$

Onde,

$Abs_{\text{células}}$ = área das bandas de absorbância da solução do FS extraído da célula (325 nm a 440 nm)

$Abs_{\text{sobrenadante}}$ = área das bandas de absorbância da solução do sobrenadante (325 nm a 440 nm).

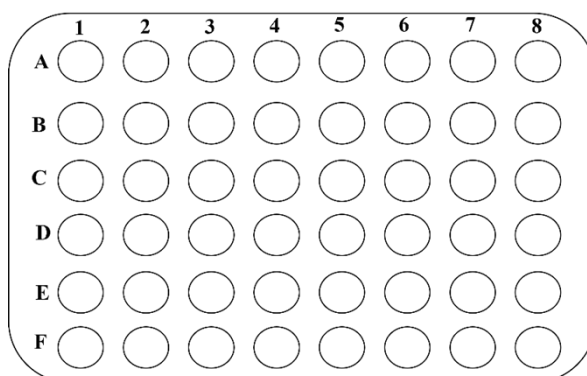
3.3.3 Ensaio de viabilidade celular pelo método MTT

As porfirinas foram previamente solubilizadas em DMSO em diferentes concentrações e diluídas em meio de cultura, de forma a garantir < 1% DMSO na solução final.

Para avaliar a viabilidade e os efeitos das porfirinas em células, foram cultivadas e transferidas para uma placa de 48 poços contendo em cada poço aproximadamente 28 000 células e incubadas por 24 horas para aderência.

Após o tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado, foi realizada a lavagem dos poços com PBS, e adicionado a solução de FS diluído em DMEM (contendo < 1% DMSO) em diferentes concentrações, com distribuição que pode ser observada na Figura 17.

Figura 17 - Representação de microplaca para cultivo celular de 48 poços.



Fonte: A autora (2023).

Onde,

Coluna (1A até 1F) – apenas células HeLa para controle,

Coluna (2A, 2B, 2C) – PpIX na concentração de 100 nM,

Coluna (3A, 3B, 3C) – PpIX na concentração de 150 nM,

Coluna (2D, 2E, 2F) – PplX na concentração de 200 nM,
Coluna (3D, 3E, 3F) – PplX na concentração de 300 nM,
Coluna (4A, 4B, 4C) – PplX-Metil-Piperazina na concentração de 50 nM,
Coluna (5A, 5B, 5C) – PplX-Metil-Piperazina na concentração de 100 nM,
Coluna (6A, 6B, 6C) – PplX-Metil-Piperazina na concentração de 150 nM,
Coluna (7A, 7B, 7C) – PplX-Metil-Piperazina na concentração de 200 nM,
Coluna (8A, 8B, 8C) – PplX-Metil-Piperazina na concentração de 300 nM,
Coluna (4D, 4E, 4F) – PplX-Morfolina na concentração de 50 nM,
Coluna (5D, 5E, 5F) – PplX- Morfolina na concentração de 100 nM,
Coluna (6D, 6E, 6F) – PplX- Morfolina na concentração de 150 nM,
Coluna (7D, 7E, 7F) – PplX- Morfolina na concentração de 200 nM,
Coluna (8D, 8E, 8F) – PplX- Morfolina na concentração de 300 nM,

Após 24 horas, o DMEM foi retirado e novamente foi realizada a lavagem dos poços com PBS. O meio de cultura foi adicionado e as células incubadas por mais 24 horas.

Decorrido o tempo foi adicionado 100 µL da solução do reagente 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (MOSMANN, 1983) (0.75mg/mL) aos 300 µL de DMEM e deixado em repouso por 3 horas na estufa de CO₂ (5%) a 37 °C, de modo que a concentração final do MTT é de 0,50 mg/mL.

A redução do MTT é um método colorimétrico rápido, frequentemente utilizado para medir proliferação celular e citotoxicidade. Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de formazan de coloração violeta precipitado no fundo do poço, decorrentes da atuação das enzimas mitocôndrias das células viáveis (UCHOA-FERNANDES, 2007). São esses cristais formazan que serão solubilizados em DMSO, obtendo uma solução de coloração roxa dependendo da quantidade de cristais formados.

A solução foi totalmente retirada da placa, tomando o cuidado para não retirar os cristais formados e foi adicionado 300 µL de DMSO para solubilização total dos cristais.

Para obter a porcentagem de células viáveis após o tratamento, foi realizada a leitura de absorbância em uma leitora de placas disponível no Laboratório de Imunoparasitologia “Dr Mário Endsfieldz Camargo” no Bloco 4C

no Campus Umuarama – UFU e realizado os cálculos utilizando a seguinte equação 8:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{Abs_{tratamento}(570 \text{ nm} - 800 \text{ nm})}{Abs_{CT}(570 \text{ nm} - 800 \text{ nm})} \times 100\% \quad (8)$$

Em que,

$Abs_{tratamento}$ = leituras nos comprimentos de onda de 570 nm e 800 nm das células controle (CT),

Abs_{CT} = leituras nos comprimentos de onda de 570 nm e 800 nm das células tratadas.

Após a determinação de faixa de concentração que não demonstra toxicidade no escuro para as células HeLa, foram realizados ensaios para a determinação de fototoxicidade, com uso de LED verde - 522 ± 10 nm.

O procedimento é semelhante ao detalhado anteriormente, onde após a adição dos FSs por 24 horas (Figura 17), o meio de cultura foi retirado e foi realizada a lavagem dos poços com PBS. Foi adicionado novamente o PBS para a realização da irradiação por um período de 15 minutos utilizando o LED da Figura 13 que emite na faixa de 522 ± 10 nm com a amostra à 10 cm de distância do LED onde temos 1,5 mW de potência e uma dose de energia de ≈ 2 J/cm².

A dosimetria da energia de luz aplicada para os cultivos celulares foi determinada pelo *Optical Power Meter* da *Newport Model 1916-R* conectado à um detector *Newport Model 818-UV S/N 10488* que mede na faixa espectral entre 200 e 1000 nm e cuja área do sensor é de 0,785 cm². O cálculo utilizado para medir as fluências energéticas utilizadas para o tratamento das linhagens tumorais com a TFD está representado abaixo na equação 9 (SILVA et al., 2010):

$$D = I \left(\frac{W}{cm^2} \right) \times T(s) = \frac{Potência (w) \times Tempo (s)}{Área (cm^2)} \quad (9)$$

Onde:

Dose - energia necessária para excitação dos fótons dada por J/cm².

P - Potência: intensidade da fonte de luz a uma determinada distância, medida em watts.

T - Tempo: período em segundos de exposição à fonte de luz necessária para a excitação dos fótons.

Área: espaço da amostra a ser irradiada pela fonte de luz medida pela área do fundo da placa.

Após a irradiação, foi adicionado um novo meio de cultura e as células foram mantidas por 24 horas em uma estufa de CO₂ (5%) a 37 °C e, após o período foram adicionados 100 µL de MTT, levando novamente para a estufa de CO₂ (5%) a 37 °C no período de 3 horas, a fim de obter os cristais de formazan como mencionado anteriormente.

Os cristais formazan formados foram solubilizados em DMSO, e para obter a porcentagem de células viáveis, foi realizado a leitura de absorbância em uma leitora de placas disponível no Laboratório de Imunoparasitologia “Dr Mário Endsfieldz Camargo” no Bloco 4C no Campus Umuarama - UFU e realizado os cálculos utilizando a equação 8.

O valor de IC₅₀ (concentração em µmol L⁻¹ que inibe 50 % da viabilidade celular) foi determinada por meio da curva dose resposta utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.3.4 Ensaio de viabilidade pelo método MTT com formulados (FS-Polímero) em células HeLa

Os formulados poliméricos à base de polaxamer e carboximetilcelulose, com os FS encapsulados, foram preparados pela Prof^a Jéssica Bassi da Universidade Federal de Maringá - UEM.

O sistema monopolimérico com P407 foi constituído de 17,5% (m/m) de P407 e sistemas poliméricos binários com P407 e CMC foram constituídos com 17,5% (m/m) de P407 e 0,1% (m/m) de CMC.

Os sistemas monopoliméricos foram preparados adicionando P407 lentamente em água purificada, os quais foram mantidos em repouso, em geladeira, até completa hidratação e dispersão polimérica. Após 24 horas, as preparações foram homogeneizadas, por 30 minutos, sob agitação mecânica e banho de gelo. Para as preparações contendo o princípio ativo, 0,001% (m/m) de Pp IX ou PpIX-Metil-Piperazina ou PpIX-Morfolina foram adicionados na mistura de P407 e água, que ficou sob agitação mecânica por 60 minutos.

Para os sistemas poliméricos binários, o polímero P407 foi adicionado lentamente em uma parte da água purificada total. Este sistema foi mantido em repouso, em geladeira, até completa hidratação e dispersão do P407. Após 24 horas, as preparações foram homogeneizadas, por 30 minutos, sob agitação mecânica e banho de gelo. Concomitantemente, o CMC foi disperso na parte restante da água purificada, por 30 minutos, sob agitação mecânica. Posteriormente, a mistura de CMC e água foi acrescida na porção contendo P407 e foi agitada, por mais 30 minutos, até completa homogeneização das preparações. Para as preparações binárias contendo o ativo, 0,001% (m/m) de Pp IX ou PpIX-Metil-Piperazina ou PpIX-Morfolina foram adicionados na mistura de P407 e água, que ficou sob agitação mecânica por 60 minutos. Em seguida, a porção contendo CMC e água foi adicionada ao sistema, que ficou sob agitação até completa homogeneidade. Todos os sistemas foram congelados e liofilizados. Após a adição do princípio ativo, todas as preparações foram protegidas da luz.

Foram realizados os ensaios de fototoxicidade utilizando os formulados que foram solubilizados em DMEM, de acordo com a proporção descrita na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2 - Proporção para solubilização dos formulados.

| P407 | P407-CMC |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 17,501g formulado – 0,001g FS | 17,601g formulado – 0,001g FS |

Fonte: A autora (2023).

Foi preparada uma solução estoque de 500 nM e foram realizadas as diluições, com concentrações iguais a descrição da Figura 17, com modificação apenas na Coluna 1, onde de 1A, 1B e 1C são de células HeLa para controle, e os poços 1D, 1E e 1F são células HeLa com os formulados sem adição dos FSs.

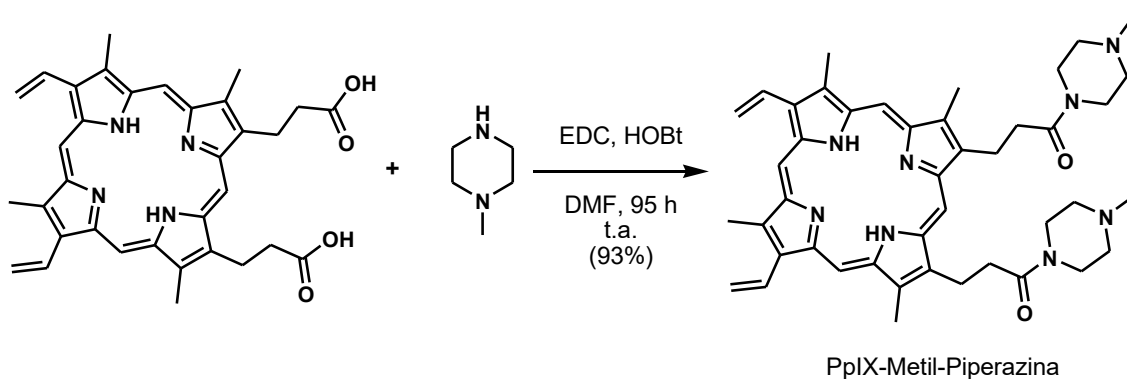
Os cristais formazan formados foram solubilizados em DMSO, e para obter a porcentagem de células viáveis, realizou-se a leitura de absorbância em uma leitora de placas disponível no Laboratório de Imunoparasitologia “Dr Mário Endsfieldz Camargo” no Bloco 4C no Campus Umuarama - UFU e realizado os cálculos utilizando a equação 8.

4 Resultados e discussão

4.1 Síntese e caracterização

Os derivados da PpIX foram preparados a partir de reações de amidação entre a PpIX com diferentes aminas utilizando o agente de condensação EDC e catálise com HOBt em DMF. A PpIX-Metil-Piperazina, uma diamida, foi obtida em 93% de rendimento após 95h de agitação à temperatura ambiente (Figura 18).

Figura 18 - Síntese da PpIX-Metil-Piperazina realizada no LasFar.



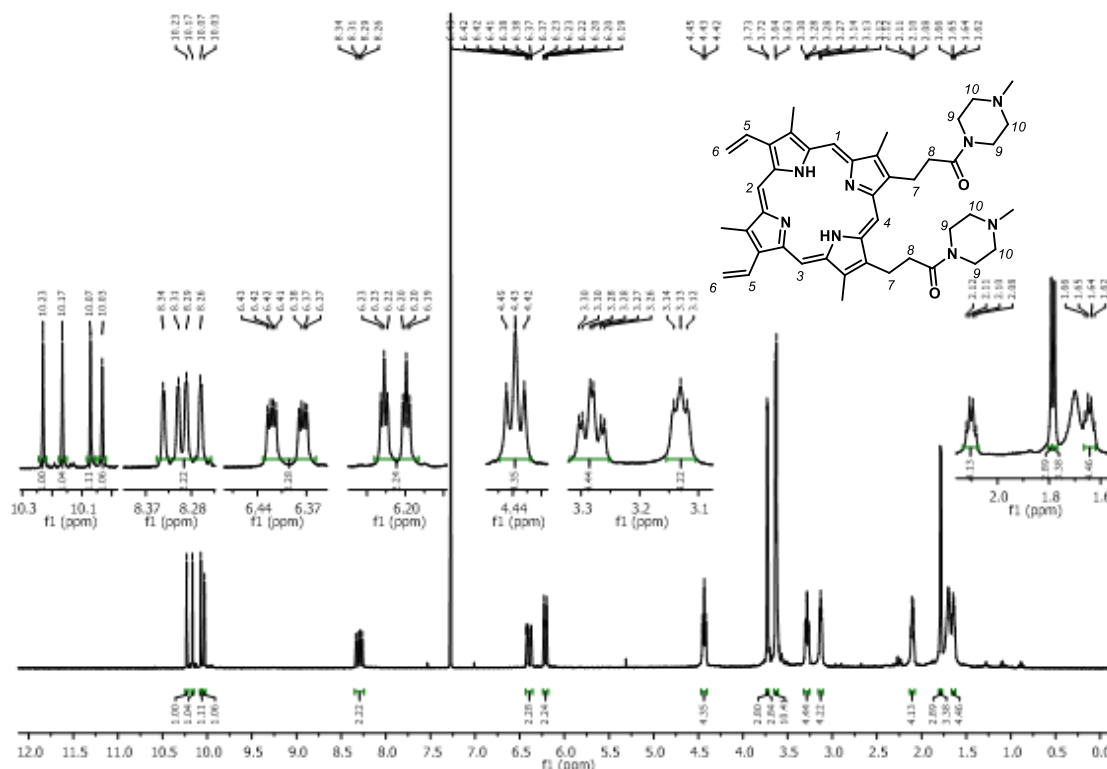
Fonte: Gentilmente elaborado e cedido pelo grupo LasFar (2023).

A formação desse produto foi evidenciada pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figuras 19 e 20), que são capazes de determinar o esqueleto carbonohidrogênio de uma molécula.

No espectro de RMN de ^1H da PpIX-Metil-Piperazina (Figura 19) é possível observar quatro singletos próximos de 10 ppm referentes aos hidrogênios H1-4, um duplo duplete em 8,28 ppm referente a H-5 e dois multipletos entre 6,43 e 6,19 ppm referentes aos quatro hidrogênios H6.

Os sinais referentes aos oito hidrogênios H9 foram observados entre 4,43 e 3,63 ppm juntamente com os sinais correspondentes à doze hidrogênios de quatro metilas, enquanto os sinais referentes aos outros dezesseis hidrogênios metilênicos (H7, H8 e H10) e seis hidrogênios metílicos foram observados entre 3,30 e 1,62 ppm.

Figura 19 - ^1H RMN da PpIX-Metil-Piperazina (400 MHz, CDCl_3).

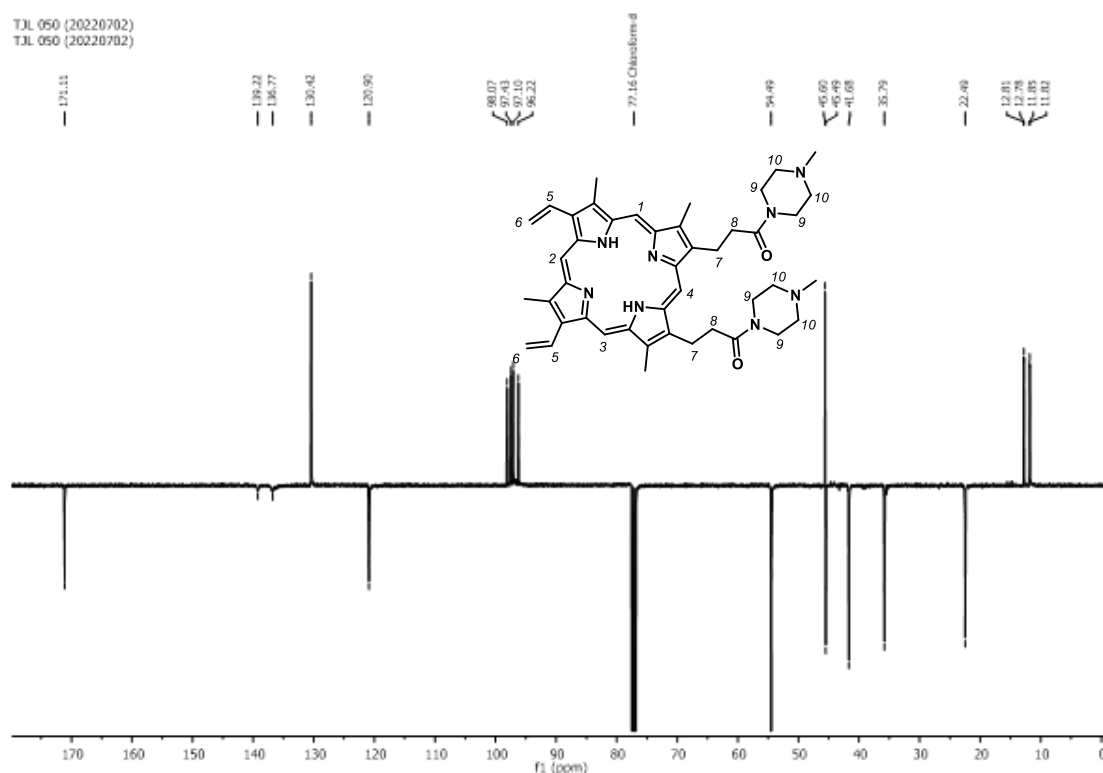


Fonte: Obtido e gentilmente cedido pelo grupo do LasFar (2023).

No espectro de RMN de ^{13}C (APT) – Figura 20 - é possível observar um sinal em 171,11 ppm referente aos dois carbonos carbonílicos, cinco sinais com fase para cima referentes aos seis carbonos C1-5 e três sinais com fase para baixo referentes aos carbonos pirrólicos e C6 na região entre 139,22 e 96,22 ppm.

O sinal em 45,60 ppm corresponde aos carbonos N-metilícos, enquanto os quatro sinais entre 12,81 e 11,82 ppm correspondem aos carbonos metílicos dos fragmentos pirróis. O sinal em 54,49 ppm foi atribuído aos carbonos C9, enquanto os quatro sinais com fase para baixo entre 45,49 e 22,49 ppm foram atribuídos aos carbonos metilênicos C7, C8 e C10.

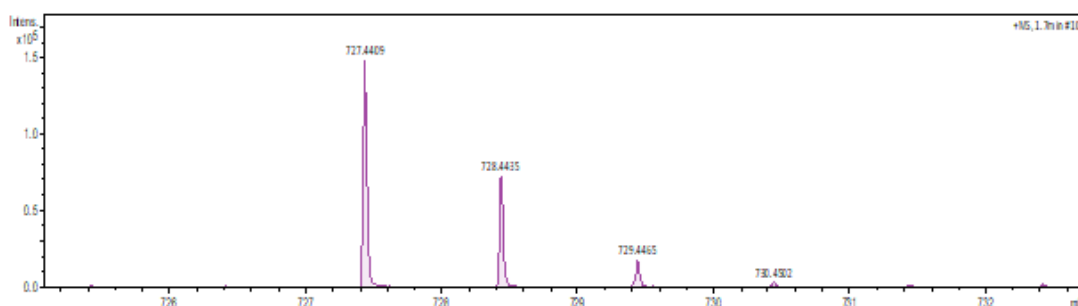
Figura 20 - ^{13}C RMN da PpIX-Metil-Piperazina (101 MHz, CDCl_3).



Fonte: Obtido e gentilmente cedido pelo grupo do LasFar (2023).

A análise de HRMS é utilizada para identificação, quantificação e caracterização molecular e estrutural de amostras. No espectro de HRMS da PpIX-Metil-Piperazina (Figura 21) é possível identificar o pico do íon molecular ($\text{M} + \text{H}^+$) em 727,4409 m/z, evidenciando a formação do produto desejado.

Figura 21 - Espectro obtido referente a técnica de electrospray da PpIX-Metil-Piperazina.

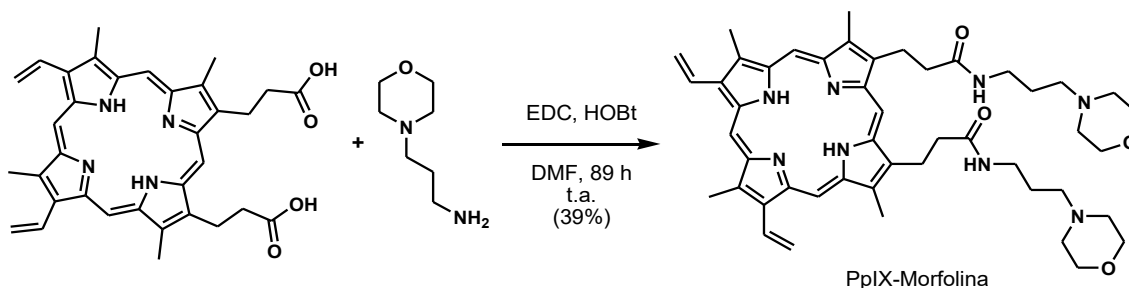


Fonte: Obtido e gentilmente cedido pelo grupo do LasFar (2023).

A PpIX-Morfolina foi sintetizada em 39% de rendimento após 89 horas de

reação à temperatura ambiente (Figura 22).

Figura 22 - Síntese da PpIX-Morfolina realizada no LasFar.



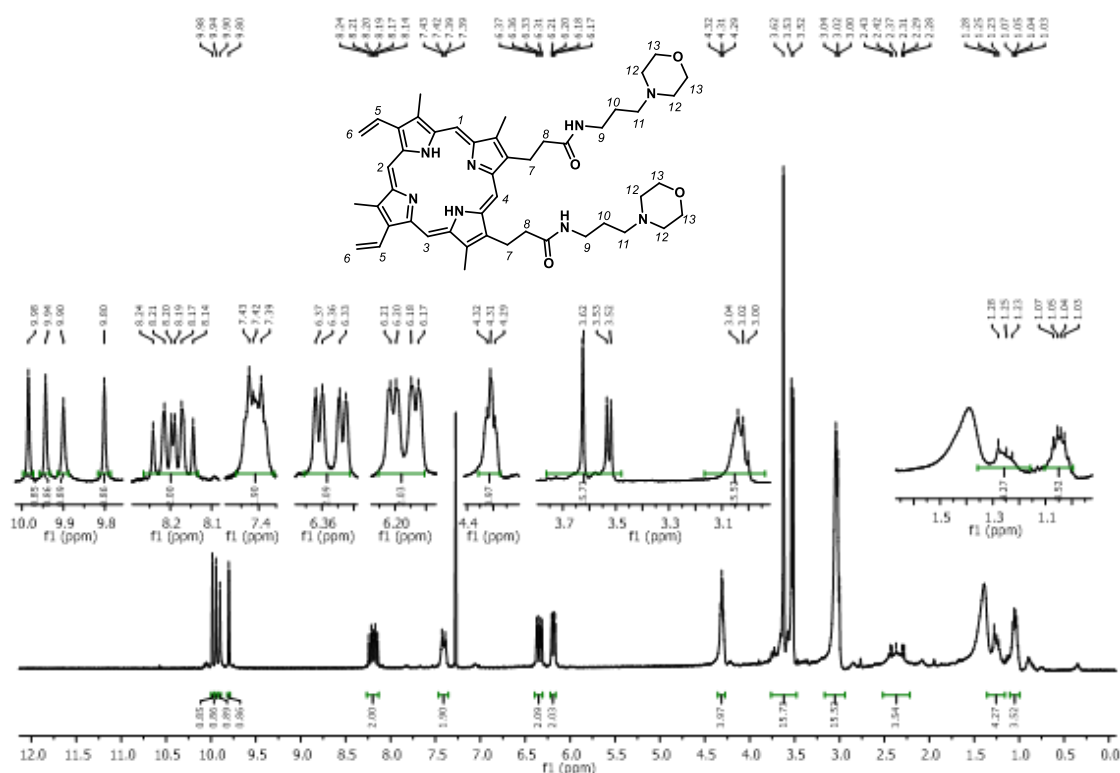
Fonte: Gentilmente elaborado e cedido pelo grupo LasFar (2023).

A formação do produto foi evidenciada pelos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 23 e 24) onde foi possível identificar os sinais referentes aos hidrogênios e carbonos.

No espectro de RMN de ^1H da PpIX-Morfolina (Figura 23) é possível observar quatro singletos na região de 9,98 – 9,90 ppm referentes aos hidrogênios H1-4 e dois multipletos em 8,24 – 8,14 ppm e 7,43 – 7,39 ppm referentes aos hidrogênios H-5 e H-NC=O, respectivamente.

Os multipletos entre 4,31 e 3,00 ppm são referentes aos 36 hidrogênios H-9, H11-13, enquanto o multipletos em 2,43 – 2,28 ppm é referente a H-8 e os multipletos entre 1,28 e 1,03 ppm são correspondentes aos hidrogênios H-7 e H-10, respectivamente.

Figura 23 - ^1H RMN da PpIX-Morfolina^{tr} (400 MHz, CDCl_3).

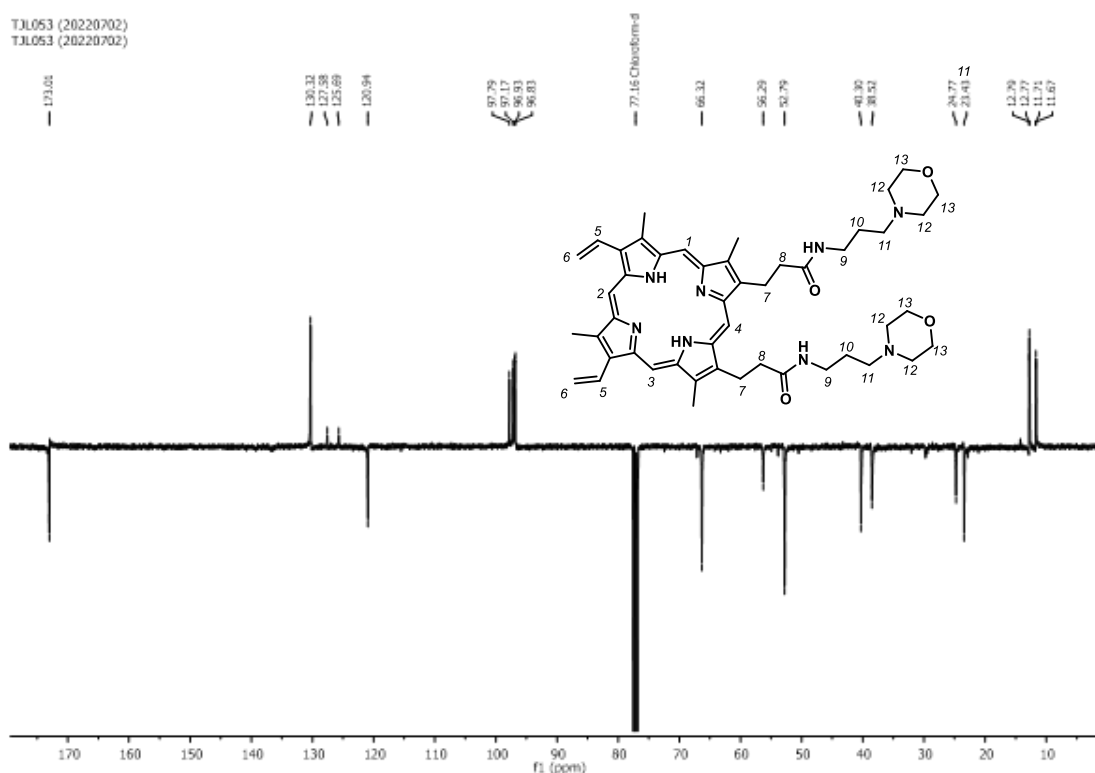


Fonte: Obtido e gentilmente cedido pelo grupo do LasFar (2023).

No espectro de RMN de ^{13}C (APT) – Figura 24 - é possível observar um sinal em 173,02 ppm referente aos carbonos carbonílicos, quatro sinais com fase para cima entre 130,32 e 96,83 ppm referentes aos seis carbonos C-1-5 e um sinal com fase para baixo em 120,94 ppm referente a C-6.

Os sete picos com fase para baixo entre 66,32 e 23,43 ppm são referentes aos carbonos metilênicos nas ramificações da estrutura e os sinais entre 12,79 e 11,67 ppm correspondem aos carbonos metílicos.

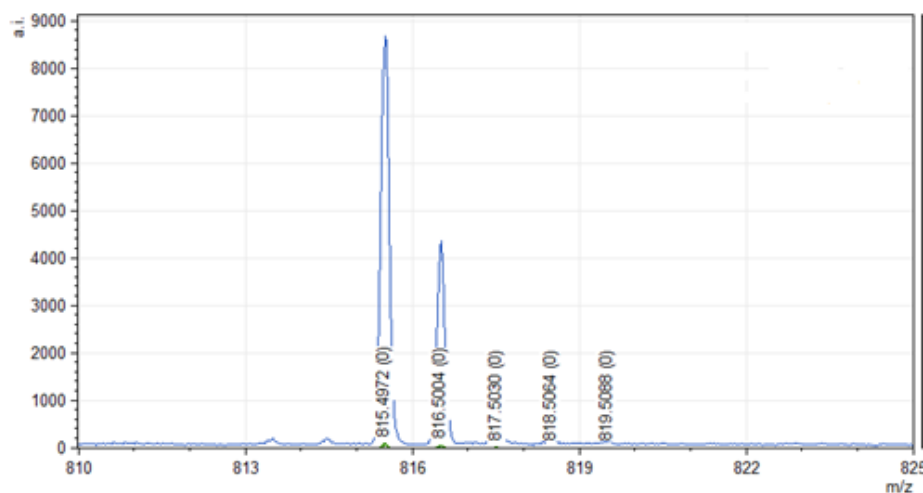
Figura 24 - ^{13}C RMN da PpIX-Morfolina. (100 MHz, CDCl_3).



Fonte: Obtido e gentilmente cedido pelo grupo do LasFar (2023).

Já a análise de Espectrometria de Massas de Alta Resolução para a PpIX-Morfolina foi obtida pelo método MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) e obtemos o seguinte espectro (Figura 25), onde foi possível identificar o pico do íon molecular do produto desejado.

Figura 25 - Espectros obtidos pelo método MALDI-TOF para PpIX-Morfolina.



Fonte: A autora (2023).

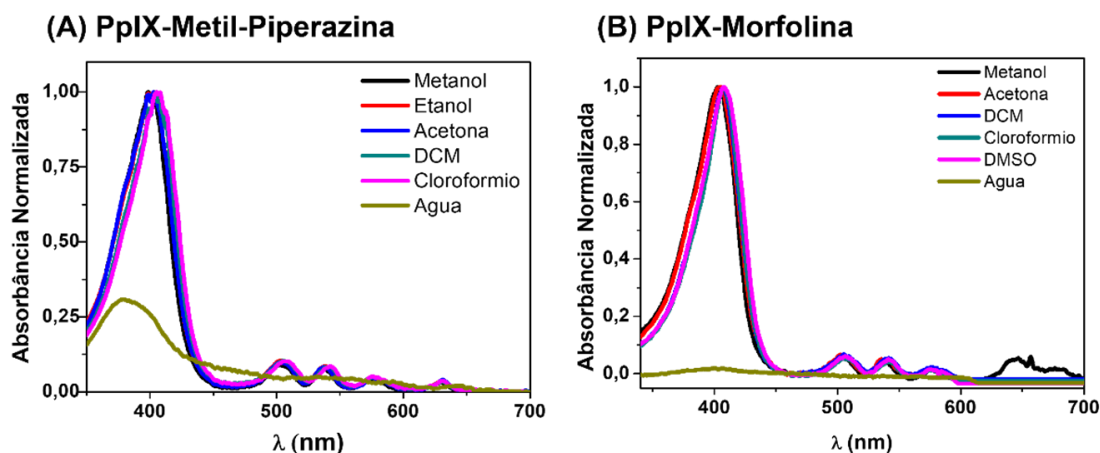
4.2 Espectroscopia de absorção UV-Visível dos derivados da PpIX

Porfirinas são compostos intensamente coloridos e apresentam um espectro de absorção característico com uma banda de absorção intensa em torno de 420 nm ($\log \epsilon > 5,00$) denominada banda B ou Soret, e outras de menor intensidade na faixa de 500 a 700 nm, chamadas de bandas Qy (1-0), Qy (0-0), Qx (1-0) e Qx (0-0) (IGLESIAS, 2012).

Sabe-se que o solvente pode exercer influência sobre várias propriedades eletrônicas como, por exemplo, a posição, intensidade e na forma de bandas espectrais (DAMASCENO, 2014). Isso ocorre porque os espectros eletrônicos de absorção estão relacionados às interações soluto-solvente, e por isso a escolha do solvente a ser usado é importante tanto para garantir que a molécula se encontra no estado monomérico, quanto para caracterização via espectroscopia UV-Vis (SUPPAN, 1989).

Nesse sentido, inicialmente registrou-se o espectro de absorção dos derivados de PpIX em solventes de diferentes graus de polaridade (Figura 26), como metanol (CH_3OH), etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), diclorometano (DCM), água (H_2O), clorofórmio (CHCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO).

Figura 26 - Espectros de absorção eletrônica (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina em diferentes solventes.



Fonte: A autora (2022).

Como esperado, os espectros de absorção UV-visível dos derivados de PpIX (Figura 26) exibiram uma banda Soret intensa em cerca de 400 nm e quatro bandas Q mais fracas na faixa visível, em metanol, etanol, acetona, diclorometano, clorofórmio e dimetilsulfóxido.

Esses espectros são típicos de porfirina no estado monomérico, no qual tanto a banda Soret quanto as bandas Q observadas são resultantes das transições eletrônicas $\pi - \pi^*$ entre os orbitais HOMO e LUMO no anel porfirínico (SANTOS et al., 2015). Portanto, pode-se dizer que ambas as moléculas, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina, mostraram-se solúveis na forma monomérica em quase todos os solventes estudados, com exceção da água.

Em solução aquosa, foi observada uma diminuição significativa da intensidade da banda de Soret (≈ 400 nm) e das bandas Q (QIV, QIII, QII, QI) entre 500 e 700 nm (Figura 26), com um deslocamento da banda Soret para menor comprimento de onda (390 nm), no caso da PpIX-Metil-Piperazina. Essa diminuição significativa de intensidade de absorção e deslocamento do comprimento de onda é característica da forma agregado de porfirinas em solução aquosa (TSUBONE, 2017). O fenômeno de auto-agregação será mais bem discutido nos resultados descritos a seguir que envolvem obtenção dos espectros da PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina em misturas água/metanol e água/DMSO (item 4.8).

O solvatocromismo observado neste estudo foi avaliado através dos parâmetros do solvente apresentados na Tabela 3 - escala ET (30), momento de dipolo (μ) e constante dielétrica (ϵ) (SANTOS et al., 2015). ET (30) é um parâmetro de polaridade que caracteriza a polaridade dos diferentes solventes. Quanto maior o valor de ET (30), maior será a polaridade do solvente (MYRZAKHMETOV et al., 2021).

Os compostos que exibem solvatocromismo, são conhecidos por apresentar as pronunciadas mudanças na posição, e algumas vezes na intensidade, de uma banda de absorção nos espectros de UV/Vis que acompanha a mudança da polaridade do meio (MACHADO, 1997).

Tabela 3 - Parâmetros físico-químicos dos solventes.

| Solvente | ET (30) | μ | $\epsilon^{\#}$ |
|----------|---------|-------|-----------------|
|----------|---------|-------|-----------------|

| | (kcal/mol) * | (Debye) [#] | |
|---------------|--------------|----------------------|------|
| Água | 63,14 | 1,87 | 79,7 |
| Metanol | 55,4 | 1,7 | 32,6 |
| Etanol | 51,9 | 1,7 | 22,4 |
| DMSO | 45,1 | 3,96 | 46,6 |
| Acetona | 42,2 | 2,9 | 20,6 |
| Diclorometano | 40,7 | 1,8 | 9,1 |
| Clorofórmio | 39,1 | 1,1 | 4,8 |

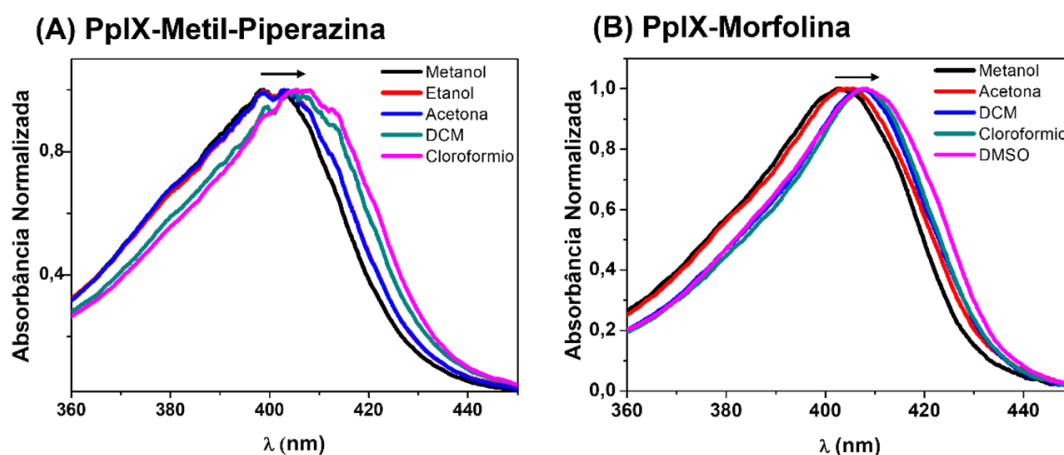
*(REICHARDT, 1994); [#](SMALLWOOD, 1996)

ET (30) = polaridade do solvente (25 °C) (REICHARDT, 1994); μ = momento dipolar (SMALLWOOD, 1996) ϵ = constante dielétrica (20 °C)(SMALLWOOD, 1996).

O comprimento de onda de absorção é fortemente dependente da estrutura química do FS e do solvente (SANTOS et al., 2015). A Figura 27 mostra as intensidades de absorção normalizadas, evidenciando que o comprimento de onda máximo da banda Soret desloca para região do vermelho em solventes de menor polaridade (valor ET (30) menor).

Uma mudança hipsocrômica da banda com o aumento da polaridade do solvente é denominada solvatocromismo negativo, ao passo que a correspondente mudança batocrômica com o aumento da polaridade é chamada de solvatocromismo positivo (MACHADO, 1997).

Figura 27 - Espectros de absorção eletrônica de UV-vis com intensidades normalizadas, obtidos em diferentes solventes orgânicos: (A) Pp IX -Metil - Piperazina e (B) PpIX-Morfolina.



Fonte: A autora (2022).

Estas mudanças espectrais que acompanham a mudança do solvente surgem como um resultado das forças de interação entre as moléculas do soluto e do solvente, tais como íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, ligações de hidrogênio, etc., que por sua vez tendem a alterar a diferença de energia entre os estados fundamental e excitado do cromóforo de um corante (MACHADO, 1997).

Uma interpretação qualitativa do efeito do solvente sobre as transições eletrônicas dos compostos solvatocrômicos pode ser feita considerando a diferença entre o momento de dipolo dos estados fundamental e excitado do soluto. Assim, quando o momento de dipolo do composto no estado fundamental é menor do que aquele do primeiro estado excitado, solventes mais polares estabilizarão mais marcadamente o estado excitado, resultando em um solvatocromismo positivo. Já para compostos em que na transição eletrônica o estado fundamental possui um momento de dipolo maior do que o do primeiro estado excitado, a mudança para solventes mais polares acarretará numa maior estabilização do estado fundamental, e um solvatocromismo negativo será observado (MACHADO, 1997).

Ou seja, ambas as porfirinas apresentaram um solvatocromismo negativo, onde ocorre um deslocamento para a região do azul em solventes mais polares, ou seja, no estado fundamental a molécula está mais polarizada e apresentou

maior estabilização.

Segundo Machado (1997), isto pode ser devido as porfirinas apresentarem um grupo doador contendo um átomo de oxigênio e o grupo receptor contendo um átomo de nitrogênio, onde a transição eletrônica está associada a uma transferência de carga intramolecular entre o grupo doador e o receptor, produzindo um estado excitado com um momento de dipolo consideravelmente diferente daquele do estado fundamental.

4.3 Estabilidade dos FSs em solvente orgânico

O processo de solubilização de uma substância química resulta da interação entre a espécie que se deseja solubilizar (soluto) e a substância que a dissolve (solvente), e pode ser definida como a quantidade de soluto que dissolve em uma determinada quantidade de solvente, em condições de equilíbrio. Solubilidade é, portanto, um termo quantitativo (MARTINS; LOPES; BITTENCOURT DE ANDRADE, 2013).

As interações de soluto-solvente podem afetar a estrutura química, provocar fenômenos químicos e estão ligados ao nível molecular já que o solvente não é apenas “espectador” do processo, mas participa na estabilização dos estados de reagente e transição de maneira diferenciada por solvatação, como agente de transferência de massa e calor; na transferência de prótons (para reações catalisadas por ácido/base) (SILVA, 2011).

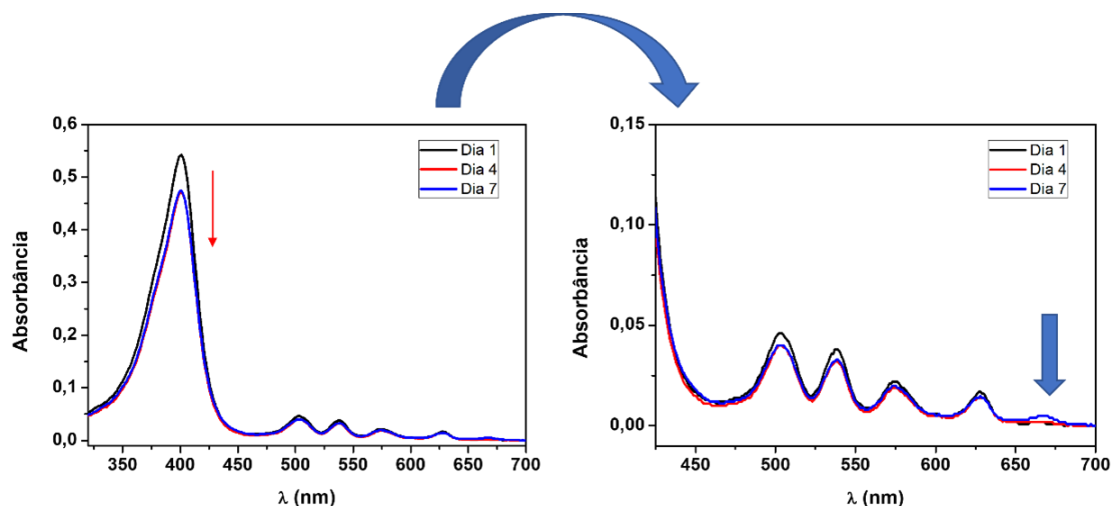
Durante os experimentos escolhidos, a solução preparada teve como soluto as porfirinas que foram solubilizadas em metanol e DMSO, como solvente. O metanol é um solvente da classe dos álcoois, composto de um grupo funcional -OH ligado a um átomo de carbono que possui uma forte ligação de hidrogênio entre água e álcool, sendo assim, um solvente polar (MARTINS; LOPES; BITTENCOURT DE ANDRADE, 2013).

Já o DMSO é um solvente aprótico dipolar, miscível com água e solúvel em muitos solventes orgânicos polares composto de um sulfóxido que possui dois grupos metila como substituintes (MAY, 2012).

As soluções das porfirinas sempre foram preparadas no dia do experimento ou no dia anterior aos testes, mas periodicamente foram realizadas leituras de absorvância em soluções metanólicas para acompanhamento de

estabilidade, não evidenciando mudanças no espectro. Mas ao iniciarmos o preparo das soluções de porfirinas em DMSO, foi observado que ocorre uma possível modificação estrutural – Figura 28.

Figura 28 - Espectro de absorção da PpIX em DMSO em dias diferentes.



Fonte: A autora (2023).

Como podemos observar, no dia 1 e no dia 4 temos um espectro característico de porfirinas no estado monomérico onde temos uma banda Soret em torno de 400 nm e quatro bandas Q entre 500 e 650 nm, mas no dia 7, observamos uma diminuição da banda Soret e observamos a formação de uma banda de absorção na região de 675 nm.

A solução foi armazenada em um eppendorf dentro de um freezer de geladeira e foi retirada minutos antes da leitura de absorção. O mesmo comportamento ocorre para as duas porfirinas sintetizadas, mas não ocorreu quando solubilizadas em MeOH.

Portanto, a solução de porfirinas em DMSO não são estáveis por um longo período, e por isso em todos os experimentos a mesma foi preparada no mesmo dia.

4.4 Determinação do coeficiente de absortividade molar (ϵ)

O coeficiente de absortividade molar (ϵ) é caracterizado pela capacidade que um mol de determinada substância consegue absorver luz em determinado

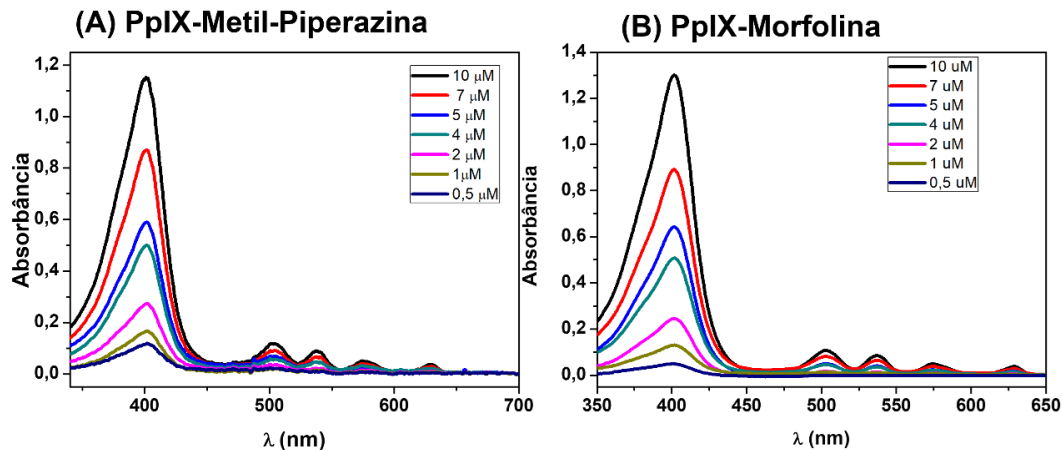
comprimento de onda (λ) (SKOOG, 2013).

É uma propriedade intrínseca de cada FS que pode ser obtido através de seu espectro de absorção, sendo caracterizado por dois parâmetros: a posição de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e o coeficiente de absortividade molar (ϵ), calculado em geral, nos $\lambda_{\text{máx}}$. Sendo assim, a relação entre ϵ , a concentração da amostra (c) e o caminho ótico (l) do meio de absorção caracteriza-se pela lei de Lambert-Beer (GEROLA, 2013).

Portanto, o coeficiente de absorção molar (ϵ) da PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina em metanol pode ser estimado através da lei de Lambert-Beer para os comprimentos de onda máximo da banda Soret e bandas Q (QIV, QIII, QII, QI), através do gráfico de absorbância *versus* concentração do composto.

Abaixo estão apresentados os espectros de absorção eletrônica dos FSs em metanol em diferentes concentrações (Figura 29) e a sua curva de regressão linear (Figura 30).

Figura 29 - Espectros de absorção UV-Vis da (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina em diferentes concentrações em metanol.

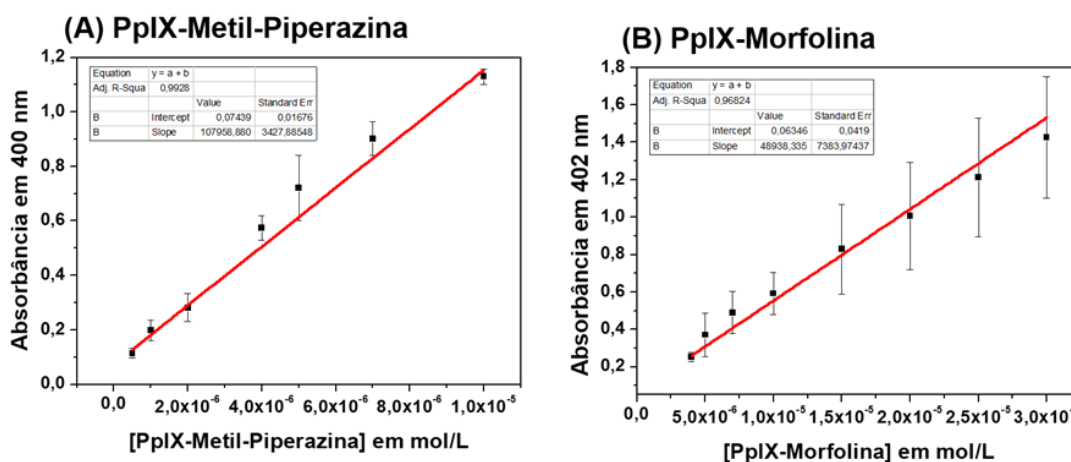


Fonte: A autora (2022).

O espectro de absorção eletrônica de ambas as porfirinas podem ser caracterizadas por uma banda de maior intensidade, conhecida como banda Soret (na região do azul) decorrente das transições do estado fundamental para o segundo estado excitado ($S_0 - S_2$), e quatro bandas Q referentes as transições do estado fundamental para o primeiro estado excitado ($S_0 - S_1$), onde S é a multiplicidade de spin e significa singlete. A multiplicidade de um estado

molecular é característica da transição eletrônica e calculada por $2S+1$, onde S é a resultante dos elétrons de um átomo, assim, em um estado onde não existe nenhum elétron desemparelhado, S será igual a zero e a multiplicidade será um (FIGUEIRÊDO, 2009).

Figura 30 – Representação gráfica dos valores de absorbância em função da concentração da (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina no comprimento de onda máximo da banda Soret (≈ 400 nm). Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo cada ponto o valor da média e a barra de erro o desvio padrão.



Fonte: A autora (2022).

As curvas de regressão linear (Figura 30) apresentaram um coeficiente de regressão linear ($R^2 \approx 0,99$) que atesta a ótima correlação dos pontos experimentais com a curva calculada. A linearidade das retas sugere que nestas condições experimentais, não se observa a agregação dos FSs.

Além disso, a partir destas curvas foi possível obter os valores do coeficiente de absortividade molar (ϵ) dos compostos estudados, que estão apresentados na Tabela 4, junto com seus respectivos comprimentos de onda em que as absorbâncias foram máximas.

Tabela 4 - Valores máximos de absorbância ($\lambda_{\text{máx}}$) e do coeficiente de absortividade molar (ϵ) obtidos para as porfirinas em metanol.

| | PpIX* | PpIX-Metil-Piperazina | PpIX-Morfolina |
|--|-------|-----------------------|----------------|
|--|-------|-----------------------|----------------|

| Banda | $\lambda(\text{nm})$ | $\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ | $\lambda(\text{nm})$ | $\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ | $\lambda(\text{nm})$ | $\epsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ |
|------------------|----------------------|---|----------------------|---|----------------------|---|
| Soret | 401 | 139797 | 401 | 107958 (± 2099) | 401 | 127832 (± 3183) |
| Q _{IV} | 502 | 12410 | 502 | 10362 ($\pm 546,9$) | 503 | 11332 ($\pm 545,3$) |
| Q _{III} | 537 | 10048 | 537 | 8250 ($\pm 373,0$) | 537 | 8426 ($\pm 495,9$) |
| Q _{II} | 574 | 6111 | 574 | 4321 ($\pm 245,5$) | 574 | 4831 ($\pm 334,3$) |
| Q _I | 628 | 4579 | 628 | 3396 ($\pm 302,3$) | 629 | 3718 ($\pm 308,1$) |

*Dados de ϵ da PpIX em metanol foram extraídos de (Myrzakhmetov et al., 2021)

Fonte: A autora (2022).

Os valores de ϵ na banda Soret são da ordem de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e os valores de ϵ nas bandas Q são da ordem de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para ambas as porfirinas (Tabela 4), indicando que essas transições eletrônicas são permitidas por spin e por simetria (HARRIS; BERTOLUCCI, 1978).

Para o cromóforo precursor (PpIX) das moléculas estudadas (PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina) tem-se que o valor do coeficiente de absortividade molar (ϵ) em metanol é de $\approx 139797 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na banda Soret (MYRZAKHMETOV et al., 2021), enquanto Santos et al reportam valores de ϵ em metanol para derivados de PpIX entre ≈ 17800 a $160460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na banda Soret, a depender da estrutura química (SANTOS et al., 2015).

Portanto, os valores ϵ da banda Soret obtidos para PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina, está próximo de valores de derivados de PpIX relatados na literatura (MYRZAKHMETOV et al., 2021; SANTOS et al., 2015), assim como os valores ϵ das demais bandas Q também apresentaram valores na mesma ordem de grandeza da molécula precursora, o que já era esperado pois as modificações propostas não aconteceram no cromóforo das moléculas, mantendo assim aspectos físico-químicos.

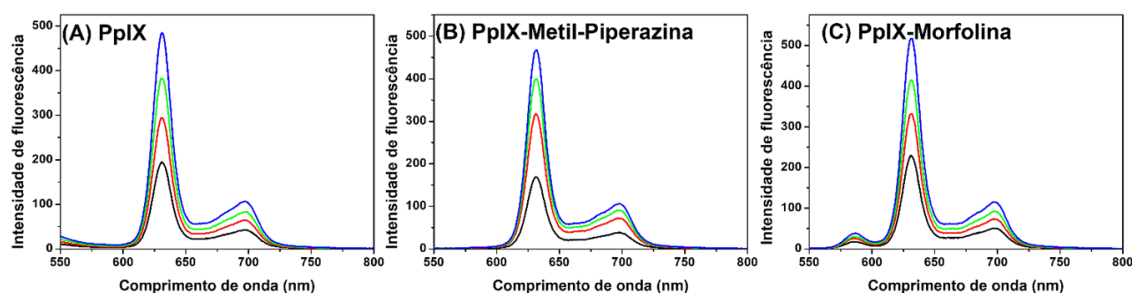
4.5 Espectroscopia de emissão e rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F)

Segundo Gourteman (1961), as porfirinas são consideradas fluorescentes

ou fosforescentes de acordo com os rendimentos quânticos. A emissão de fluorescência está relacionada à transição de níveis vibracionais mais baixo do estado excitado singlete para o nível vibracional do estado fundamental (FIGUEIRÊDO, 2009), ou seja, é uma técnica analítica sensível que permite a detecção de fótons emitidos por moléculas que sofreram excitação.

Os espectros de emissão das porfirinas dissolvidas em metanol foram obtidos na faixa de 550 a 800nm, excitando-se em 408 nm. Note que com ambos os derivados de porfirina apresentam emissão na faixa de 550 a 800 nm, que são atribuídos às transições do estado vibracional 0 do estado excitado (S_1), para o estado vibracional 0 e 1 do estado fundamental (S_0). Na Figura 31 têm-se os espectros de emissão dos FSs e na Tabela 5 encontram-se os valores dos respectivos máximos de emissão.

Figura 31 - Espectros de emissão de fluorescência da (A) PpIX, (B) PpIX-Metil-Piperazina e (C) PpIX-Morfolina em metanol ($\lambda_{exc} = 408$ nm, fenda de excitação 5 nm e fenda de emissão 10 nm).



Fonte: A autora (2022).

Tabela 5 - Valores de máximos de emissão de fluorescência dos derivados de PpIX em metanol.

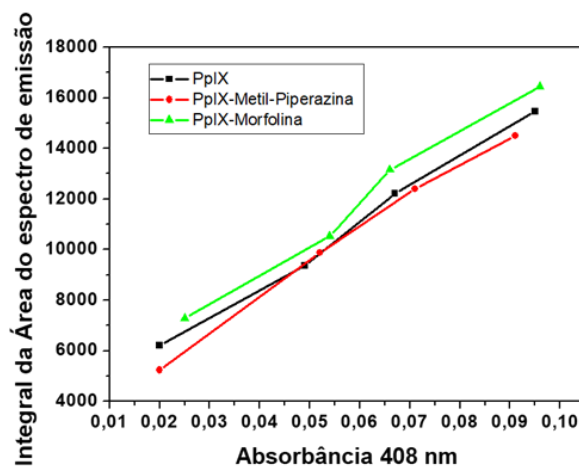
| Fotossensibilizador | Emissão $\lambda_{m\acute{a}x}/nm$ | |
|-----------------------|------------------------------------|---------|
| | Q (0,0) | Q (1,0) |
| PpIX-Metil-Piperazina | 632 | 698 |
| PpIX-Morfolina | 631 | 697 |

Fonte: A autora (2022).

Para evitar o efeito do filtro interno, o valor de absorbância no comprimento de onda de excitação foi mantido abaixo de 0,1 (Figura 32) para

obtenção dos espectros de emissão.

Figura 32 - Representação gráfica da integral da área do espectro de emissão em função da absorbância em 408 nm para PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina em metanol.



Fonte: A autora (2022).

Os cálculos para determinar os valores de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) de cada composto foram realizados através do cálculo da integral do espectro de emissão e usando-se a equação 2 apresentada no item 3.2.4 na seção de metodologia.

O padrão utilizado para as porfirinas foi a PpIX em metanol ($\phi_F = 0,07$) – (MYRZAKHMETOV et al., 2021). Os valores de ϕ_F calculados para os compostos estudados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Rendimento quântico de fluorescência dos FSs em metanol.

| Fotossensibilizador | ϕ_F |
|-----------------------|----------|
| PpIX | 0,070* |
| PpIX-Metil-Piperazina | 0,074 |
| PpIX-Morfolina | 0,073 |

*Valor extraído de (Myrzakhmetov et al., 2021).

Fonte: A autora (2022).

Ambas as porfirinas apresentam rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F) pequeno, com valores abaixo de 0,1 (Tabela 6). Esse resultado mostra que

a fluorescência não é o principal processo de decaimento destas moléculas, indicando que o decaimento radiativo do primeiro estado excitado singlete (S_1) tem menor predominância dentre os processos de relaxação competitivos (LAKOWICZ, 2006).

Além disso, os valores ϕ_F obtidos para a PpIX-Metil-Piperazina foi de 0,074 e 0,073 para a PpIX-Morfolina, ou seja, valores muito próximos levando-nos a concluir que as modificações nas ramificações da molécula não alteraram na sua capacidade de emissão de fótons. Além disso, segundo alguns estudos, porfirinas com cadeias alquílicas mais extensas apresentam valores de rendimento quântico de fluorescência mais baixo em consequência dos processos não radiativos, que desativam o estado excitado singlete dos compostos (LIMA, 2015).

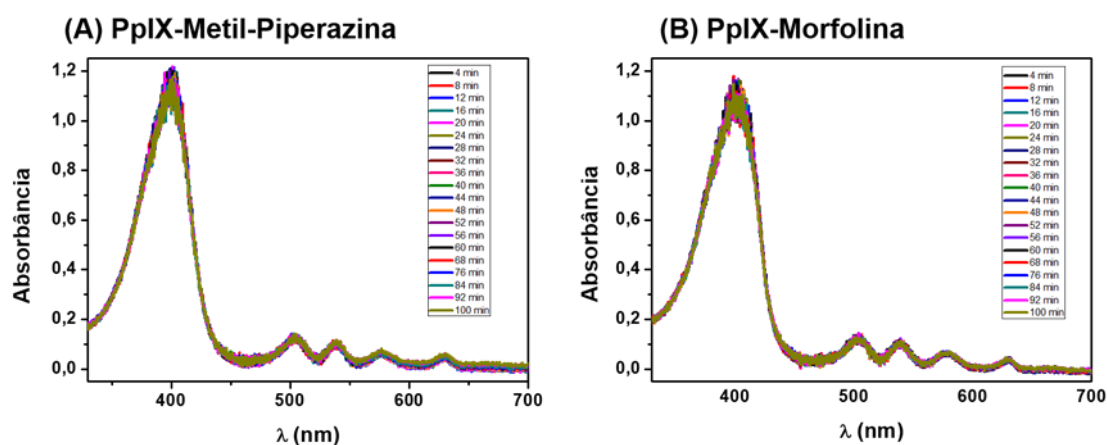
4.6 Avaliação da fotoestabilidade dos derivados da PpIX

As reações de fotobranqueamento promovem a redução da capacidade de absorção de fótons de luz nos fotossensibilizadores, que é um processo muito importante na geração de espécies reativas de oxigênio singlete (1O_2) (BONNETT; MARTÕ ÂNEZ, 2001; GEROLA, 2013).

Isso significa que em casos de elevada taxa de fotodegradação, pode diminuir a concentração dos FSs nas células antes mesmo de se causar danos em intensidade suficiente para provocar morte celular. Por isso, é comumente aceito que quanto mais fotoestável o FS, melhor será seu desempenho, principalmente porque pode suportar mais ciclos de produção de 1O_2 e desencadear eficientemente os processos de oxidação do tipo II consequentes (BAPTISTA et al., 2017).

Assim, para uma análise qualitativa, propôs-se monitorar as porfirinas sob irradiação do LED verde a fim de verificar a fotoestabilidade dos derivados de PpIX *via* espectroscopia de absorção eletrônica (Figura 33).

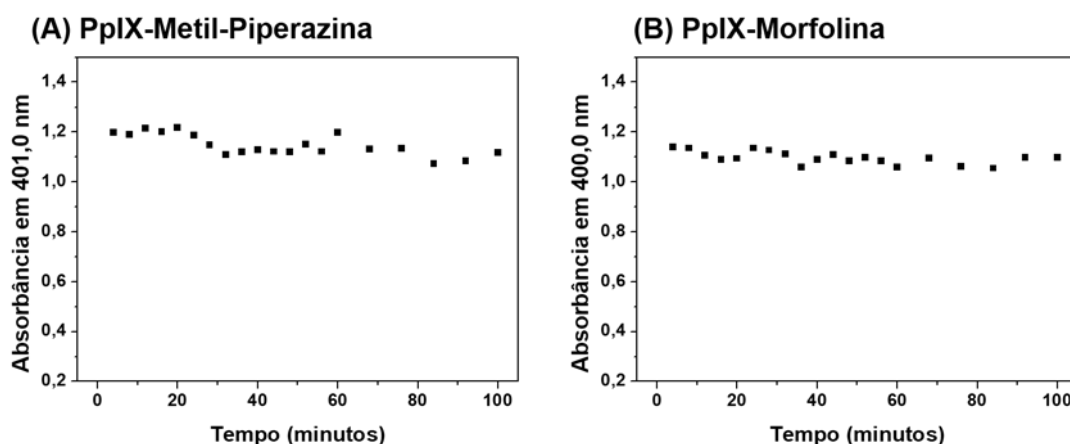
Figura 33 - Espectro de absorção UV-Vis da (A) 10 μM PpIX-Metil-Piperazina e (B) 9 μM PpIX-Morfolina em metanol sob irradiação com LED Verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$), potência 2,266 mW à 0,2 cm de distância da amostra.



Fonte: A autora (2022).

A partir destes espectros (Figura 33), construiu-se o gráfico com os valores de absorbância em 400 nm em função do tempo de irradiação (Figura 34).

Figura 34 - Representação gráfica do espectro de absorção UV-Vis em torno de 400,0 nm da (A) 10 μM PpIX-Metil-Piperazina e (B) 9 μM PpIX-Morfolina em metanol sob irradiação com LED Verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$), potência 2,266 mW à 0,2 cm de distância da amostra.



Fonte: A autora (2022).

Como podemos constatar na Figura 34, após os 100 minutos de irradiação do LED, potência 2,266 mW à 0,2 cm de distância da amostra, não ocorreu mudança significativa nos espectros de absorção da PpIX-Metil-Piperazina e

PpIX-Morfolina levando-nos a compreender que não houve fotodegradação das porfirinas, e que ambos são fotoestáveis frente à exposição da luz ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$) no intervalo de tempo analisado.

4.7 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ})

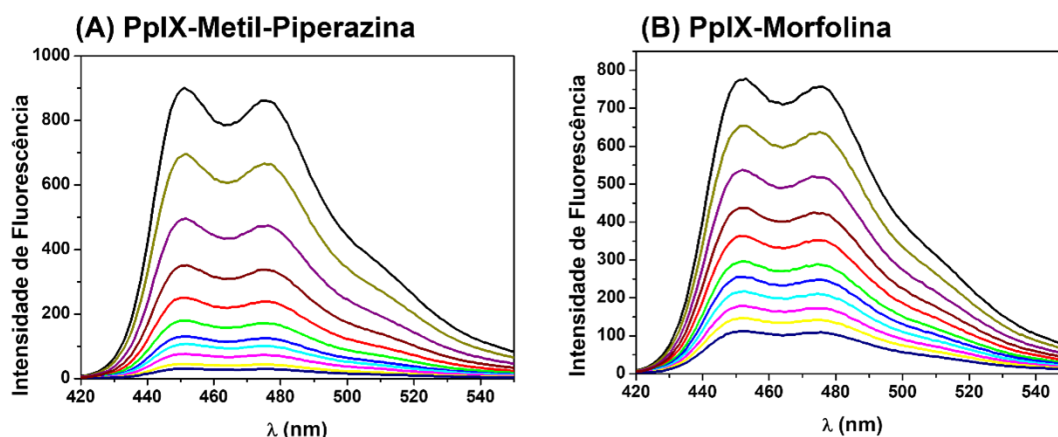
Os processos de foto-oxidação ligada ao oxigênio de moléculas biológicas (por exemplo, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, carboidratos) envolvem espécies reativas de oxigênio formadas em sistemas vivos, que incluem o $^1\text{O}_2$ (CARLONI et al., 1993). Maximizar a geração e fototoxicidade de $^1\text{O}_2$ durante a TFD é uma estratégia importante para aumentar a eficácia terapêutica (LI et al., 2016). Por isso, um dos fatores responsável por maior ou menor atividade de um FS é a quantidade de $^1\text{O}_2$ gerada.

O 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) é um excelente substrato para $^1\text{O}_2$, utilizado como sensor químico para determinação quantitativa da ação fotodinâmica. Sendo assim, a formação de oxigênio singleto pela excitação das porfirinas com luz e transferência de energia para o oxigênio molecular foi quantificada pelo método indireto, utilizando DPBF (CARLONI et al., 1993).

O DPBF possui bandas de absorção eletrônica em 268 nm, 310 nm e 410 nm, e, portanto, não absorve no comprimento de onda de irradiação do LED Verde ($522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$), o que garantiu que a interação da luz fosse restrita aos derivados de PpIX.

Sendo assim, os espectros de emissão da solução de DPBF e FS foram monitorados em função do tempo de irradiação com LED Verde ($522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$), totalizando 11 pontos onde foi possível visualizar a diminuição na intensidade da emissão de fluorescência do DPBF em 455 nm (Figura 35).

Figura 35 - Espectros de fluorescência do decaimento da sonda DPBF em metanol e para (A) PpIX-Metil-Piperazina (0,8 μ M) e (B) PpIX-Morfolina (0,7 μ M) em metanol em 32 segundos.



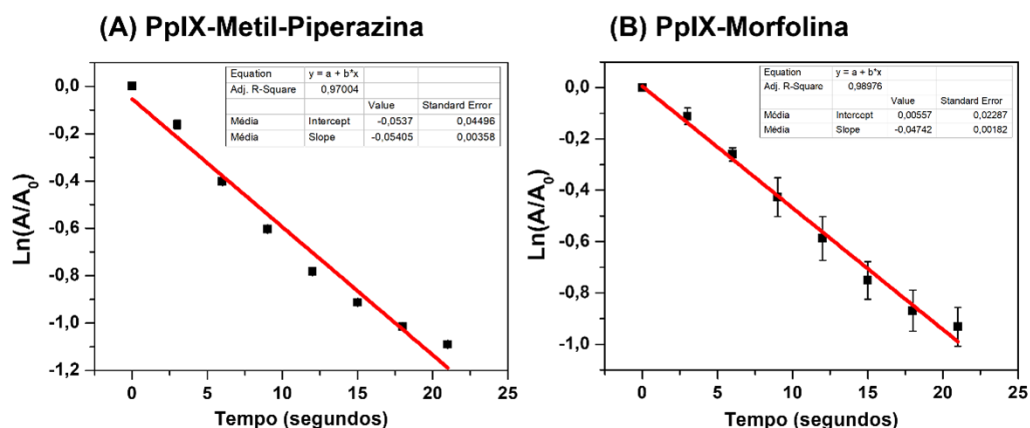
Fonte: A autora (2022).

De acordo com os espectros de fluorescência obtidos, foi possível observar o decaimento da banda do DPBF (Figura 35), indicando que as porfirinas produzem oxigênio singlete no intervalo de irradiação avaliado.

Portanto, podemos constatar que ocorre o decaimento exponencial da concentração do oxigênio singlete em função do tempo (Figura 36). A cinética de degradação da sonda (DPBF) também foi observada utilizando um padrão conhecido, que neste caso foi o corante Rosa de Bengala (RB) – Figura 37.

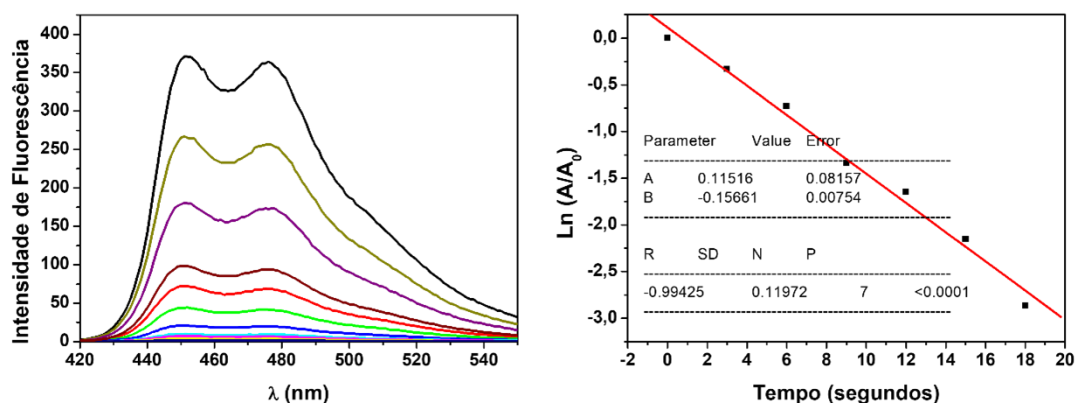
A escolha do RB como padrão, deve-se ao fato que este composto apresenta absorção de UV-Vis na mesma região que as porfirinas, permitindo assim, que a amostra fosse irradiada no mesmo comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$).

Figura 36 - Representação gráfica dos valores do logaritmo em função do tempo em segundos para (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina.



Fonte: A autora (2022).

Figura 37 - Decaimento da sonda DPBF com o corante RB e regressão linear do decaimento do oxigênio singleto para o corante RB.



Fonte: A autora (2022).

Os cálculos para determinar os valores de rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) de cada composto foram realizados através da Equação 5 apresentada no item 3.2.6 na seção de metodologia.

Os valores de ϕ_{Δ} calculados para os compostos estudados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) dos FSs em metanol.

| Fotossensibilizador | ϕ_{Δ} |
|-----------------------|-----------------|
| PpIX-Metil-Piperazina | 0,45 ± 0,05 |

| | |
|----------------|-----------------|
| PpIX-morfolina | $0,25 \pm 0,01$ |
|----------------|-----------------|

Fonte: A autora (2022).

Ambas as porfirinas apresentam valores de ϕ_{Δ} menores do que para seu precursor PpIX em metanol, $\phi_{\Delta} = 0,92$ (MYRZAKHMETOV et al., 2021). Outros autores também observaram valores menores de ϕ_{Δ} que variaram entre 0,34 e 0,84 para outros derivados de PpIX sintetizados (UCHOA; OLIVEIRA; BAPTISTA, 2010), indicando que ϕ_{Δ} depende da estrutura química do FS e dos grupos substituintes que o compõe.

Uma estrutura química muito semelhante à PpIX-Metil-Piperazina estudada neste trabalho, mais especificamente a *N-Piperazinil-clorina e6 dimetil éster* apresentou $\phi_{\Delta} = 0,52 \pm 0,06$ (BEREZIN et al., 2015), um valor muito próximo ao obtido para PpIX-Metil-Piperazina ($\phi_{\Delta} = 0,45 \pm 0,05$) – Tabela 7. Também foi reportado valor de $\phi_{\Delta} = 0,56$ para um derivado de clorofilina que possuem N,N – diamina como substituinte lateral do cromóforo (UCHOA; KONOPKO; BAPTISTA, 2015).

Esse valor mais baixo de $\phi_{\Delta} \approx 0,5$ para derivados de FS contendo amina comparado com PpIX ($\phi_{\Delta} \approx 0,9$) ou hematoporfirina ($\phi_{\Delta} \approx 0,7$), pode ser devido à supressão de 1O_2 por aminas (BERNSTEIN; FOOTE, 1999), uma vez que 1O_2 pode subtrair um elétron de uma amina terciária (e.g. Metil-Piperazina) para produzir um par de íons radical (MILLER, 2006).

No caso da PpIX-Morfolina, o $\phi_{\Delta} = 0,25 \pm 0,01$ foi quase metade do valor de ϕ_{Δ} comparado com PpIX-Metil-Piperazina (Tabela 7). Valores de $\phi_{\Delta} = 0,20$ e 0,28 foram reportados para outros FSs contendo morfolina como grupo substituinte (SINDELO et al., 2019).

Valor extremamente baixo de $\phi_{\Delta} = 0,04$ também foi observado por Zhu et al, em ftalocianina de silício contendo morfolina (ZHU et al., 2006). Note que os autores (ZHU et al., 2006) também avaliaram outra ftalocianina de silício contendo morfolina, mas com grupo amina quaternária, e observaram $\phi_{\Delta} = 0,45$, cerca de dez vezes maior que o outro (ZHU et al., 2006). Isso indica mais uma vez que aminas terciárias são supressoras de 1O_2 (BERNSTEIN; FOOTE, 1999).

O fato de PpIX-Morfolina apresentar menor valor ϕ_{Δ} que PpIX-Metil-Piperazina, provavelmente se deve ao fato que os elétrons da amina terciária da morfolina estão mais disponíveis para reagir com 1O_2 do que com os elétrons da

amina terciária da metil-piperazina (BRUICE, 2006).

Vale salientar que esses valores de ϕ_{Δ} menores do que geralmente reportados para porfirinas (UCHOA; OLIVEIRA; BAPTISTA, 2010), não significa necessariamente que os FS serão menos eficazes para TFD, uma vez que explorar apenas ϕ_{Δ} não é suficiente para garantir a eficiência da TFD (TSUBONE; BAPTISTA; ITRI, 2019). Por exemplo, Oliveira *et al* demonstraram que, embora o azul de metileno (AM) gere aproximadamente 50% de $^1\text{O}_2$ e o cristal violeta (CV) produza <0,05% $^1\text{O}_2$, observou-se que CV é mais eficiente em eliminar células cancerosas do que o AM (OLIVEIRA et al., 2011).

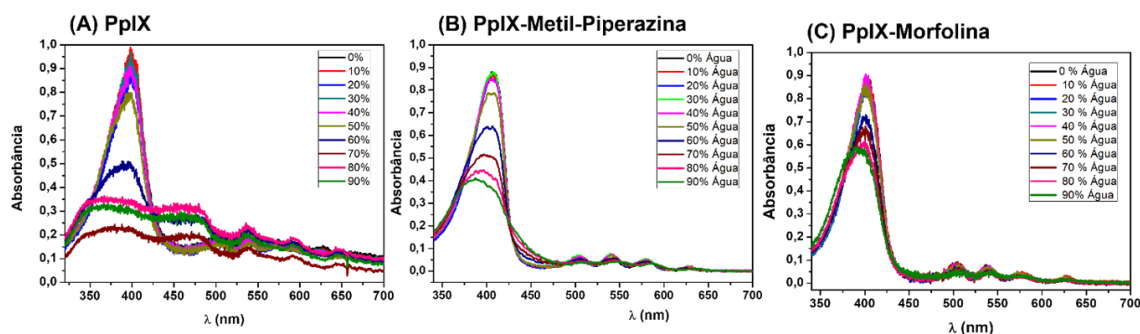
Outros trabalhos têm sugerido que o mecanismo de foto-oxidação predominante também dependerá do substrato, da distância entre o FS e os alvos oxidativos, bem como da concentração de oxigênio (BAPTISTA et al., 2017). Além disso, reações oxidação contato-dependente desencadeiam a formação de radicais que iniciam e propagam reações em cadeia de radicais, o que poderia causar danos mais severos em biomoléculas (BACELLAR et al., 2018; TASSO et al., 2019).

4.8 Estudo de auto-agregação dos FSs em misturas água/metanol ou água/DMSO

Nesta etapa do projeto, buscou-se obter informações sobre as propriedades espectroscópicas dos auto-agregados e em que condições físico-químicas eles se manifestam. É conhecido que o efeito de auto-agregação influencia nas propriedades espectroscópicas de porfirinas, bem como na sua eficiência fotodinâmica, captação reduzida pelas células-alvo entre outros problemas (SOBCZYŃSKI; TØNNESEN; KRISTENSEN, 2013).

Para compreender claramente o efeito de água no processo de auto-agregação e analisar as mudanças espectrais decorrentes de formação de espécies auto-agregadas, foram registrados os espectros de absorção eletrônica em misturas entre água e metanol variando-se a proporção volume/volume (v/v) de 0 a 90%, para concentração fixa de FS (Figura 38).

Figura 38 - Espectros de absorção da (A) 11 μM de PpIX, (B) 10 μM de PpIX-Metil-Piperazina e (C) 8 μM de PpIX-Morfolina em diferentes proporções água/metanol (v/v).

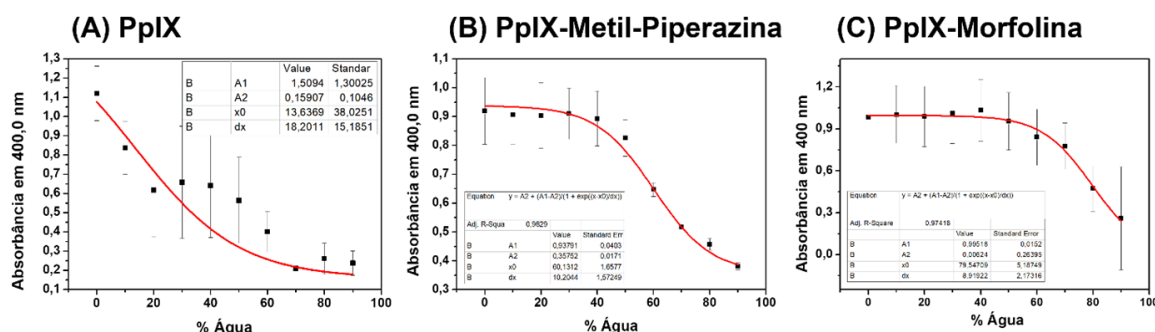


Fonte: A autora (2022).

Em metanol puro (100%), todas as moléculas apresentam posição (comprimento de onda máximo em 400 nm), intensidade e na forma de bandas espectrais características de monômeros (Figura 38). Com o aumento da porcentagem de água, observa-se a diminuição e alargamento desta banda.

Nos derivados de PpIX (Figura 38B e 38C), para misturas com teores de água iguais a 80 e 90% observaram-se um deslocamento da banda de 18 nm para a região do azul, caracterizando um efeito hipsocrômico, ou seja, um deslocamento para um comprimento de onda menor, mas que apresenta maior energia (CASAGRANDE; GANDIN; MASSUDA, 2018) caracterizando agregados do tipo H que são constituídos por planos empilhados de porfirinas e se organizam de forma empacotada (SOBCZYŃSKI; TØNNESSEN; KRISTENSEN, 2013), como já mencionado na introdução – seção 1.3.1.

Figura 39 - Variação da absorbância da (A) PpIX, (B) PpIX-Metil-Piperazina e (C) PpIX-morfolina em 400nm em diferentes % água/metanol.



Fonte: A autora (2022).

A PpIX apresentou a Concentração Agregacional Crítica (CAC) em $\approx 13\%$ água (Figura 39A), ou seja, não temos aparentemente um platô inicial na absorbância da solução de água/metanol, levando a considerar que a PpIX apresenta ser uma molécula muito hidrofóbica e agrega numa porcentagem muito menor de água.

Podemos observar que a PpIX-Metil-Piperazina mantém a absorbância em 400 nm praticamente constante em até 50% de água (Figura 39B), sugerindo que provavelmente a PpIX-Metil-Piperazina se encontra no seu estado monomérico até essa porcentagem de água. Acima de 50% de água, nota-se uma diminuição brusca da absorbância em 400 nm, chegando à $\approx 0,3$ em 90% de água (Figura 39B).

Como o gráfico apresentou um perfil sigmoide, foi realizado o ajuste de Boltzman que permite inferir qual porcentagem de água (valor do eixo X) em que o valor de absorbância se encontra à 50% do decaimento da curva sigmoide. Em 60% temos a CAC onde observamos uma diminuição da absorbância, sugerindo que a porfirina não se apresenta em estado monomérico.

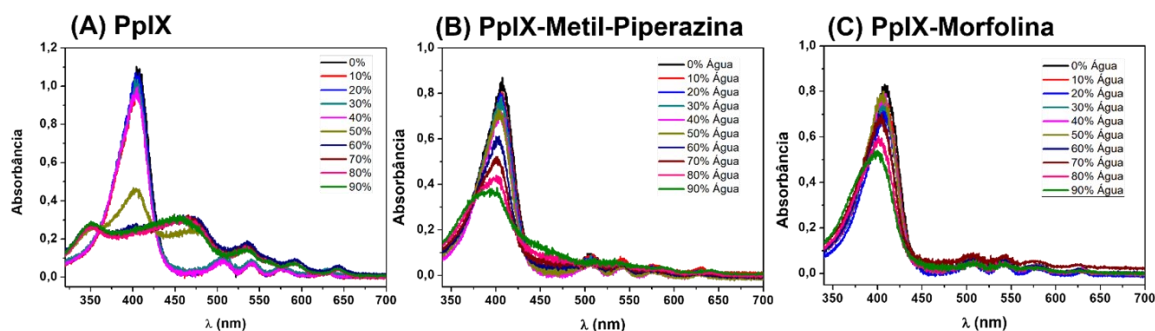
Para a molécula PpIX-Morfolina tem-se um platô em até $\approx 70\%$ de água, acima dessa porcentagem observa-se uma diminuição significativa da absorbância em 400 nm. O ajuste da equação de Boltzman, nos dados experimentais aponta um valor de CAC de 80% de água (Figura 39C). Os dados indicam que PpIX-Morfolina possui maior capacidade de ficar em estado monomérico sob concentrações maiores de água comparado com a PpIX-Metil-Piperazina.

Sabe-se que durante a formulação de preparações de medicações a agregação em soluções aquosas é uma grande barreira (SOBCZYŃSKI; TØNNESEN; KRISTENSEN, 2013). Como já discutimos, os derivados da PpIX demonstraram maior solubilidade em solventes orgânicos, mas para administração em seres humanos é necessário cuidado quanto a toxicidade dos solventes que podem ser ministrados em meio biológico (PERUZZO, 2018).

O DMSO ainda é utilizado como veículo para preparações tópicas por ser um solvente hidrosscópico e ser estável frente a proteínas e esteroides (STURION, 2011) e ainda por aumentar a permeação na pele (ALONSO et al., 2016). Assim, também propusemos avaliar em quais condições físico-químicas auto-agregados se formam em misturas de água/DMSO.

Foram registrados os espectros de absorção eletrônica em misturas entre água e DMSO variando-se a proporção volume/volume (v/v) de 0 a 90%, para concentração fixa de FS (Figura 40).

Figura 40 - Espectros de absorção da (A) PpIX, (B) PpIX-Metil-Piperazina e (C) PpIX-Morfolina em diferentes proporções água/DMSO (v/v).



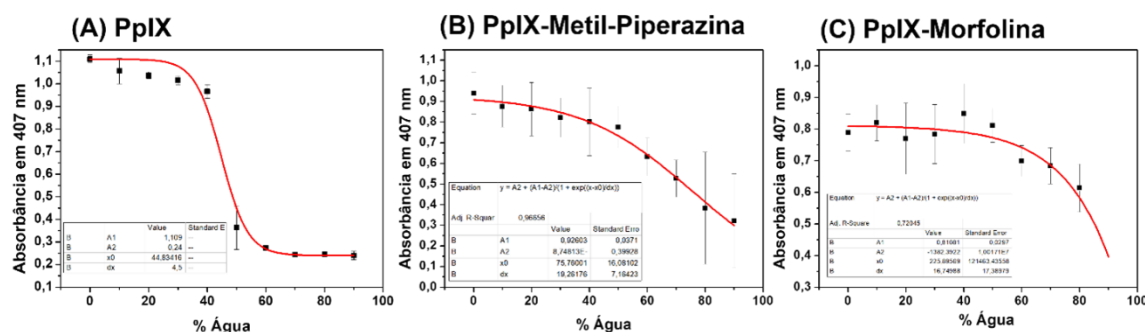
Fonte: A autora (2022).

A PpIX apresenta bandas espectrais características de monômeros até 40% de água; em 50% a banda Soret de absorção diminuiu bruscamente, e em maiores porcentagens já apresenta o espectro de absorção deslocado para a região do vermelho, ou seja, em comprimento de onda maiores, com bandas bem alargadas (Figura 40A).

Já no caso da PpIX-Metil-Piperazina em 50% de água observamos uma diminuição de intensidade da banda de absorção e em 90% temos um alargamento na banda Soret e aumento da linha base (Figura 40B), indicando a presença de moléculas agregadas (MYRZAKHMETOV et al., 2021).

Em DMSO puro (100%), a PpIX-Morfolina apresenta bandas espectrais e intensidade mais uniforme até 70% de água, e em maiores porcentagens de água tem-se uma diminuição na intensidade e um pequeno deslocamento no comprimento de onda em 8 nm para a região do azul (Figura 40C), caracterizando um deslocamento hipsocrômico, que sugere a formação de agregados do tipo H novamente, ou seja, a deslocalização para o azul pela ocorrência de estabilização do estado fundamental.

Figura 41 - Variação da absorbância em 407 nm da (A) PpIX, (B) PpIX-Metil-Piperazina e (C) PpIX-Morfolina em diferentes % água/DMSO.



Fonte: A autora (2022).

Na mistura água/DMSO podemos observar que a PpIX apresentou um platô em até $\approx 40\%$ de água, tendo logo em seguida uma diminuição na absorbância, apresentando um CAC de 45% (Figura 41A).

Já no caso da molécula PpIX-Metil-Piperazina temos a CAC em 75% de água onde provavelmente a formação de agregados torna-se maior (Figura 41B), promovendo assim, uma baixa absorbância em meio reacional diferente do que observado quando a molécula se encontra em forma de monômero.

Para a PpIX-Morfolina, a CAC obtida está em torno de 90% onde a formação de agregados torna-se maior e a absorbância diminui como observado na Figura 41C.

Sendo assim, podemos observar que a mistura de água/DMSO apresentou a concentração agregacional crítica maior para todas as porfirinas em comparação com a mistura de água/metanol, isso ocorre devido à natureza do solvente.

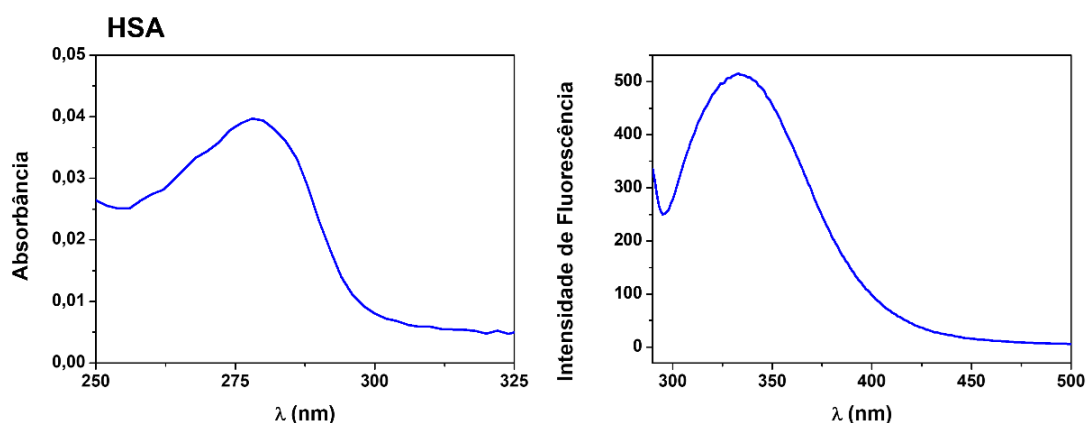
4.9 Avaliação da interação da HSA com derivados da PpIX

Uma vez que HSA permite a ligação de uma ampla gama de compostos exógenos e endógenos, possibilitando seu transporte dentro do corpo humano, é importante saber a afinidade do FS à albumina. O grau de ligação das porfirinas às proteínas séricas pode afetar a biodistribuição e a farmacocinética do FS e, por consequentemente ter forte influência na localização intracelular final (MALATESTI; MUNITIC; JURAK, 2017).

Com o intuito de compreender o efeito dos grupos periféricos (Metil-Piperazina e Morfolina) das porfirinas no comportamento de ligação na proteína, investigamos a interação de derivados de PpIX com HSA por espectroscopia de fluorescência.

Preparou-se a solução de HSA em tampão PBS e registrou-se o espectro de absorbância e fluorescência, antes de adicionar porfirinas (Figura 42). Note que o espectro de HSA apresenta banda eletrônica em 280 nm correspondente a transições $n \rightarrow \pi^*$, associado com o resíduo de aminoácido de triptofano (Trp) (JOSEPH R. LAKOWICZ, 2006).

Figura 42 - Espectros de absorção eletrônica e fluorescência da HSA (100 μ M) em tampão PBS, pH 7.4.



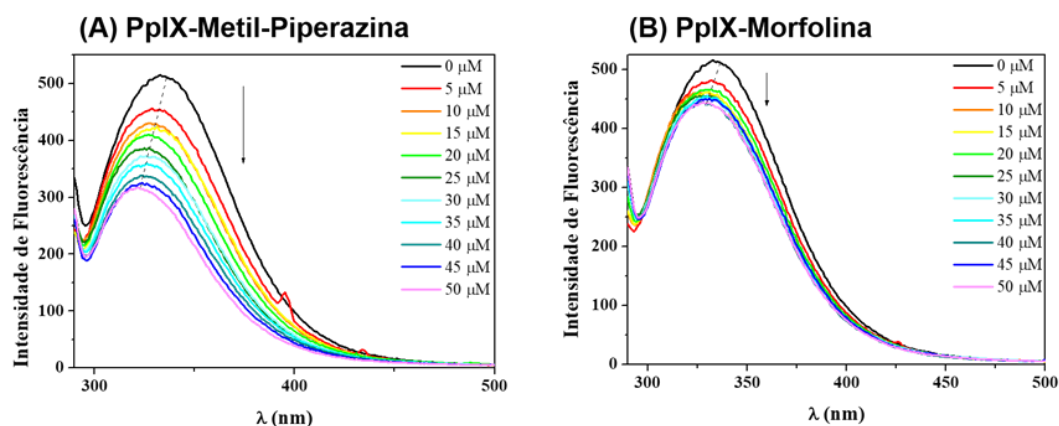
Fonte: A autora (2022).

Depois de preparada HSA em PBS, adicionou-se alíquotas de porfina (PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina), e mediu-se os respectivos espectros de fluorescência (Figura 43).

Note que a adição de alíquotas de solução dos FS causou uma diminuição gradual da intensidade dessa banda, como ilustra na Figura 43 para o sistema [PpIX-Metil-Piperazina] -HSA e [PpIX-Morfolina] -HSA.

Figura 43 - Espectro de fluorescência da solução de HSA (100 μ M) em PBS pH 7,4 sob adições sucessivas de (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina.

Temperatura = 35°C, λ_{exc} = 280nm, fendas de excitação e emissão de 5 nm e 20 nm.



Fonte: A autora (2022).

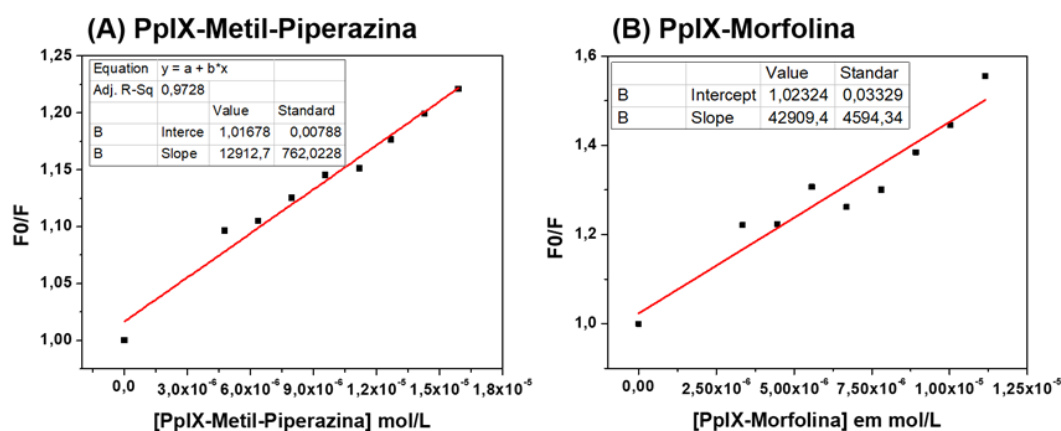
Esta diminuição de intensidade da fluorescência da HSA em presença de FS, é atribuída às mudanças conformacionais dos microambientes proteicos próximos aos resíduos de aminoácidos, em especial, aos fragmentos de triptofano (NETO et al., 2020).

Existem dois principais locais de ligação na estrutura da HSA: as subunidades I e II localizadas no subdomínio IIA e IIIA, respectivamente, mas também há estudos que relatam que a HSA também apresenta um local de ligação externa para compostos que possuem um elevado volume estérico como a PpIX (local III, localizado no subdomínio IB) (MENEZES, 2019).

A supressão de fluorescência refere-se a qualquer processo que envolve a diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra em estudo, por isso podemos considerar os derivados de PpIX como substâncias supressoras de fluorescência da albumina humana.

Para quantificar a capacidade de cada porfirina suprimir fluorescência da HSA, utilizou-se a equação de Stern-Volmer (Equação 5). Os gráficos de F_0/F em função da concentração dos compostos PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina estão apresentados na Figura 44.

Figura 44 - Gráficos de Stern-Volmer da interação (A) [PpIX-Metil-Piperazina] - HSA e (B) [PpIX-Morfolina] -HSA, em tampão PBS pH 7,4, temperatura = 35°C, λ_{exc} = 280 nm, fendas de excitação e emissão de 5 nm e 20 nm.



Fonte: A autora (2022).

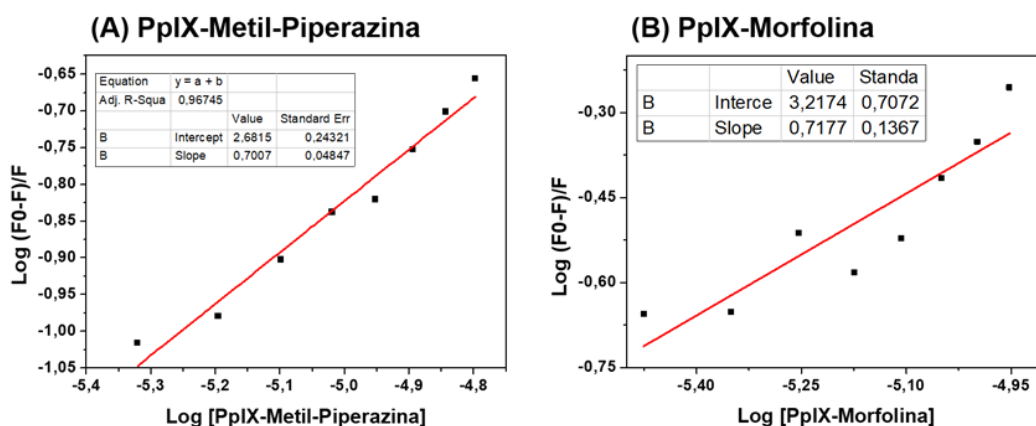
Aplicando o tratamento matemático de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência com os valores corrigidos verificou-se que o gráfico F_0/F em função da concentração do composto apresentou perfil linear para PpIX-Metil-Piperazina, enquanto para a PpIX-Morfolina não temos uma reta aparente. A partir da regressão linear da equação de Stern-Volmer (Equação 5) foram obtidos os valores da constante de supressão de Stern-Volmer (K_{sv}), que são os coeficientes angulares das retas (Tabela 8).

Uma vez definido a constante de supressão (K_{sv}), faz se necessário avaliar o grau de interação entre o FS e a proteína, onde quanto maior a afinidade entre a droga e a proteína, maior sua constante de ligação (K_b).

A afinidade de um composto com a albumina pode ser inferida pelos valores da constante de ligação e pelo número de sítios ocupados pelo composto na estrutura proteica. Um dos métodos para se calcular esse grau de associação entre FS e proteína é utilizando uma equação modificada de Stern-Volmer (Equação 7) em sua forma logarítmica, onde constrói-se um gráfico de $\log[(F_0/F) / F]$ em função de $\log[\text{supressor}]$ (VASCONCELOS, 2019) como podemos analisar na Figura 45.

Figura 45 - Gráficos de $\log[(F_0/F) / F]$ em função de (A) \log [PpIX-Metil-Piperazina] e (B) \log [PpIX-Morfolina]. HSA 100 μ M em tampão PBS pH 7.4;

$\lambda_{exc} = 280\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 5 nm e 20 nm, respectivamente.



Fonte: A autora (2022).

Tabela 8 - Constante de Stern-Volmer (K_{sv}), constante associação (K_b) e número de sítios de ligação (n) dos derivados de PpIX com HSA (solução 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HSA em tampão PBS, pH 7.4).

| FS | K_{sv} (mol/L) | K_b (mol/L) | n |
|-----------------------|--------------------|--------------------|------|
| PpIX-Metil-Piperazina | $1,29 \times 10^4$ | $4,80 \times 10^3$ | 0,70 |
| PpIX-Morfolina | $4,29 \times 10^4$ | $1,36 \times 10^2$ | 0,71 |

Fonte: A autora (2022).

A Tabela 8 mostra valores de $K_{sv} = 1,29 \times 10^4$ para PpIX-Metil-Piperazina e $K_{sv} = 4,29 \times 10^4$ para PpIX-Morfolina, ambos os valores estão acima de 10^3 sugerem que há uma interação entre os compostos e a estrutura da HSA (FOLETTTO, 2019).

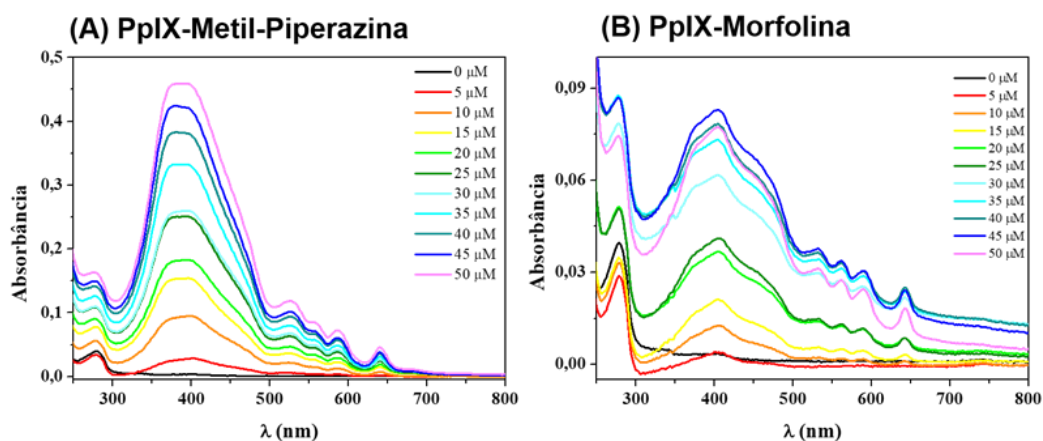
Já os resultados obtidos para a constante de associação (K_b) demonstraram não estar na mesma ordem de grandeza e além disso, são valores baixos sugerindo uma fraca capacidade de ligação com a HSA (VIECELLI et al., 2020).

O número de sítios de ligação (n) em torno de 0,7 sugere a presença de 1 sítio de ligação para os compostos nas subunidades HSA (FOLETTTO, 2019), ou seja, a PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina apresentam sítios de ligação com a HSA.

Vale salientar que o menor valor de K_b para PpIX-Morfolina, teve influência da auto-agregação dessa molécula em sistema aquoso. Os espectros de

absorbância também foram monitorados, e observou-se perfil espectroscópico de agregado porfirínico, ou seja, alargamento das bandas e aumento da linha base (Figura 46).

Figura 46 - Espectros de absorção eletrônica da HSA (100 μ M) em tampão PBS em presença de (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina em DMSO.

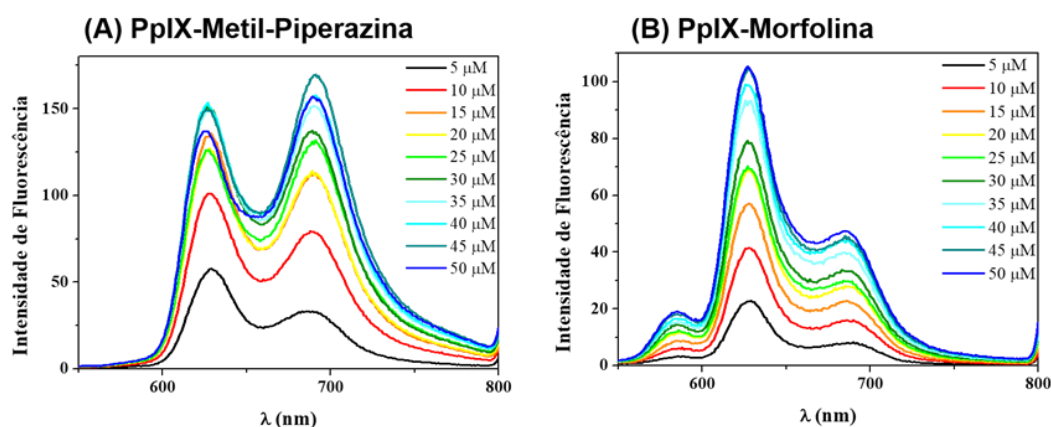


Fonte: A autora (2022).

Como podemos observar a PpIX-Metil-Piperazina exibiu um espectro de absorção característico de porfirinas no estado agregado, mas ainda com uma banda Soret distinta em torno de 400 nm e suas bandas Q em torno de 500 a 700 nm, sendo um pouco deslocadas e alargadas. Enquanto para PpIX-Morfolina tem-se um espectro com a banda Soret e as bandas Q mais deslocadas para região de menor energia do espectro e sem picos distintos, comparado a PpIX-Metil-Piperazina (Figura 46).

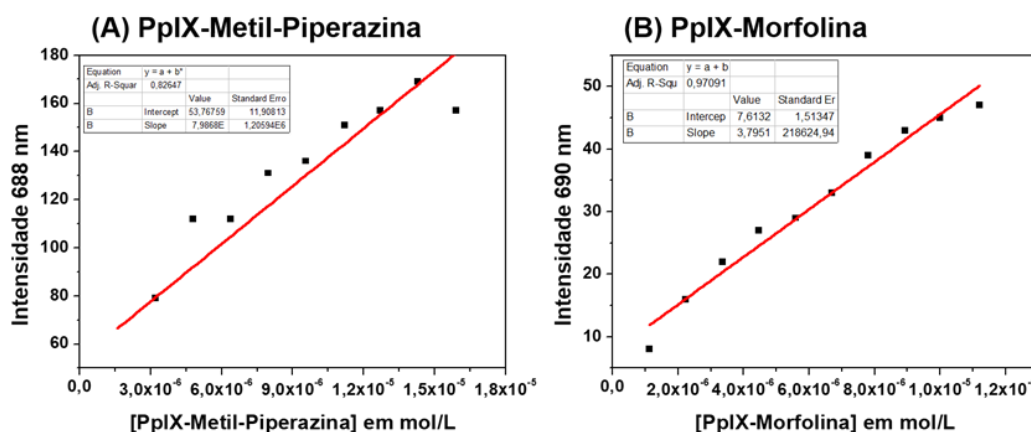
Contudo, em ambos o caso é possível verificar o pico de absorção característico da HSA em 280 nm. Também foram registrados os espectros de emissão de fluorescência das porfirinas (Figura 47), e observou-se que a intensidade de emissão em torno de 690 nm em função da concentração de porfirina possui um perfil linear (Figura 48).

Figura 47 - Fluorescência da solução de HSA (100 μ M) em PBS e (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina, λ_{exc} = 408 nm, fendas excitação e emissão de 5 nm e 10 nm, respectivamente.



Fonte: A autora (2022).

Figura 48 - Representação gráfica da intensidade em determinado comprimento de onda em razão da concentração de (A) PpIX-Metil-Piperazina e (B) PpIX-Morfolina em presença de HSA (100 μ M), λ_{exc} = 408 nm, fendas excitação e emissão de 5 nm e 10 nm, respectivamente.



Fonte: A autora (2022).

O perfil linear do espectro de fluorescência das porfirinas em presença de HSA, sugere que uma fração de porfirina está solúvel em sistema aquoso no estado monomérico, podendo interagir com a proteína.

4.10 Incorporação dos FSs em células HeLa

A incorporação do FS no tecido doente é tão importante quanto a formação de oxigênio singleto, sendo que a incorporação é um fator dependente

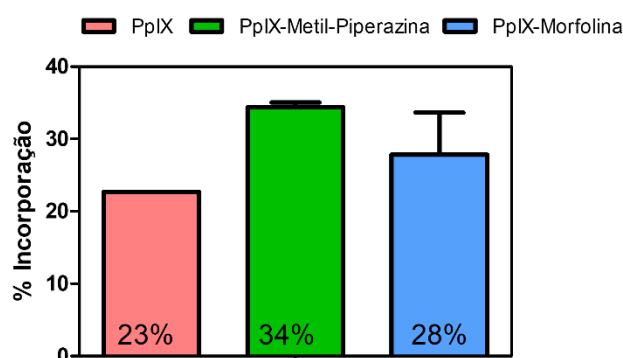
da interação do FS com sistemas biológicos, principalmente com biomoléculas como proteína e lipídios (UCHOA-FERNANDES, 2007).

Este processo é extremamente fundamental para o modo seletivo e eficaz de tratamento. Estudos de absorção ou incorporação celular também são importantes para identificar fotossensibilizadores eficazes na TFD (MASCHERONI et al., 2019). As características de absorção/incorporação celular de uma molécula são críticas para sua aplicação como agente terapêutico. Para apresentar citotoxicidade, é necessário que o composto transpasse a membrana celular que contém, principalmente, lipídios e proteínas de membrana para regular a entrada e saída de substâncias na célula (NELSON; COX, 2014).

Citometria de fluxo, UV-Vis e espectroscopia de fluorescência são alguns métodos utilizados para determinar o acúmulo intracelular de compostos que possuem transição eletrônica detectável na região UV-Vis e/ou emissão de luz (PUCKETT; BARTON, 2007; TSUBONE, 2017).

O percentual de incorporação das porfirinas em células HeLa foi medido a partir dos espectros de absorção das porfirinas, onde a área integrada da banda Soret das porfirinas entre 325 à 440 nm foi analisada. A Figura 49 foi obtida utilizando a equação 8 descrita na metodologia.

Figura 49 - % Incorporação celular das porfirinas 10 μ M incubados por 24 horas em células HeLa. As barras representam a média \pm desvio médio de dois experimentos independentes com 4 repetições em cada experimento (n = 8).



Fonte: A autora (2023).

Como podemos observar, a molécula da PpIX apresenta menor

incorporação nas células do tipo HeLa comparando as outras duas porfirinas que foram sintetizadas (Figura 49), o que sugere que as modificações propostas nas ramificações das porfirinas trouxeram melhoria na incorporação das células HeLa, o que pode estar relacionado com a interação com biomoléculas.

Como já discutido anteriormente, as modificações trouxeram melhorias na capacidade da PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina em ambientes aquosos de estarem na forma monomérica, possibilitando assim, uma maior quantidade dos FS estarem disponíveis para incorporação. Além disso, Liu et al. (2017), relata em seu estudo que a adição da Piperazina aumentou a incorporação tanto em células como em DNA, ou seja, sugerindo que a modificação proposta trouxe melhoria na incorporação como pode ser observado (LIU et al., 2017).

Uchoa-Fernandes (2007) relata que compostos contendo derivados de amina e de amônio quaternário apresentam incorporação maior de quatro a cinco vezes maior na apresentada por Hp IX (UCHOA-FERNANDES, 2007).

Note também que a PpIX-Metil-Piperazina possui maior incorporação (34%) comparado com PpIX-Morfolina (28%) – Figura 49, o que condiz com os resultados de ligação em HSA, no qual K_b da PpIX-Metil-Piperazina ($4,80 \times 10^3$ M) foi maior do que K_b da PpIX-Morfolina ($1,36 \times 10^2$ M) – ver Tabela 8.

4.11 Citotoxicidade e Fototoxicidade dos FSs em células HeLa

Substâncias novas, sintéticas ou naturais, que apresentem atividades e que são consideradas candidatas a uso farmacêutico devem ser testadas extensivamente quanto a sua toxicidade, antes de serem liberadas para o uso. Tradicionalmente os testes de toxicidade podem envolver como reagente biológico animais, entretanto a tendência atual é a substituição por métodos *in vitro* (ESTEVES-PEDRO, 2013).

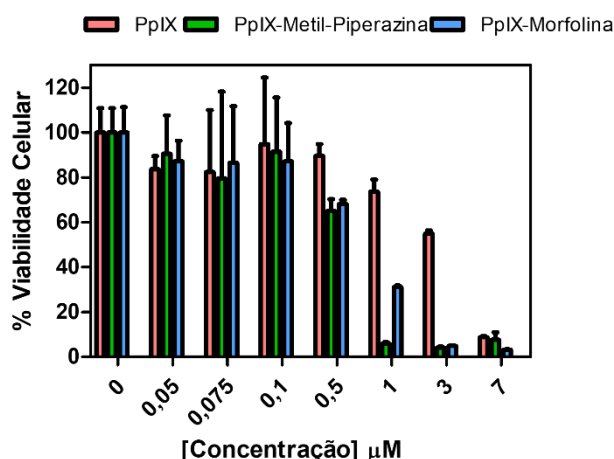
Experimentos de cultivo de células são uma ferramenta de estudo que possibilita investigar interações específicas que ocorrem em nível celular, além de minimizar a utilização de animais para vários testes. Em condições apropriadas, a maioria das células, tanto animais quanto vegetais, podem viver, multiplicar e expressar diferentes propriedades. Estas células podem ser observadas continuamente sob um microscópio e serem analisadas morfolologicamente e bioquimicamente, o que possibilita estudar a morte celular,

quanto a adição de moléculas ou substâncias específicas (TAVEIRA, 2007).

A citotoxicidade das porfirinas foi investigada em células tumorais (linhagem HeLa) em concentrações variadas (0 a 20 μM) na ausência de luz.

Conforme mostrado na Figura 50, a PpIX e os dois derivados não apresentam toxicidade significativa para as células HeLa até uma concentração de até 0,1 μM no escuro. Mas para concentrações maiores é possível ver a toxicidade mesmo no escuro para as células HeLa, sendo assim, para avaliar a atividade fototóxica dos FSs voltado para a terapia fotodinâmica utilizando um LED verde (522 nm, 2 J/cm^2 de luz dose) foram planejadas as concentrações menores que 0,5 μM .

Figura 50 - % Viabilidade celular em função da concentração (μM) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina após 24 hs de incubação no escuro em HeLa. As barras representam a média \pm desvio médio de três experimentos independentes com repetições em cada experimento (n=7).



Fonte: A autora (2023).

Os resultados preliminares para as células HeLa mostraram que a PpIX apresentou maior citotoxicidade a partir da concentração de 3 μM , enquanto a PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina em 0,5 μM já observamos citotoxicidade.

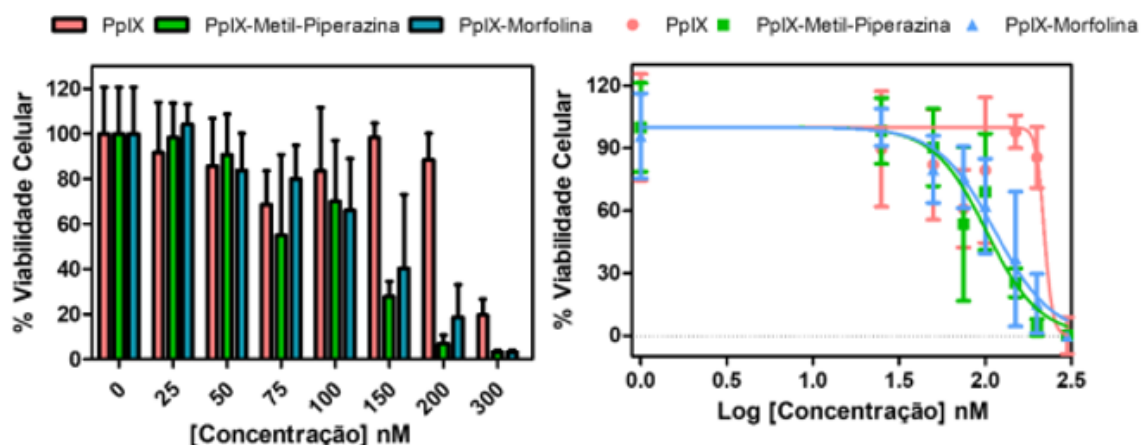
A partir de 7 μM não há diferença significativa na citotoxicidade entre as porfirinas para a linhagem HeLa.

Após a determinação da faixa de concentração citotóxica para as células HeLa com o uso dos FSs, foram realizados os experimentos de viabilidade celular pelo método MTT com irradiação luminosa (LED Verde, $\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm}$,

dose $\approx 2 \text{ J/cm}^2$) para avaliar o efeito fotodinâmico (ou fototoxicidade) das porfirinas em HeLa (Figura 51).

A exposição das células HeLa com luz do LED verde e a adição das porfirinas reduziu significativamente a viabilidade celular de forma dependente da concentração (Figura 51) quando comparado com o grupo controle apenas com luz visível e sem FS ($0 \text{ }\mu\text{M}$). Alguns estudos já relataram de células HeLa expostas a PpIX confirmaram sua maior sensibilidade à terapia fotodinâmica (JANKOWSKA; WIECEK; BURCZYNSKA, 2008).

Figura 51 - % Viabilidade celular em função da concentração (nM) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina após 24 hs de incubação e irradiação com LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 2 \text{ J/cm}^2$) em HeLa e viabilidade celular versus log [concentração] da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina para determinação do IC_{50} com irradiação em HeLa. As barras representam a média \pm desvio médio de quatro experimentos independentes com repetições em cada experimento ($n=11$).



Fonte: A autora (2023).

Como podemos observar, os estudos de fototoxicidade em células de câncer do tipo HeLa revelaram que a PpIX apresentou fototoxicidade a partir de 200 nM. Enquanto para ambos os derivados, a mudança estrutural proposta para a PpIX possibilitou um aumento de fototoxicidade em células tumorais resultando em decréscimo da viabilidade celular com irradiação a partir de 100 nM (Figura 51).

Os valores de IC_{50} para fototoxicidade das células irradiadas foram determinados pelos gráficos de % viabilidade celular versus log[concentração] das porfirinas (Figura 51) para a linhagem celular HeLa, e estão apresentados

na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de IC₅₀ (nM) com irradiação de LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm} \pm 10 \text{ nm}$, dose de luz $\approx 2 \text{ J/cm}^2$) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina na linhagem celular HeLa.

| Composto | IC ₅₀ (nM) em HeLa |
|-----------------------|-------------------------------|
| PpIX | 205 (± 64) |
| PpIX-Metil-Piperazina | 97 (± 12) |
| PpIX-Morfolina | 112 (± 39) |

Fonte: A autora (2023).

Observamos que a PpIX-Metil-Piperazina apresentou o valor de IC₅₀ 1,16 vezes menor comparado com a molécula PpIX-Morfolina, indicando que a PpIX-Metil-Piperazina é mais fototóxica (Tabela 8).

O IC₅₀ da PpIX obtido é aproximadamente 2,12 vezes maior em comparativo com a PpIX-Metil-Piperazina, e 1,83 vezes maior que a PpIX-Morfolina, ou seja, ambos os novos derivados foram mais fototóxicos que PpIX (Figura 51 e Tabela 9), provavelmente devido à maior incorporação destas moléculas em células (Figura 49).

Isso mostra que os fragmentos de piperazina e morfolina foram capazes de aumentar a interação com proteína e incorporação em células comparado com seu precursor PpIX, e consequentemente melhorar a atividade fotodinâmica.

Além disso, a maior fototoxicidade da PpIX-Metil-Piperazina em relação à PpIX-Morfolina também está diretamente correlacionado com a maior interação desta molécula com HSA e maior incorporação em células, o que sugere a importância de se planejar moléculas FS capazes de interagir bem com biomoléculas.

Pavani (2009) relata em que também observou maior fototoxicidade em paralelo com o aumento na incorporação nas células em porfirinas de base livre e tratadas com zincoporfirinas (PAVANI, 2009).

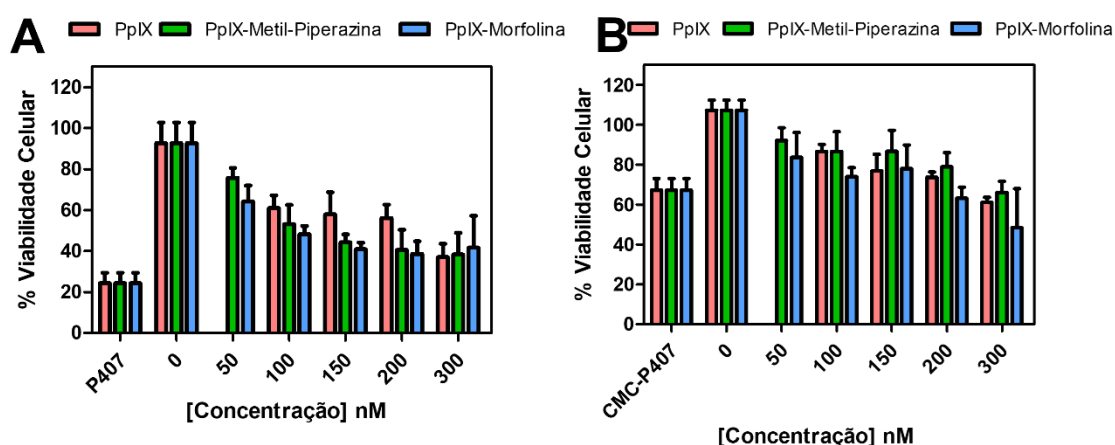
4.12 Citotoxicidade e Fototoxicidade dos FSs encapsulados em sistemas poliméricos

Os efeitos benéficos de formulações poliméricas-FS residem em sua excelente dispersão coloidal em água que permite a solubilização do FS hidrofóbico em condições fisiológicas e o acúmulo aprimorado nos locais do tumor por meio do efeito de permeabilidade e retenção. Os sistemas poliméricos foram considerados como veículos de entrega prospectivos para cargas úteis de FS na TFD (LI; HUH, 2014).

Sendo assim, a fototoxicidade das porfirinas encapsuladas em formulações poliméricas de P407 ou P407+CMC foram investigadas em células tumorais do tipo HeLa nas mesmas concentrações utilizadas com FS não encapsulado (50 a 300 nM).

Conforme mostrado na Figura 52, ambas as formulações demonstraram toxicidade em células do tipo HeLa mesmo no escuro.

Figura 52 - % Viabilidade celular em função da concentração (nM) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina após 24 hs de incubação no escuro em HeLa. (A) Formulado P407 e (B) Formulado P407-CMC. As barras apresentam a média \pm desvio médio de dois experimentos independentes com repetições em cada experimento (n = 6).



Fonte: A autora (2023).

Como controle, utilizamos apenas o polímero (P407 ou P407+CMC) na mesma concentração de polímero utilizado em 300nM de FS (maior concentração de FS). Nota-se que apenas o polímero P407 apresentou

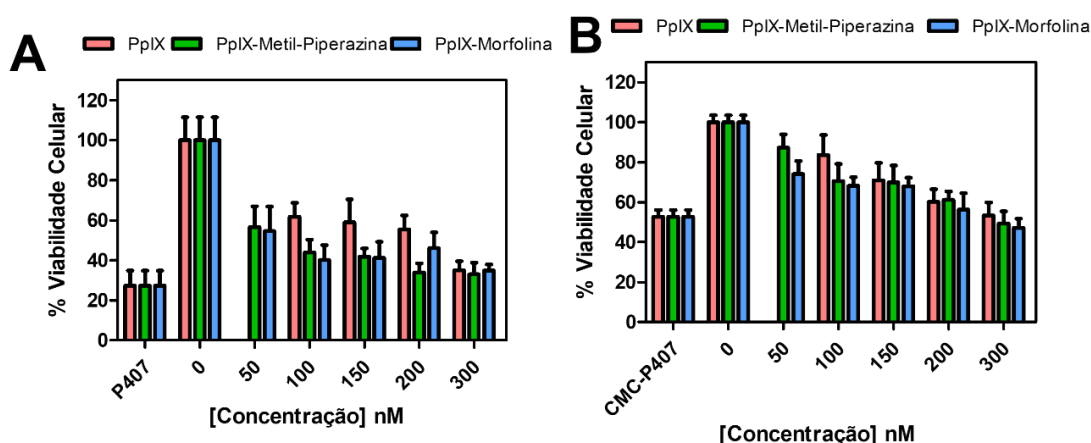
viabilidade celular próxima de ~25% (Figura 52A), valor muito próximo (38%) da viabilidade celular quando se utilizou 300 nM FS com mesma massa do polímero no tratamento controle. Isso sugere, que o polímero por si só apresenta toxicidade. Portanto, provavelmente a diminuição de % viabilidade em função da concentração de FS, na realidade é referente ao aumento da massa de polímero (Figura 52). O mesmo foi observado para a blenda polimérica P407+CMC – Figura 52B.

O que podemos perceber que o formulado de P407 apresentou viabilidade celular próxima de 25%, não sendo possível assim considerar a toxicidade do Formulado-Porfirina.

Já no caso de P407-CMC, observa-se uma viabilidade celular em torno de 70%, ou seja, apresentou toxicidade em células tumorais do tipo HeLa mesmo no escuro, não sendo possível considerar também a toxicidade dos formulados junto as porfirinas.

Os ensaios foram também realizados com irradiação com a luz de LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm}$, dose $\approx 2 \text{ J/cm}^2$), a fim de verificar o efeito fotodinâmico.

Figura 53 - % Viabilidade celular em função da concentração (nM) da PpIX, PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina após 24 hs de incubação e irradiação com LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm}$, dose $\approx 2 \text{ J/cm}^2$) em HeLa. (A) Formulado P407 e (B) Formulado P407-CMC. As barras representam a média \pm desvio médio de dois experimentos independentes com repetições em cada experimento (n=6).



Fonte: A autora (2023).

Nota-se que tanto no escuro (Figura 52) como no irradiado (Figura 53) as

misturas de P407-Porfirina e P407/CMC-Porfirina apresentaram % viabilidade semelhantes, ou seja, a irradiação não resultou em fototoxicidade como observado para células tratadas com luz e FS não encapsulado (Figura 51). Isso sugere que além dos sistemas poliméricos utilizado apresentarem determinada toxicidade, os mesmos diminuíram a atividade fotodinâmica das porfirinas.

Os resultados obtidos ocorreram provavelmente devido a dificuldade na solubilização das porfirinas nos sistemas poliméricos e ainda devido a porcentagem adicionada na formulação (0,001% (m/m)). Segundo Da Silva *et al* (2021), relata adicionar à formulação cerca de 1% (p/p) de ERI ou ERIs (Da Silva *et al*, 2021).

5 Conclusão

Os espectros eletrônicos de absorção obtidos das porfirinas inéditas sintetizadas ficaram semelhantes a molécula precursora, PpIX, assim como a maior parte das propriedades fotofísicas das moléculas (ϵ , ϕ_f , ϕ_Δ), levando em consideração que o cromóforo não sofreu alteração, somente as ramificações. No geral, as modificações químicas da PpIX descritas aqui não levaram a mudanças importantes nas propriedades fotofísicas do FS, como esperado. De fato, nosso objetivo era alterar apenas a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a eficiência da fotocitotoxicidade, mantendo as propriedades fotofísicas.

A PpIX-Metil-Piperazina e PpIX-Morfolina mostraram fotoestabilidade no tempo de 100 minutos sob irradiação de LED verde ($\lambda_{\text{máx}} = 522 \text{ nm}$). Nos estudos feitos de auto-agregação dos compostos em meio aquoso foi possível verificar que as modificações das ramificações propostas trouxeram melhor solubilidade em água comparada a PpIX, tanto em misturas água-metanol e água-DMSO.

Os estudos de interação HSA-porfirina em tampão PBS, demonstraram que PpIX-Metil-Piperazina possui maior interação com HSA ($K_b = 4,80 \times 10^3 \text{ mol/L}$) que PpIX-Morfolina ($K_b = 1,36 \times 10^2 \text{ mol/L}$). Além disso, o número de sítios de ligação obtidos sugere a presença de 1 sítio de interação dos compostos com uma das subunidades HSA.

Nos estudos de % incorporação dos compostos em HeLa, a porcentagem de incorporação dos dois derivados novos de PpIX foi maior que deu precursor

(PpIX), sugerindo que as porções metil-piperazina e morfolina são capazes de aumentar a incorporação das moléculas em células. Além disso, a PpIX-Metil-Piperazina apresentou maior incorporação (34%) em células HeLa comparado com PpIX-Morfolina (28%). Esses dados estão alinhados com os resultados de constante de ligação (K_b) em HSA, no qual PpIX-metil-piperazina interage mais com HSA que PpIX-Morfolina. Juntos, os dados sugerem que o fragmento metil-piperazina melhora a interação do FS com biomolécula (e.g. proteína) e consequentemente, sua incorporação em células.

Em relação a toxicidade dos compostos em células tumorais, os ensaios de viabilidade realizados mostraram que a PpIX-Metil-Piperazina possui valor de IC_{50} aproximadamente 1,16 vezes menor que a PpIX-Morfolina, portanto é mais fototóxica. Novamente, indicando que a maior interação da PpIX-Metil-Piperazina com HSA e maior incorporação em células contribui para melhor ação fotodinâmica do FS em células.

Os FS encapsulados em sistemas poliméricos (P407 e P407+CMC) não são viáveis para serem utilizados na TFD, pois o polímero apresentou determinada toxicidade para as células e diminuiu a atividade fotodinâmica dos FS, provavelmente devido a proporção utilizada em FS-Polímero.

6 Referências Bibliográficas

ACUNHA, T. V. **Caracterização e avaliação da atividade fotodinâmica de tetra-meso-[(piridil)porfirina] platina (II) frente à microorganismos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/handle/1/13928>.

AL-GHORBANI, M.; THIRUSANGU, P.; GURUPADASWAMY, H.D.; VIGNESHWARAN, Y. H. E.; MOHAMMED, B.T.; PRABHAKAR, S.A.K. **Synthesis of novel morpholine conjugated benzophenone analogues and evaluation of antagonistic role against neoplastic development**. *Bioorganic Chemistry*, v. 71, p. 55–66, 1 abr. 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.01.011>.

ALONSO, L.; SAMPAIO, R. N.; SOUZA, T.F.M.; SILVA, R.C.; NETO, N.M.B.; RIBEIRO, A.O.; ALONSO, A.; GONÇALVES, P.J. **Photodynamic evaluation of tetracarboxy-phthalocyanines in model systems.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 161, p. 100–107, 1 ago. 2016, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2016.05.008.

ANDRADE, S., RAMALHO, M.J.; LOUREIRO, J.A.; PEREIRA, M.C. **Liposomes as biomembrane models:** Biophysical techniques for drug-membrane interaction studies. Journal of Molecular Liquids, 334, 116141, 20 abr. 2021, DOI:10.1016/j.molliq.2021.116141.

ANTONANGELO, A. R. Avaliação da eficiência fotodinâmica de sistemas que associam derivados porfirínicos e LED visando aplicação em terapia fotodinâmica. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012. Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/2034>.

BACELLAR, I.O.L.; TSUBONE, T.M.; PAVANI, C.; BAPTISTA, M.S. **Photodynamic efficiency:** From molecular photochemistry to cell death. Int J Mol Sci. 31 Ago 2015; 16(9):20523-59, DOI: 10.3390/ijms160920523.

BACELLAR, I.; OLIVEIRA, M.C.; DANTAS, L.; COSTA, E.; JUNQUEIRA, H.C.; MARTINS, W.K.; DURANTINI, A.M.; COSA, G.; DI MASCIO, P.; WAINWRIGHT, M.; MIOTTO, R.; CORDEIRO, R.M.; MIYAMOTO, S.; BAPTISTA, M.S. **Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact-Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids.** Journal of the American Chemical Society, v. 140, n. 30, p. 9606–9615, 1 ago. 2018, DOI: 10.1021/jacs.8b05014.

BALISTA, P. A. **Inibidores de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e neuroproteção mediada pela cascata de sinalização da AKT na fase aguda do modelo de pilocarpina.** 2010. Dissertação (Mestre em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: Ribeirão Preto, 2010. Disponível em:

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17140/tde-17022011-144706/publico/Dissmestradoprisilabalista2010.pdf>.

BAPTISTA, M. S.; CADET, J.; DI MASCIO, P.; GHOGARE, A.A.; GREER, A.; HAMBLIN, M.R.; LORENTE, C.; NUNEZ, S.C.; RIBEIRO, M.S.; THOMAS, A.H.; VIGNONI, M.; YOSHIMURA, T.M. **Type I and type II photosensitized oxidation reactions**: Guidelines and mechanistic pathways. *Photochemistry and Photobiology*, 93(4), 912-919, 30 Nov 2016, DOI: 10.1111/php.12716

BARBOSA, F. F. **Síntese e caracterização de ligas magnéticas usando o método das esferas híbridas a partir da carboximetilcelulose**: Aplicação na reação de desidrogenação do etilbenzeno. 2015. Monografia (Bacharel em Química do Petróleo) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte: Natal, 2015. Disponível em:
https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/38353/2/S%C3%ADnteseCaracteriza%C3%A7%C3%A3oLigas_BARBOSA_2015.pdf.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo**: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*, vol. 29, n. 1, 113-123, 2006, DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.

BATTIE, C.; JITSUKAWA, S.; BERNERD, F.; DEL BINO, S.; MARIONNET, C.; VERSCHOORE, M. **New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types**. *Experimental dermatology*, 23, 7-12, 24 Março 2014, DOI: 10.1111/exd.12388

BEREZIN, D. B.; KARIMOV, D.R.; VENEDIKTOV, E.A.; KUSTOV, A.V.; MAKAROV, V.V.; ROMANENKO, Y.V. **Synthesis and singlet oxygen generation study of 13(1)-N-piperazinyl chlorin e6-15(2),17(3)-dimethyl ester**. *Macroheterocycles*, v. 8, n. 4, p. 384–388, 2015, DOI:10.6060/mhc151088b. Disponível em:
<https://www.semanticscholar.org/paper/The-Synthesis-and-Singlet-Oxygen->

Generation-Study-Berezin-

Karimov/e929e0c77f972393e326d0b1ae4fbb10dd7543b4.

BERNSTEIN, R.; FOOTE, C. S. **Singlet Oxygen Involvement in the Photochemical Reaction of C60 and Amines**. Synthesis of an Alkyne-Containing Fullerene. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 103, n. 36, p. 7244–7247, 9 set. 1999, DOI: 10.1021/jp991534t.

BOHM, F.; EDGE, R.; FOLEY, S.; LANGE, L.; TRUSCOTT, T.G. **Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity**. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 65, 177-183, 2001, DOI: 10.1016/s1011-1344(01)00259-7. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/jphotobiol>.

BONNETT, R.; MARTÍNEZ, G. **Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy**. *Tetrahedron*, 57, 9513-9547, 2001, DOI: 10.1016/S0040-4020(01)00952-8.

BRAGA, G.; APARICIO, J.L.; VILSINSKI, B.H; TESSARO, A.L.; GEROLA, A.P.; HIOKA, N.; CAETANO, W. **Autoagregação da 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil) porfirina (TMPP): Estudos espectroscópicos e análises multivariadas**. *Química Nova*, v. 37, n. 4, p. 648–652, 2014, DOI: 10.5935/0100-4042.20140105.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica** 4. Ed. Volume 2, São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BUK, M. V. **Estudo fotofísico da adsorção de moléculas orgânicas em argilas**. 2018. Dissertação (Mestre em Ciências) – Universidade de São Paulo: São Carlos, 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-04072018-174019/pt-br.php>.

CARLONI, P.; DAMIANI, E.; GRECI, L.; STIPA, P.; TANFANI, F.; TARTAGLINI, E.; WOZNIAK, M. On the use of 1,3 – diphenylisobenzofuran (DPBF). Reactions with carbon and oxygen centered radicals in model and natural systems. **Res. Chem. Intermed.** 19, 395-405, 1993, DOI: <https://doi.org/10.1163/156856793X00181>.

CASAGRANDE, K. C.; GANDIN, J. C.; MASSUDA, T. Y. C. Estimativa de tempo de deposição de manchas de sangue em local de crime por espectrofotometria UV-Vis. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 7, n. 3, p. 7–11, 31 out. 2018, DOI: 10.15260/rbc.v7i3.302.

CASAS, A., FUKUDA, H.; DI VENOSA, G.; BATLLE, A. Photosensitization and mechanism of cytotoxicity induced by the use of ALA derivatives in photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 85, n. 2, p. 279–284, 2001, DOI: 10.1054/ bjoc.2001.1875.

DA SILVA, A. C. P. **Avaliação do efeito sinérgico dos compostos Protoporfirina IX e Azure a incorporados na forma mista em sistemas micelares nanoestruturados**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná: Apucarana, 2015. Disponível em: http://riut.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5505/1/AP_COLIQ_2015_1_05.pdf.

DA SILVA, I. D. V. **Estudo de blendas poliméricas constituídas por goma xantana e poli (álcool vinílico) reticuladas com ácido cítrico para aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos**. 2016. Dissertação (Mestre em Química) – Universidade Federal da Paraíba: João Pessoa, 2016. Disponível em: https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPB_d4cb86db11bd0d1e988f78648b1865e8.

DA SILVA, J.B.; CAMPANHOLI, K.S.S.; BRAGA, G.; DE SOUZA, P.R.; CAETANO, W.; COOK, M.T.; BRUSCHI, M.L. The effect of erythrosine-B on the structuration of poloxamer 407 and cellulose derivative blends: in silico

modelling supporting experimental studies. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 130, p. 112440, 2021, DOI: 10.1016/j.msec.2021.112440.

DAMASCENO, M. V. A. **Estudos dos efeitos de solventes no espectro de absorção eletrônica da merocianina de Brooker e Derivados**. 2014. Tese (Doutor em Ciências) – Universidade de São Paulo: São Paulo, 2015. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-07042015-145330/publico/DOMarcusViniciusAraujoDamascenoCPGPar.pdf>.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, 233-234, 351-371, DOI: 10.1016/s0010-8545(02)00034-6.

DI MASCIO, P.; MIYAMOTO, S.; MEDEIROS, M.H.G.; MARTINEZ, G.R.; CADET, J. Peroxides: Synthesis and biological applications. **PATAI'S Chemistry of Functional Groups**, Online 2009 - 2014. John Wiley & Sons, Ltd, 2009, DOI:10.1002/9780470682531.pat0868

ENTRADAS, T.; WALDRON, S.; VOLK, M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, 111787, 1 mar. 2020, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2020.111787.

ESTEVEES-PEDRO, N. M. **Avaliação *in vitro* da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos**. 2013. Dissertação (Mestre) – Universidade de São Paulo: São Paulo, 2013. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9139/tde-24092015-120519/pt-br.php>.

FIGUEIRÊDO, M. V. A. F. **Estrutura eletrônica e propriedades espectroscópicas de compósitos polianilina/ouro: uma investigação AB initio**. 2009. Dissertação (Mestre em Física) – Universidade Federal de

Pernambuco: Recife, 2009. Disponível em:
<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/6188>.

FIOROT, R. G.; WESTPHAL, R.; LEMOS, B.C.; ROMAGNA, R.A.; GONÇALVES, P.R.; FERNANDES, M.R.N.; FERREIRA, C.V.; TARANTO, A.G.; GRECO, S.J. Synthesis, molecular modelling and anticancer activities of new molecular hybrids containing 1,4-naphthoquinone, 7-chloroquinoline, 1,3,5-triazine and morpholine cores as PI3K and AMPK inhibitors in the metastatic melanoma cells. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 9, p. 1860–1873, 2019, DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190096>.

FOLETTTO, P. **Síntese, caracterização, estudo fotofísico e interação molecular de novas calcogenoporfirinas derivadas da 5,10,15,20-tetrakis(pentafluorofenil)porfirina**. 2019. Tese (Doutor em Química) – Universidade Federal de Santa Maria: Santa Maria, 2019. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/17200/TES_PPGQUIMICA_2019_FOLETTTO_PATRICIA.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

FOOTE, C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science**. 1968 Nov 29;162(3857):963-70. DOI: 10.1126/science.162.3857.963.

GEROLA, A. P. **“Estudos Fotofísicos e Fotodinâmicos da clorofila a e derivados formulados em micelas poliméricas e lipossomos”**. 2013. Tese (Doutor em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013. Disponível em: <<http://repositorio.uem.br:8080/jspui/handle/1/4720>>. Acesso em: 19 mar. 2023.

GOMES, A. T. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Cancer, photodynamic therapy and porphyrin-type derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 993–1026, 2018, DOI: 10.1590/0001-3765201820170811.

GUO, C. C.; LI, H. P.; ZHANG, X. B. Study on synthesis, characterization and biological activity of some new nitrogen heterocycle porphyrins. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1745–1751, 2003, DOI: 10.1016/s0968-0896(03)00027-0.

GUO, C. C.; TONG, R. B.; LI, K. L. Chloroalkyl piperazine and nitrogen mustard porphyrins: Synthesis and anticancer activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 2469–2475, 1 maio 2004, DOI: 10.1016/j.bmc.2004.01.045.

HARRIS, D. C.; BERTOLUCCI, M. D. **Symmetry and spectroscopy: an introduction to vibrational and electronic spectroscopy**. Reprint. Originally published: New York: Oxford University Press, 1978. Disponível em: [https://www.chemistry.uoc.gr/lapkin/Harris%20D.,%20Bertolucci%20M.%20-%20Symmetry%20and%20Spectroscopy%20\(1978,%20Dover\).pdf](https://www.chemistry.uoc.gr/lapkin/Harris%20D.,%20Bertolucci%20M.%20-%20Symmetry%20and%20Spectroscopy%20(1978,%20Dover).pdf).

HU, J.; SORAI, E. H.; JOHNSON, C.N.; DEMELER, B.; BRANCALEON, L. Novel combinations of experimental and computational analysis tested on the binding of metalloprotoporphyrins to albumin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 445–457, 1 ago. 2019, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.060.

ICHIHASHI, M. UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, 189, 21-39, 15 jul. 2003, DOI: 10.1016/s0300-483x(03)00150-1.

IGLESIAS, B. A. **Síntese e Propriedades Espectroscópicas e Eletroquímicas de uma Triazeno-Porfirina**. 2012. Tese. (Doutor em Química) – Universidade de São Paulo: São Paulo, 2012. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-05092012-100130/publico/TeseCorrigidaBernardoAlmeidaIglesias.pdf>.

JANKOWSKA, A.; WIECEK, P.; BURCZYNSKA, B. Effect of photodynamic therapy on proliferation and apoptosis of 3T3 fibroblasts and HeLa cells.

Photomedicine and Laser Surgery, v. 26, n. 4, p. 343–347, 1 ago. 2008, DOI: 10.1089/pho.2007.2199.

KASHA, M.; RAWLS, H. R.; ASHRAF EL-BAYOUMI, M. The exciton model in molecular spectroscopy. **Pure and Applied Chemistry**, 11, 3-4, 1965, DOI: 10.1351/pac196511030371.

KEMPER, D. C. **Obtenção e Caracterização de Fibras Poliméricas de AgNPs-CMC/PVA Empregando Ecovio® por Eletrofiação Biaxial para Testes de Atividade Antimicrobiana e Catalítica**. 2022. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Toledo, 2022. Disponível em: <https://tede.unioeste.br/handle/tede/6419#preview-link0>.

KREMPEL, G. G. **Degradação fotocatalítica do corante tionina na região do visível utilizando o nanocompósito TiO₂/H₂TPP**. 2019. Monografia (Bacharel em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/27987>.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer; 3Ed, 2006.

LI, B.; MORIYAMA, E.H.; LI, F.; JARVI, M.T.; ALLEN, C.; WILSON, B.C. Diblock copolymer micelles deliver hydrophobic protoporphyrin IX for photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83, n. 6, p. 1505–1512, nov. 2007, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00194. x.

LI, B.; LIN, L.; LIN, H.; WILSON, B.C. Photosensitized singlet oxygen generation and detection: Recent advances and future perspectives in cancer photodynamic therapy. **Journal of Biophotonics**, v. 9, n. 11–12, p. 1314–1325, 1 dez. 2016, DOI: 10.1002/jbio.201600055.

LI, L.; HUH, K. M. Polymeric nanocarrier systems for photodynamic therapy. **Biomaterials Research**, 18(1), 19, 2014, DOI: 10.1186/2055-7124-18-19.

LIMA, N. M. A. **Obtenção, caracterização e propriedades espectroscópicas da meso-porfirina base-livre e coordenada ao íon Tértbio**. 2015. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/16936>.

LIU, Y.; HU, X.; WANG, L.; LIU, X.; BING, T.; TAN, W.; SHANGGUAN, D. Quinacridone derivative as a new photosensitizer: Photodynamic effects in cells and *in vivo*. **Dyes and Pigments**, v. 145, p. 168–173, 1 out. 2017, DOI: 10.1016/j.dyepig.2017.06.003.

MACHADO, C. **Estudos Físico-Químicos do Solvatocromismo e Halocromismo**. 1997. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 1997. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/77049>.

MALATESTI, N.; MUNITIC, I.; JURAK, I. Porphyrin-based cationic amphiphilic photosensitisers as potential anticancer, antimicrobial and immunosuppressive agents. **Biophysical Reviews**, v. 9(2), 149-168, 1 abr. 2017, DOI: 10.1007/s12551-017-0257-7.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; BITTENCOURT DE ANDRADE, J. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química. Nova**, v. 36, n. 8, 1248-1255, 2013, DOI: 10.1590/s0100-40422013000800026.

MASCHERONI, L.; DOZZI, M.V.; RANUCCI, E.; FERRUTI, P.; FRANCA, V.; SALVATI, A.; MAGGIONI, D. Tuning Polyamidoamine Design to Increase Uptake and Efficacy of Ruthenium Complexes for Photodynamic Therapy. **Inorganic Chemistry**, v. 58, n. 21, p. 1458–14599, 4 nov. 2019, DOI: 10.1021/acs.inorgchem.9b02245.

MAY, P. **Molecule of the Month: DMSO (Dimethyl sulfoxide)**: The smelly solvent that may have a variety of medical uses. Disponível em: <https://www.chm.bris.ac.uk/motm/DMSO/DMSO.htm>.

MCHIRI, C.; DHIFAOU, S.; EZZAYANI, K.; GUERGUEB, M.; ROISNEL, T.; LOISEAU, F.; NASRI, H. Insights into the new cadmium(II) metalloporphyrin: Synthesis, X-ray crystal structure, Hirshfeld surface analysis, photophysical and cyclic voltammetry characterization of the (morpholine){(meso-tetra(para-chlorophenyl)porphyrinato}cadmium(II). **Polyhedron**, v. 171, p. 10–19, 1 out. 2019, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.06.055>.

MENEZES, L. B. **Investigação das propriedades fotofísicas de porfirinas Meso Substituídas com complexos de Rull e estudo da interação com biomoléculas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria: Santa Maria, 2018. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/19554/DIS_PPGQUIMICA_2019_MENEZES_LUCAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

MILLER, G. P. Reactions between aliphatic amines and [60] fullerene: a review. **Comptes Rendus Chimie**, v. 9, 952-959, jul. 2006, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crci.2005.11.020>.

MYRZAKHMETOV, B.; ARNOUX, P.; MORDON, S.; ACHERAR, S.; TSOY, I.; FROCHOT, C. Photophysical properties of protoporphyrin IX, pyropheophorbide-a and photofrin® in different conditions. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 2, p. 1–21, 1 fev. 2021, DOI: 10.3390/ph14020138.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NETO, G. L. B.; BAPTISTA, E.A.M.; BECCA, G.H.S.; NAKATANI, H.S. Interações competitivas de complexos de rutênio contendo dimetilsulfóxido e ligantes n-heterocíclicos com albumina de soro humano. **Química Nova**, v. 43, n. 3, p. 261–270, 1 mar. 2020, DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170488>.

OGUNSIPE, A.; CHEN, J. Y.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical studies of zinc(II) phthalocyanine derivatives - Effects of substituents and solvents. **New Journal of Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 822–827, 2004, DOI: <https://doi.org/10.1039/B315319C>.

OLIVEIRA, C. S.; TURCHIELLO, R.; KOWALTOWSKI, A.J.; INDIG, G.L.; BAPTISTA, M.S. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 824–833, 15 ago. 2011, DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.023](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.023).

ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. **Materials**, v. 6, 817-840, 2013, DOI: [10.3390/ma6030817](https://doi.org/10.3390/ma6030817).

PAVANI, C. **Porfirinas tetracatiônicas alquiladas: Sistemas porfirínicos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 2009. Tese (Doutor em Ciências) – Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2009: Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-02062010-093046/publico/tese_CHRISTIANEPAVANI.pdf.

PEREIRA-LEITE, C.; NUNES, C.; REIS, S. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: In vitro assessment and relevance for their biological actions. **Progress in Lipid Research**, v. 52(4), 571-584, 2013, DOI: [10.1016/j.plipres.2013.08.003](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.08.003).

PEREZ, H. B. **Avaliação da fluorescência da protoporfirina IX em modelo tumoral de pele em camundongo na aplicação de terapia fotodinâmica utilizando sistema portátil com baixa irradiação**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Física) – Universidade Federal de São Carlos: São Carlos, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/16034/TCC%20Harelline.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

PERUZZO, L. C. **Toxicologia e Segurança**. Indaial: UNIASSELVI, 2018.

PITTOL, V. **Interação físico-química fármaco-polímero e efeitos correlatos sobre a solubilidade e atividade de griseofulvina sobre isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum***. 2016. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2016. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/233532>.

PUCKETT, C. A.; BARTON, J. K. Methods to explore cellular uptake of ruthenium complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 1, p. 46–47, 10 jan. 2007, DOI: <https://doi.org/10.1021/ja0677564>.

RAMOS, T. N. **Espectroscopia de absorção de dois fótons em moléculas orgânicas incluindo efeitos de solvente**. 2020. Tese (Doutor em Ciências) – Universidade de São Paulo: São Paulo, 2020. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-29022020-111816/publico/tese_biblioteca.pdf.

REICHARDT, C. Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. **Chemical Reviews**, v. 94, n. 8, 2319-2358, 1994, DOI: <https://doi.org/10.1021/cr00032a005>.

ROCHA, F. S. **Interação de ftalocianinas de zinco com óxido de grafeno: estudo das propriedades fotoquímicas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) – Universidade de Brasília: Brasília, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/32241>.

ROSE, C.; LICHON, L.; DAURAT, M.; CLÉMENT, S.; GARY-BOBO, M.; RICHETER, S. In vitro toxicity and photodynamic properties of porphyrinoids bearing imidazolium salts and N-heterocyclic carbene gold(I) complexes. **Comptes Rendus Chimie**, v. 24, 83-99, 2021. Disponível em: <https://comptes-rendus.academie-sciences.fr/chimie/articles/10.5802/crchim.98/>.

ROSSETTI, F. C. **Nanodispersões de cristais líquidos como sistemas de liberação de fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica do câncer de pele: avaliação in vitro e in vivo da permeação e retenção cutâneas**. 2010.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2010.

Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-10032010-084200/pt-br.php>.

SANTOS, C. G.; ROGGIA, I.; FERNANDES, L. S.; RAFFIN, R.P. Uso de blendas poliméricas em nano e microencapsulação. **Disciplinarum Scientia**, v. 16, n.2, 311-323, 2015. Disponível em:

<https://periodicos.ufn.edu.br/index.php/disciplinarumNT/article/view/1384/1315>.

SANTOS, S. C. DOS; MOREIRA, L.M.; NOVO, D.L.R.; SANTIN, L.R.R.; BIANCHINI, D.; BONACIN, J.A.; ROMANI, A.P.; FERNANDES, A.U.; BAPTISTA, M.S.; DE OLIVEIRA, H.P.M. Photophysical properties of porphyrin derivatives: Influence of the alkyl chains in homogeneous and micro-heterogeneous systems. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 19, n. 8, p. 920–933, 27 ago. 2015, DOI: 10.1142/S1088424615500650.

SANTOS, T. V. DOS. **Terapia fotodinâmica: uma revisão dos conceitos gerais e dos avanços de novos sistemas carreadores desenvolvidos com base na nanotecnologia**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Federal de Uberlândia: Uberlândia, 2020.

Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/30674>.

SILVA, P. L. **Solvatação em Solventes Puros e Misturas Binárias: Fundamentos e Aplicações**. 2011. Tese (Doutor em Química) – Universidade de São Paulo: São Paulo, 2011. Disponível em:

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-02112011-122800/pt-br.php>.

SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Photodynamic therapy: Pharmacological aspects, applications and news from medications development. **Quimica Nova**, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/262518106_Photodynamic_therapy_Pharmacological_aspects_applications_and_news_from_medications_development.

SINDELO, A.; KOBAYASHI, N.; KIMURA, M.; NYOKONG, T. Physicochemical and photodynamic antimicrobial chemotherapy activity of morpholine-substituted phthalocyanines: Effect of point of substitution and central metal.

Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, v. 374, p. 58–67, 1 abr. 2019. Disponível em:

http://vital.seals.ac.za:8080/vital/access/manager/PdfViewer/vital:44652/SOURCE1?site_name=GlobalView&viewPdfInternal=1.

SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, J.; CROUCH, S. **Fundamentos de Química Analítica**. 2013.

SMALLWOOD, I. MCN. **Handbook of organic solvent properties**. Arnold, 1996.

SOBCZYŃSKI, J.; TØNNESEN, H. H.; KRISTENSEN, S. Influence of aqueous media properties on aggregation and solubility of four structurally related mesoporphyrin photosensitizers evaluated by spectrophotometric measurements.

Pharmazie, v. 68, n. 2, p. 100–109, fev. 2013, DOI: 10.1691/ph.2013.2130.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron Science**, v. 54, 4151-4202, 1998. Disponível em:

<https://www.yumpu.com/en/document/read/9608361/porphyrin-based-photosensitizers-for-use-in-photodynamic-therapy>.

STURION, D. J.; STURION, M.A.T.; STURION, T.T.; STURION, A.L.T.; SALIBA, R.; CANO, J.E.C.; HERNANDES, B.M.S.; LEME, F.C.; PENTER, J.D.; CACHONI, B.J.; LOPES, E.M. Utilização do DMSO pelas vias intravenosa e tópica em 196 animais de companhia atendidos no Hospital Veterinário das Faculdades Integradas de Ourinhos - SP. **Jornal Brasileiro de Ciência**

Animal, v. 4, n. 8, p. 302–312, 2011. Disponível em: <https://irp-cdn.multiscreensite.com/38c5de7d/files/uploaded/2011%204%20%288%29%20-%203%20-%20DMSO.pdf>.

SUN, J.; HUANG, Y.; ZHENG, C.; ZHOU, Y.; LIU, Y.; LIU, J. Ruthenium (II) Complexes Interact with Human Serum Albumin and Induce Apoptosis of Tumor Cells. **Biological Trace Element Research**, v. 163, n. 1–2, p. 266–274, 1 fev. 2015, DOI: 10.1007/s12011-014-0165-7.

SUPPAN, P. Invited review solvatochromic shifts: The influence of the médium on the energy of electronic states. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 50, n.3, 293-330, 1990, DOI: 10.1016/1010-6030(90)87021-3.

TASSO, T. T.; SCHLOTHAUNER, J.C.; JUNQUEIRA, H.C.; MATIAS, T.A.; ARAKI, K.; LIANDRA-SALVADOR, E.; ANTONIO, F.C.T.; HOMEM-DE-MELLO, P.; BAPTISTA, M.S. Photobleaching Efficiency Parallels the Enhancement of Membrane Damage for Porphyrazine Photosensitizers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 39, p. 15547–15556, 2 out. 2019, DOI: 10.1021/jacs.9b05991.

TAVEIRA, S. F. **Desenvolvimento de formulações iontoforéticas semi-sólidas para o tratamento de tumores cutâneos: estudo in vitro em cultura de células tumorais**. 2007. Dissertação (Mestre) – Universidade de São Paulo: Ribeirão Preto, 2007. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-14052007-104834/pt-br.php>.

TSUBONE, T. M. **Specificity and bioavailability of photosensitizers: In the search of an optimized photosensitizer for Photodynamic Therapy**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo: São Paulo, 2017. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-27112017-104517/pt-br.php>.

TSUBONE, T. M.; BAPTISTA, M. S.; ITRI, R. Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation. **Biophysical Chemistry**, v. 254, p. 106263, 2019, DOI: 10.1016/j.bpc.2019.106263.

UCHOA, A. F.; KONOPKO, A. M.; BAPTISTA, M. S. Chlorophyllin derivatives as photosensitizers: Synthesis and photodynamic properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 12, p. 2615–2622, 1 dez. 2015, DOI: <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150290>.

UCHOA, A. F.; OLIVEIRA, C. S.; BAPTISTA, M. S. Relationship between structure and photoactivity of porphyrins derived from protoporphyrin IX. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 14, n. 9, p. 832–845, 2010, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01102.x.

UCHOA-FERNANDES, A. **Síntese, Caracterização e Fotoatividade de Fotossensibilizadores Derivados de Protoporfirina IX e de Clorofilina**. 2007. Tese (Doutor em Química) – Universidade de São Paulo: São Paulo, 2007. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-02072008-160723/publico/TeseAdjaciUFernandes.pdf>.

VASCONCELOS, D. N. **Estudo e Aplicação de Sondas Moleculares Baseadas em Dicroísmo Circular Induzido para Determinação de Sítios de Ligação em Albumina e Caracterização de Agregados Amilóides**. 2019. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”: Bauru, 2019. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/181077/vasconcelos_dn_dr_bauru.pdf?sequence=3&isAllowed=y.

VIECELLI, V.; CHAVES, O.A.; ARAKI, K.; MARTINS, P.R.; IGLESIAS, B.A. Synthesis, characterization, spectroelectrochemical, photophysical and HSA-binding properties of novel and versatile meso-tetra(4-pyridylvinylphenyl) porphyrins coordinated to ruthenium(II)-polypyridyl derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 11, p. 2282–2298, 2020, DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200080>.

YALAZAN, H.; BARUT, B.; ERTEM, B.; YALÇIN, C.O.; UNVER, Y.; OZEL, A.; OMEROGLU, I.; DURMUS, M.; KANTEKIN, H. DNA interaction and anticancer properties of new peripheral phthalocyanines carrying tosylated 4-morpholinoaniline units. **Polyhedron**, v. 177, 1 fev. 2020, DOI: 10.1016/j.poly.2019.114319.

ZHANG, Q., HE, J.; YU, W.; LI, Y.; LIU, Z.; ZHOU, B.; LIU, Y. A promising anticancer drug: A photosensitizer based on the porphyrin skeleton. **RSC Medicinal Chemistry**, 1 abr. 2020, DOI: 10.1039/C9MD00558G.

ZHU, Y. J.; HUANG, J.D.; JIANG, X.J.; SUN, J.C. Novel silicon phthalocyanines axially modified by morpholine: Synthesis, complexation with serum protein and in vitro photodynamic activity. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 9, n. 5, p. 473–477, maio 2006, DOI: 10.1016/j.inoche.2006.02.014.